



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**INSTITUTO DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS**

**NATURALES Y BIODIVERSIDAD**

**Área de Ingeniería Química**

*OBTENCIÓN DE HIDRÓGENO  
MEDIANTE LA FERMENTACIÓN  
OSCURA DE RESIDUOS DE COMIDA Y  
LACTOSUERO*

---

Tesis presentada por

**Vanessa Redondas Monteserín**

para optar al grado de Doctor

Bajo la dirección de

el Dr. Antonio Morán Palao y

la Dra. Xiomar Arleth Gómez Barrios

**León, 2013**



## AGRADECIMIENTOS

*Durante estos años son muchas las personas que han participado de una forma u otra en este trabajo y a quienes quiero mostrar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado. En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis, a D. Antonio Morán y a Dña. Xiomar Gómez, el poder haber realizado este trabajo. Antonio me acogió en su grupo de investigación y me ofreció la oportunidad de completar mi formación dentro de un ambiente de trabajo excelente. En su labor de dirección junto con Xiomar me han dedicado gran parte de su valioso tiempo asesorándome en la realización del trabajo experimental y en la elaboración de esta memoria, a ambos gracias por la confianza depositada en mi trabajo y por todo vuestro apoyo.*

*De igual manera quiero agradecer su colaboración a todos mis compañeros de laboratorio, entre ellos a Nuria y a Fernando C., por su total disponibilidad y por todos los buenos momentos que pasamos juntos, y con especial cariño a María José, por su amistad y su ayuda incondicional. Extiendo este agradecimiento a todos los compañeros que han estado conmigo durante todos estos años: Marta Elena, Teresa, Vicky, Daniel, Lorena, Adrián, Israel, Álvaro, Camino, Judith, David y Julio; así como al resto de los integrantes del grupo por toda su contribución: Juan, Ana, Luís Fernando, Olegario y Jorge.*

*Y por supuesto, quiero dar las gracias a mi familia por estar a mi lado en todo momento. A Pablo, por su comprensión y su apoyo incondicional, a Martín por sus sonrisas y su amor a pesar de tener que soportar largas horas sin la compañía de su mamá, a mis padres a quienes debo todo lo que soy, a mis hermanos por todos los momentos que hemos compartido juntos, y a mis suegros sin quienes esto tampoco habría sido posible.*

*A todos, MUCHAS GRACIAS.*



# ÍNDICE GENERAL

---

	Nº de página
ÍNDICE GENERAL .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XV
RESUMEN.....	XXI
ABSTRACT.....	XXIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XXV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DE LA SITUACIÓN ACTUAL .....	3
1.1.1. Contexto energético en España .....	3
1.1.2. La gestión de los residuos biodegradables y su uso energético .....	7
1.1.3. Valorización de subproductos de la industria agroalimentaria: el lactosuero .....	12
1.1.4. El hidrógeno.....	15
1.2. BIBLIOGRAFÍA.....	17
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	21
2.1. ANTECEDENTES .....	23
2.1.1. Procesos de producción biológica de hidrógeno.....	23
2.1.2. Etapas del proceso de digestión anaerobia .....	27
2.1.3. Microbiología y bioquímica de la producción de hidrógeno por fermentación oscura .....	31

2.1.4. Factores que afectan a la producción de hidrógeno por fermentación oscura .....	44
2.1.4.1. Inóculo .....	44
2.1.4.2. Sustrato .....	46
2.1.4.3. pH del medio .....	48
2.1.4.4. Presión parcial de hidrógeno .....	49
2.1.4.5. Temperatura .....	50
2.1.4.6. Tiempo de retención hidráulico y velocidad de carga orgánica .....	51
2.2. LOS OBJETIVOS Y LA PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO .....	52
2.2.1. Objetivo general .....	52
2.2.2. Objetivos específicos .....	53
2.2.3. Planificación del trabajo .....	54
2.3. BIBLIOGRAFÍA .....	56
3. MATERIALES EMPLEADOS Y MÉTODOS ANALÍTICOS .....	63
3.1. MATERIALES UTILIZADOS .....	65
3.1.1. Características de los inóculos empleados .....	65
3.1.2. Características de los residuos de comida utilizados .....	67
3.1.3. Características del lactosuero .....	69
3.1.4. Descripción de la planta piloto utilizada para la producción de hidrógeno y metano en dos etapas .....	70
3.2. ANÁLISIS RUTINARIOS .....	73
3.2.1. Medida de pH .....	73
3.2.2. Sólidos totales y volátiles .....	73
3.2.3. Demanda química de oxígeno .....	74
3.2.4. Amonio .....	76
3.2.5. Alcalinidad .....	77

3.2.6. <i>Cromatografía de gases</i> .....	77
3.2.6.1. <i>Composición del biogás</i> .....	79
3.2.6.2. <i>Sulfuro de hidrógeno</i> .....	79
3.2.6.3. <i>Ácidos grasos volátiles</i> .....	80
3.2.6.4. <i>Etanol</i> .....	80
3.2.7. <i>Cromatografía líquida de alta resolución</i> .....	81
3.2.7.1. <i>Ácido láctico y lactosa</i> .....	84
3.3. <b>ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO</b> .....	85
3.3.1. <i>Extracción, purificación y cuantificación del ADN</i> .....	86
3.3.2. <i>Amplificación de ADN mediante PCR</i> .....	87
3.3.3. <i>Separación de los productos de PCR mediante DGGE</i> .....	89
3.3.4. <i>Análisis de las bandas de DGGE: reamplificación y secuenciación</i> .....	93
3.4. <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	94
4. <i>PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO UTILIZANDO PELLETS DE BIOSÓLIDO COMO FUENTE DE INÓCULO</i> .....	97
4.1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	99
4.1.1. <i>Producción de hidrógeno con residuos de comida</i> .....	99
4.1.2. <i>Obtención de microorganismos productores de hidrógeno</i> .....	101
4.1.3. <i>Efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno</i> .....	102
4.1.4. <i>Producción de hidrógeno en biorreactores de membrana (MBR)</i> .....	103
4.2. <b>OBJETIVOS</b> .....	104
4.3. <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	105
4.3.1. <i>Metodología experimental</i> .....	105
4.3.1.1. <i>Ensayo en discontinuo variando la cantidad de inóculo añadida y el pH inicial</i> .....	106
4.3.1.2. <i>Ensayo en discontinuo variando la temperatura</i> .....	107

4.3.1.3. Ensayo en continuo: producción de hidrógeno en un biorreactor de membrana (MBR) .....	108
4.3.2. Metodología analítica .....	111
4.3.3. Tratamiento estadístico y representación de datos.....	112
4.4. RESULTADOS.....	113
4.4.1. Ensayo en discontinuo variando la cantidad de inóculo añadida y el pH inicial.....	113
4.4.1.1. Producción de hidrógeno .....	113
4.4.1.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV).....	116
4.4.2. Ensayo en discontinuo variando la temperatura .....	117
4.4.2.1. Producción de hidrógeno .....	117
4.4.2.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y etanol .....	120
4.4.2.3. Análisis microbiológico .....	123
4.4.3. Ensayo en continuo: producción de hidrógeno en un biorreactor de membrana (MBR) .....	126
4.4.3.1. Producción de hidrógeno .....	126
4.4.3.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV).....	129
4.5. CONCLUSIONES.....	132
4.5.1. Respecto a la producción de hidrógeno en discontinuo variando la cantidad de inóculo añadida al sistema y el pH inicial .....	132
4.5.2. Respecto a la producción de hidrógeno en discontinuo variando la temperatura .....	132
4.5.3. Respecto a la producción de hidrógeno en continuo en un biorreactor de membrana (MBR) .....	133
4.6. BIBLIOGRAFÍA.....	134
5. PRODUCCIÓN CONTINUA DE HIDRÓGENO CON ADICIÓN DE SOBRENADANTE DIGERIDO.....	139
5.1. INTRODUCCIÓN.....	141

5.1.1. <i>Proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas</i> .....	141
5.1.2. <i>Recirculación de lodo digerido a la etapa de producción de hidrógeno</i> ..	142
5.2. OBJETIVOS.....	144
5.3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	145
5.3.1. <i>Metodología experimental</i> .....	145
5.3.1.1. <b>Adición de sobrenadante digerido (con y sin pre-tratamiento de filtración) en un sistema de fermentación oscura a escala de laboratorio</b> .....	145
5.3.1.2. <b>Producción de hidrógeno y metano en dos etapas a escala piloto con y sin adición de sobrenadante digerido</b> .....	149
5.3.2. <i>Metodología analítica</i> .....	151
5.3.3. <i>Tratamiento estadístico de los datos</i> .....	151
5.4. RESULTADOS .....	152
5.4.1. <i>Adición de sobrenadante digerido (con y sin pre-tratamiento de filtración) en un sistema de fermentación oscura a escala de laboratorio</i> .....	152
5.4.1.1. <b>Producción de hidrógeno</b> .....	152
5.4.1.2. <b>Producción de ácidos grasos volátiles (AGV)</b> .....	160
5.4.2. <i>Producción de hidrógeno y metano en dos etapas a escala piloto con y sin adición de sobrenadante digerido</i> .....	163
5.4.2.1. <b>Producción de hidrógeno por fermentación oscura sin adición de sobrenadante digerido</b> .....	163
5.4.2.2. <b>Producción de hidrógeno por fermentación oscura con adición de sobrenadante digerido</b> .....	169
5.4.2.3. <b>Estudio de la metanización del efluente del reactor de producción de hidrógeno</b> .....	172
5.5. CONCLUSIONES.....	176
5.5.1. <i>Respecto al efecto de la adición de sobrenadante digerido (con y sin pre-tratamiento de filtración) en un sistema de fermentación oscura a escala de laboratorio</i> .....	176

5.5.2. <i>Respecto a la producción de hidrógeno y metano en dos etapas a escala piloto con y sin adición de sobrenadante digerido</i> .....	177
5.6. BIBLIOGRAFÍA.....	179
6. EFECTO DEL TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y EN LA COMUNIDAD MICROBIANA.....	183
6.1. INTRODUCCIÓN.....	185
6.1.1. <i>Efecto del tiempo de retención hidráulico (TRH) en la producción de hidrógeno por fermentación oscura</i> .....	185
6.2. OBJETIVOS.....	187
6.3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	187
6.3.1. <i>Metodología experimental</i> .....	187
6.3.2. <i>Metodología analítica</i> .....	189
6.3.3. <i>Tratamiento estadístico de los datos</i> .....	189
6.4. RESULTADOS.....	190
6.4.1. <i>Efecto del TRH en el proceso de producción de hidrógeno</i> .....	190
6.4.2. <i>Efecto del TRH en la comunidad microbiana del reactor de hidrógeno</i> .	198
6.5. CONCLUSIONES.....	203
6.5.1. <i>Respecto al efecto del TRH en el proceso de producción de hidrógeno</i> ...203	
6.5.2. <i>Respecto al efecto del TRH en la comunidad microbiana del reactor de hidrógeno</i> .....	204
6.6. BIBLIOGRAFÍA.....	204
7. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO....	209
7.1. INTRODUCCIÓN.....	211
7.1.1. <i>Producción de hidrógeno a partir de lactosuero</i> .....	211
7.2. OBJETIVOS.....	213

<b>7.3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	214
<b>7.3.1. Metodología experimental</b> .....	214
<b>7.3.1.1. Ensayo de producción de hidrógeno en discontinuo</b> .....	214
<b>7.3.1.2. Ensayo de producción de hidrógeno en continuo</b> .....	216
<b>7.3.2. Metodología analítica</b> .....	220
<b>7.3.3. Tratamiento estadístico de los datos</b> .....	220
<b>7.4. RESULTADOS</b> .....	220
<b>7.4.1. Ensayo de producción de hidrógeno en discontinuo</b> .....	220
<b>7.4.1.1. Producción de hidrógeno</b> .....	220
<b>7.4.1.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y de ácido láctico</b> .....	225
<b>7.4.2. Ensayo de producción de hidrógeno en continuo</b> .....	227
<b>7.4.2.1. Producción de hidrógeno</b> .....	227
<b>7.4.2.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y de ácido láctico</b> .....	234
<b>7.5. CONCLUSIONES</b> .....	237
<b>7.5.1. Respecto a la producción de hidrógeno a partir de lactosuero en discontinuo con diferentes fuentes de inóculo</b> .....	237
<b>7.5.2. Respecto a la producción continua de hidrógeno a partir de lactosuero utilizando diferentes VCO</b> .....	237
<b>7.6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	238
<b>8. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	243
<b>8.1. RESPECTO A LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO UTILIZANDO PELLETS DE BIOSÓLIDO COMO FUENTE DE INÓCULO</b> .....	245
<b>8.2. RESPECTO A LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO CON ADICIÓN DE SOBRENADANTE DIGERIDO</b> .....	247

8.3. RESPECTO AL EFECTO DEL TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y EN LA COMUNIDAD MICROBIANA.....	247
8.4. RESPECTO A LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE LACTOSUERO.....	248
<i>ANEXOS</i> .....	251
A.I. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS RECOGIDOS EN EL CAPÍTULO 4 .....	253
A.II. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS RECOGIDOS EN EL CAPÍTULO 5 .....	255
A.III. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS RECOGIDOS EN EL CAPÍTULO 6 .....	257
A.IV. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS RECOGIDOS EN EL CAPÍTULO 7 .....	258

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Nº de Página

## CAPÍTULO 1

- Figura 1.1. Estructura energética española en el año 2010 en términos de consumo de energía primaria (Fuente IDAE, 2011)..... 4
- Figura 1.2. Participación de las distintas fuentes de energía en la generación eléctrica (Fuente MINETUR, 2013)..... 6
- Figura 1.3. Distribución de la producción de hidrógeno por fuente de energía primaria. (Laborde y Rubiera, 2010)..... 16

## CAPÍTULO 2

- Figura 2.1. Diagrama completo de digestión anaerobia considerando los procesos simultáneos (Zinder, 1984; Koster, 1989; Pavlostathis y Giraldo-Gomez, 1991)..... 30
- Figura 2.2. Esquema del proceso de digestión anaerobia en dos etapas para la obtención de hidrógeno y metano a partir de biorresiduos..... 30
- Figura 2.3. Esquema de las principales rutas de fermentación de glucosa implicadas en la producción de hidrógeno de *Clostridium butyricum* (modificado de Chen et al., 2006; Angenent et al., 2004)..... 35
- Figura 2.4. Rutas de formación de butano, acetona e isopropanol a partir del acetil-CoA (Stainer et al., 1992)..... 36
- Figura 2.5. Esquema de las principales rutas de fermentación de glucosa implicadas en la producción de hidrógeno de *Escherichia coli* (Parés y Juárez, 1997; Rodríguez y Roldán, 2005; Turcot 2008)..... 38
- Figura 2.6. Rutas de formación de 2,3-Butanodiol a partir del piruvato (Parés y Juárez, 1997) ..... 39

Figura 2.7. Esquema de la reacción de Stickland de la Alanina y la Glicocola. (Stainer et al., 1992; Prescott et al., 2002).....	40
Figura 2.8. Esquema general de la degradación de la celulosa (modificado de Dumitriu, 2005) .....	43
Figura 2.9. Esquema general de trabajo.....	55

### CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Fotografías de los residuos de comida A1 (a) y los inóculos utilizados (b) lodo digerido, (c) pellets de biosólido.....	70
Figura 3.2. Fotografía de la planta piloto para la producción de hidrógeno y metano. ....	72
Figura 3.3. Esquema de los componentes de la planta piloto .....	72
Figura 3.4. Esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo de gases.....	79
Figura 3.5. Esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución .....	82
Figura 3.6. Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	87
Figura 3.7. Esquema del programa PCR utilizado ( $T_A$ es la temperatura de hibridación que disminuye 1°C cada dos ciclos) .....	89
Figura 3.8. Fotografía en el momento en que el peine es colocado en el gel.....	92
Figura 3.9. Fotografía del equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Biorad®) durante la electroforesis .....	92

### CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Esquema de los reactores utilizados en los ensayos (a) y fotografía de la unidad de membrana KOCH LABCELL-CF1 (b).....	110
Figura 4.2. Volumen de gas acumulado en los sistemas de producción de hidrógeno en discontinuo evaluados a pH 5,0 y 7,0 .....	113

Figura 4.3. Evolución de la producción acumulativa de hidrógeno y su ajuste al modelo de Romero para los sistemas evaluados a pH 5,0 y 7,0.....	114
Figura 4.4. Resultados de ST, SV y DQO para los sistemas de producción de hidrógeno en discontinuo, evaluados a pH 5,0 y 7,0.....	115
Figura 4.5. Concentración final de AGV en los blancos (gráfica a), sistemas a pH 5,0 (gráfica b) y sistemas a pH 7,0 (gráfica c); Acético (Ac); Propiónico (Ppc); Isobutírico (Ibc); Butírico (Bc); Isovalérico (Ivc); Valérico (Vc); Isocaproico (Icp); Caproico (Cpc).....	116
Figura 4.6. Evolución de la concentración de AGV en los sistemas evaluados a 35°C (gráfica a) y a 55°C (gráfica b) .....	120
Figura 4.7. Evolución del ratio B/A y la producción diaria de hidrógeno en los sistemas evaluados a 35°C y a 55°C .....	122
Figura 4.8. Perfiles de bandas obtenidos mediante PCR-DGGE correspondientes a las muestras extraídas de los sistemas mesofílico (A) y termofílico (B).....	124
Figura 4.9. Evolución de la producción específica de hidrógeno en los sistemas con retención de biomasa en régimen termofílico (55°C) y mesofílico (35°C) .....	126
Figura 4.10. Evolución de la concentración de AGV en los sistemas evaluados a 35°C (gráfica a) y a 55°C (gráfica b). .....	130

## CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Diagrama de flujo de los reactores: (A) Reactor operando sin recirculación (WR), (B) Reactor operando con recirculación de sobrenadante metanogénico (MR), (C) Reactor operando con recirculación de permeados obtenidos a partir del efluente metanogénico (MR-1, MR-2 y MR-3). 1.- Alimentación, 2.- Reactor de hidrógeno, 3.- Reactor metanogénico, 4.- Producción de hidrógeno, 5.- Producción de metano, 6.- Efluente del reactor metanogénico, 7.- Recirculación.....	148
Figura 5.2. Fotografía del reactor utilizado para la producción de metano .....	150

Figura 5.3. Evolución del consumo diario de solución alcalina y de la producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ) en los sistemas: WR (a), MR (b), MR-1 (c), MR-2 (d) y MR-3 (e).....	153
Figura 5.4. Evolución de la concentración de AGV en los sistemas: WR (a), MR (b), MR-1 (c), MR-2 (d) y MR-3 (e) .....	162
Figura 5.5. Evolución de la producción diaria de biogás y del contenido de hidrógeno en el gas producido durante la etapa de producción de hidrógeno.....	163
Figura 5.6. Evolución de la concentración de AGV en el reactor de producción de hidrógeno.....	167
Figura 5.7. Evolución de la producción diaria de biogás y del contenido de metano en el gas producido durante la etapa metanogénica.....	172

## CAPÍTULO 6

Figura 6.1. Evolución de la producción diaria de biogás y del contenido de hidrógeno en el biogás para los diferentes TRH evaluados.....	191
Figura 6.2. Valores medios de rendimiento volumétrico de hidrógeno y producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ) obtenidos para los diferentes TRH evaluados. Las medias seguidas por una misma letra no difieren significativamente de acuerdo al Test de Tukey, ( $\alpha=0,05$ ) .....	192
Figura 6.3. Evolución de la concentración de AGV para los diferentes TRH evaluados.....	195
Figura 6.4. Perfiles de bandas obtenidos mediante PCR-DGGE correspondientes a las muestras extraídas de los TRH de 2 y 0,75 días.....	198

## CAPÍTULO 7

Figura 7.1. Esquema del montaje experimental utilizado para la producción de $H_2$ .....	218
Figura 7.2. Evolución del pH y la producción diaria de hidrógeno en los sistemas PB y LS.....	223

Figura 7.3. Evolución de la producción acumulada de hidrógeno en los sistemas PB y LS .....	224
Figura 7.4. Valores iniciales (tras 24 h) y finales (tras 96 h) de ST, SV y DQO para los sistemas LD, PB y LS .....	225
Figura 7.5. Evolución de la concentración de AGV para los diferentes sistemas evaluados. Acético (Ac); Propiónico (Ppc); Isobutírico (Ibc); Butírico (Bc); Isovalérico (Ivc); Valérico (Vc); Isocaproico (Icp); Caproico (Cpc).....	226
Figura 7.6. Evolución de la producción diaria de biogás y del contenido de hidrógeno en el biogás para las diferentes condiciones de operación evaluadas .....	229
Figura 7.7. Evolución de la concentración de AGV para las diferentes condiciones experimentales evaluadas .....	234
Figura 7.8. Correlación entre el rendimiento molar de hidrógeno y el ratio molar ácido butírico/ ácido acético (B/A).....	236



# ÍNDICE DE TABLAS

---

Nº de Página

## CAPÍTULO 1

Tabla 1.1. Objetivos de valorización de la fracción orgánica de los residuos urbanos a partir del año 2012 (Fuente BOE, 2009) .....	9
---	---

## CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. Características químicas del lodo digerido utilizado como inóculo .....	66
Tabla 3.2. Analítica general de las mezclas de comida utilizadas como alimentación .....	68
Tabla 3.3. Características del lactosuero (LS) utilizado .....	69
Tabla 3.4. Reactivos utilizados en la PCR (volumen final 50 µL) .....	88
Tabla 3.5. Composición de las soluciones stock de acrilamida al 8% necesarias para preparar los geles desnaturalizantes .....	91
Tabla 3.6. Composición de las soluciones al 40% y al 60% de sustancias desnaturalizantes .....	91

## CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. Denominación de los sistemas en el ensayo en discontinuo .....	107
Tabla 4.2. Analítica general de las alimentaciones utilizadas: A1a (con un contenido aproximado de 3% ST) y A1b (con un contenido aproximado de 0,5% ST) .....	111
Tabla 4.3. Parámetros de rendimiento de los sistemas evaluados en régimen mesofílico (M) y en régimen termofílico (T) .....	118
Tabla 4.4. Resultados de la secuenciación correspondiente a las bandas extraídas .....	124

Tabla 4.5. Parámetros medios de rendimiento de los reactores con acumulación de biomasa evaluados a 35°C (Rm) y a 55°C (Rt).....	128
--	-----

## CAPÍTULO 5

Tabla 5.1. Características de las membranas utilizadas.....	146
Tabla 5.2. Principales características del sobrenadante digerido y de los permeados.....	147
Tabla 5.3. Valores medios de los parámetros de rendimiento de los sistemas evaluados.....	158
Tabla 5.4. Valores medios de los parámetros de rendimiento del sistema de producción de hidrógeno sin adición de sobrenadante digerido y con adición de sobrenadante digerido.....	165
Tabla 5.5. Valores medios de los parámetros de rendimiento del sistema de producción de metano.....	173

## CAPÍTULO 6

Tabla 6.1. Valores medios de los parámetros de rendimiento de los sistemas evaluados.....	191
Tabla 6.2. Resultados de la secuenciación correspondiente a las bandas extraídas.....	199

## CAPÍTULO 7

Tabla 7.1. Características de la alimentación utilizada.....	215
Tabla 7.2. Descripción de los sistemas en el ensayo en discontinuo.....	216
Tabla 7.3. Valores medios de los parámetros de rendimiento de los sistemas evaluados.....	232

## ANEXOS

Tabla A.1. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los datos de producción acumulativa de gas (mL) obtenidos en los sistemas que trabajaron a un mismo pH y con diferente masa de inóculo (4 , 8 y 12 gramos).....	253
Tabla A.2. Resultados del ajuste de los datos experimentales de producción de hidrógeno a la ecuación de Romero (4.2).....	254
Tabla A.3. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los datos de producción acumulativa de hidrógeno (mL) obtenidos en los sistemas que trabajaron a diferente pH.....	254
Tabla A.4. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los datos de consumo diario de solución alcalina (mL/d) obtenidos en los sistemas WR, MR, MR-1, MR-2 y MR-3 .....	255
Tabla A.5. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los datos de producción específica de hidrógeno (mL H <sub>2</sub> / g SV alimentado) obtenidos en los sistemas WR, MR, MR-1, MR-2 y MR-3 .....	256
Tabla A.6. Resultados del test de separación de medias de Tukey para comparar entre que sistemas existen diferencias significativas en el consumo diario de solución alcalina (mL/d) a un nivel de significación del 95% ( $\alpha=0,05$ ).....	256
Tabla A.7. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los rendimientos volumétricos de hidrógeno (L H <sub>2</sub> /Lreactor*d) obtenidos para cada TRH .....	257
Tabla A.8. Resultados del test de separación de medias de Tukey para comparar entre que TRH existen diferencias significativas en el rendimiento volumétrico de hidrógeno (H <sub>2</sub> /Lreactor*d) a un nivel de significación del 95% ( $\alpha=0,05$ ).....	257
Tabla A.9. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los rendimientos volumétricos de hidrógeno (L H <sub>2</sub> /Lreactor*d) obtenidos para cada TRH .....	258

Tabla A.10. Resultados del test de separación de medias de Tukey para comparar entre que TRH existen diferencias significativas en el rendimiento volumétrico de hidrógeno ( $H_2/L_{\text{reactor}} \cdot d$ ) a un nivel de significación del 95% ( $\alpha=0,05$ ).....	258
--	-----





El uso de residuos como sustrato en el proceso de producción de hidrógeno permite de forma simultánea la reducción de los problemas de contaminación del medio ambiente asociados a la eliminación incontrolada de la materia orgánica y la producción de un combustible alternativo limpio. A este respecto, la producción de hidrógeno a través de la fermentación oscura tiene ventajas sobre otros procesos debido a su capacidad para producir hidrógeno de forma continua desde una amplia variedad de residuos. Entre ellos, la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) y algunas aguas residuales de la industria alimentaria como el lactosuero, constituyen, en un principio, un sustrato óptimo para la producción fermentativa de hidrógeno debido a su disponibilidad, alto potencial energético y biodegradabilidad. Sin embargo, para lograr el tratamiento completo de los residuos es necesario acoplar una segunda etapa metanogénica que permita la producción simultánea de hidrógeno y metano en dos fases y la estabilización de los biosólidos.

En este trabajo fue estudiada la primera etapa del proceso de fermentación en dos fases para el tratamiento de residuos de comida y lactosuero, destinada a la recuperación de hidrógeno. Los principales obstáculos para la aplicación práctica de esta tecnología fueron fijados y posteriormente fueron estudiadas diferentes alternativas orientadas a solventar dichas limitaciones. Una de ellas es la necesidad de incluir una etapa de pre-tratamiento para la generación de la microflora productora de hidrógeno, debido a los costes asociados y a la posible proliferación de nuevos microorganismos metanogénicos cuando son utilizados sustratos no estériles. En este trabajo fue planteado el uso de pellets de biosólidos producidos a partir de lodos de aguas residuales municipales digeridos anaeróbicamente como fuente de inóculo. También fue estudiada la fermentación sin inoculación aprovechando la microflora indígena presente en el lactosuero. Los resultados sugieren que las mencionadas microfloras puede ser utilizadas para producir hidrógeno sin la aplicación de una etapa de pre-tratamiento al material

utilizado como fuente de inóculo. De forma simultánea, la población microbiana implicada en la producción de hidrógeno fue identificada utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante.

Otra limitación es la necesidad de adicionar de forma continua alcalinidad al reactor para mantener el pH dentro del intervalo deseado, ya que un pH bajo puede inhibir a los microorganismos productores de hidrógeno. La reducción de la cantidad de álcali necesaria estará reflejada en la reducción de los costes de operación del proceso. La opción propuesta en este trabajo para reducir estos requerimientos fue incorporar, en el proceso de fermentación en dos etapas, una corriente de recirculación de alta alcalinidad procedente del reactor metanogénico al reactor de hidrógeno. En los ensayos fue recirculado sobrenadante metanogénico y fueron evaluados el rendimiento de hidrógeno y el consumo de álcali a escala de laboratorio para los casos de no-recirculación, recirculación directa y de recirculación pre-tratada en una unidad de filtración con membranas de ultrafiltración y nanofiltración. En base a los resultados de estos ensayos fue diseñado un estudio a escala piloto para valorar el efecto de la adición de sobrenadante metanogénico al reactor de hidrógeno. Los resultados indicaron que la adición de sobrenadante metanogénico redujo significativamente los requerimientos de álcali y que las condiciones de operación del reactor fueron adecuadas para reducir la actividad de los microorganismos metanogénicos viables retornados durante la recirculación. En este estudio también fue evaluada a escala piloto la etapa metanogénica del proceso de fermentación en dos fases.

Otras de las principales desventajas del proceso son los bajos rendimientos y tasas de producción de hidrógeno. Por este motivo, y dado que existe una fuerte dependencia entre el rendimiento de las poblaciones microbianas y las condiciones de operación que rigen el proceso tales como el pH y el tiempo de retención hidráulico (THR), fue evaluado el efecto del TRH sobre el rendimiento del proceso utilizando residuos de comida y lactosuero como sustrato. Los rendimientos de hidrógeno estuvieron muy afectados por las modificaciones en el TRH y una disminución de este parámetro aumentó el rendimiento volumétrico de hidrógeno y disminuyó la producción específica de hidrógeno.

# ABSTRACT

---

The process of hydrogen production may simultaneously reduce environmental pollution associated to uncontrolled disposal of organic matter and produce a clean alternative fuel when wastes are used as substrates. In this same line, the production of hydrogen by the dark fermentation process offers as main advantage the capacity of continuous production from a variety of wastes. Among these, the organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) and some food industry wastewaters, such as cheese whey, are optimal substrates due to their easy availability, high energy potential and biodegradability. However, in order to achieve the complete treatment of wastes it is necessary to couple a second methanogenic stage which would allow the simultaneous production of hydrogen and methane along with the stabilization of the organic matter.

In this work, the fermentation process for the recovery of hydrogen was studied using as substrates food waste and cheese whey. The main obstacles for the practical application of this technology were identified and subsequently various alternatives that seek to address these limitations were studied. One of these was the need of a pre-treatment for generating the hydrogen producing microflora which is associated with high operating costs and proliferation methanogens when non-sterile conditions are used. The use of biosolid pellets was proposed as a source of inoculum. These pellets were obtained from municipal wastewater water sludge anaerobically digested. Another approach also studied was to proceed with the fermentation in absence of inoculation taking advantage of the indigenous microflora found within cheese whey. Results suggested that the microflora aforementioned can be used to produce hydrogen without applying any pre-treatment to the inoculum source. In addition, the microbial population involved in the production of hydrogen was identified using the polymerase chain reaction coupled with denaturing gradient gel electrophoresis.

The second limitation was the continuous need of adding alkalinity to the reactor to maintain the pH within a desired range, as a low pH is known to inhibit

hydrogen producing microorganisms. Reducing the amount of alkali will bring as consequence the decrease in operating costs. The option proposed in this work was the use of a recycling stream when working under a two stages configuration. That is, a recycling stream of high alkalinity from the methanogenic reactor back to the hydrogen producing reactor. Experiments were carried out recirculating methanogenic supernatant under three different conditions: direct recycling and recycling of supernatant which had been previously subjected to a filtration unit using ultrafiltration membranes in one instance and nanofiltration membranes in the other. Assessment of hydrogen yield and alkali consumption was performed by comparison with the no-recycling set-up. Based on results obtained from these tests a pilot scale study was performed for evaluating the effect of the methanogenic supernatant at larger scale. Results indicated that the addition of methanogenic supernatant significantly reduced alkali requirements while no affecting reactor performance severely thus indicating that operating conditions applied to the hydrogen reactor were adequate to reduce the effect of viable methanogens from the recycling stream. In addition, a no-recycling set-up was also evaluated at pilot scale.

Low hydrogen yields and production rates were the third limitation studied. For this reason and because of the heavy dependence between the performance of microbial populations and process conditions, such as pH and hydraulic retention time (HRT), the effect of this last parameter was evaluated over the performance of the process using food residue and cheese whey as substrate. Hydrogen yields obtained were greatly influenced by modifications in HRT, in this sense; the lower this parameter, the higher the volumetric hydrogen production but the lower the specific hydrogen production.

# LISTA DE ABREVIATURAS

---

## TÉRMINOS GENÉRICOS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosín difosfato
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CSTR</b>	Reactor continuo de mezcla completa (continuous stirred tank reactor)
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleótidos trifosfatos
<b>e<sup>-</sup></b>	Electrones
<b>EDAR</b>	Estación depuradora de aguas residuales
<b>Fd</b>	Ferredoxina
<b>Fd(red)</b>	Ferredoxina reducida
<b>FHL</b>	Sistema formiato-hidrogeno-liasa
<b>MBR</b>	Biorreactor de membrana (membrane bioreactor)
<b>MEC</b>	Celda electrolítica microbiana (microbial electrolysis cell)
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
<b>PER</b>	Plan de las Energías Renovables
<b>PFL</b>	Sistema piruvato-formiato-liasa
<b>PFOR</b>	Sistema piruvato-ferredoxina-óxido-reductasa
<b>PNIR</b>	Plan Nacional Integrado de Residuos
<b>PNRU</b>	Plan Nacional de Residuos Urbanos
<b>PNS</b>	Bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas
<b>UASB</b>	Reactor anaerobio de flujo ascendente (upflow anaerobic sludge blanket)
<b>WGS</b>	Reacción de water gas shift
<b>Δp</b>	Fuerza motriz de protones

## ***TÉRMINOS DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA***

<b>A1</b>	Mezcla de frutas y verduras
<b>A2</b>	Mezcla de frutas, verduras, pan, carne y pescado
<b>AGCL</b>	Ácidos grasos de cadena larga (mg/L)
<b>AGV</b>	Ácidos grasos volátiles (mg/L)
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>B/A</b>	Ratio ácido butírico/ácido acético
<b>bs</b>	Base seca
<b>C</b>	Citosina
<b>C/N</b>	Relación carbono/nitrógeno
<b>CO</b>	Carga orgánica
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (denaturing gradient gel electrophoresis)
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno (mg O <sub>2</sub> /L)
<b>DQOs</b>	Demanda química de oxígeno soluble (mg O <sub>2</sub> /L)
<b>DBO</b>	Demanda biológica de oxígeno (mg O <sub>2</sub> /L)
<b>FID</b>	Detector de ionización de llama (flame ionization detector)
<b>F/M</b>	Ratio Alimentación/Microorganismos
<b>FORSU</b>	Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos
<b>G</b>	Guanina
<b>GC</b>	Cromatografía gaseosa (gas chromatography analysis)
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución (high-performance liquid chromatography)
<b>LD</b>	Lodo digerido
<b>LS</b>	Lactosuero
<b>NF</b>	Nanofiltración
<b>ORP</b>	Potencial de óxido reducción (oxidation reduction potential, Voltios)
<b>PB</b>	Pellets de biosólido
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction)
<b>PFPD</b>	Detector fotométrico de llama pulsada (pulsed flame photometric detector)
<b>PpH<sub>2</sub></b>	Presión parcial de hidrógeno (atm)

<b>PEG</b>	Producción específica acumulada de gas (mL gas/g SV <sub>alimentado</sub> )
<b>P</b>	Producción acumulativa de hidrógeno (mL)
<b>P<sub>max</sub></b>	Máxima producción de hidrogeno acumulada (mL)
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>SH<sub>2</sub>P</b>	Producción específica de hidrógeno (specific hydrogen production, mL H <sub>2</sub> /g SV <sub>alimentado</sub> )
<b>SMP</b>	Producción específica de metano (specific methane production, L CH <sub>4</sub> /kg SV <sub>alimentado</sub> )
<b>ST</b>	Sólidos totales (g/L)
<b>SV</b>	Sólidos volátiles (g/L)
<b>t</b>	Tiempo (h)
<b>T<sub>A</sub></b>	Temperatura de hibridación (°C)
<b>TAE</b>	Tampón tris-acetato-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
<b>TCD</b>	Detector de conductividad térmica (thermal conductivity detector)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
<b>TRC</b>	Tiempo de retención celular (d)
<b>TRH</b>	Tiempo de retención hidráulico (d)
<b>TRS</b>	Tiempo de retención de sólidos (d)
<b>UF</b>	Ultrafiltración
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VCO</b>	Velocidad de carga orgánica (gSV <sub>alimentado</sub> /L <sub>reactor</sub> *d; gDQO/L <sub>reactor</sub> *d)
<b>V<sub>reactor</sub></b>	Volumen del reactor (L <sub>reactor</sub> )
<b>μ<sub>max</sub></b>	Máxima velocidad de crecimiento de los microorganismos (h <sup>-1</sup> )







## *1. INTRODUCCIÓN*

---

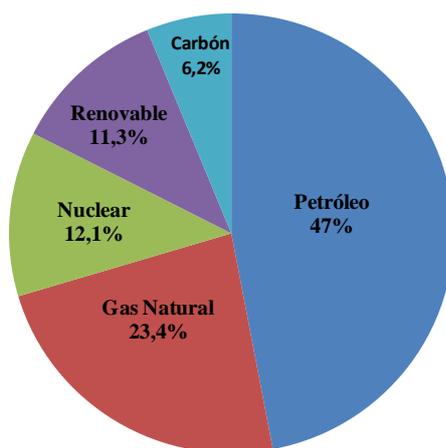


## **1.1. PLANTEAMIENTO DE LA SITUACIÓN ACTUAL.**

### ***1.1.1. Contexto energético en España.***

La energía constituye el motor básico que impulsa el desarrollo económico mundial, contribuyendo a garantizar el mantenimiento del modelo del Estado del Bienestar. Su función insustituible explica la continua y creciente demanda de recursos energéticos. En España el consumo total de energía primaria en el año 2009 fue un 55,9% superior al de 1990, y un 13,1% superior al de 2000, debido al crecimiento de la economía española en las dos últimas décadas. Esto ha supuesto un aumento medio anual del consumo total de energía primaria del 4,2%, a pesar del descenso en dicho consumo durante los años 2008 y 2009 debido a la actual crisis económica (Cátedra BP de Energía y Sostenibilidad de la Universidad Pontificia de Comilla, 2010).

La estructura actual de consumo de energía primaria en España, representada en la figura 1.1, está dominada por la presencia del petróleo y del gas natural, importados en su mayoría del exterior. Esto unido a la reducida aportación de recursos energéticos autóctonos (prácticamente centrada en los recursos energéticos renovables, en la producción nuclear y en la pequeña contribución del carbón nacional) da lugar a una elevada dependencia energética del exterior, cercana al 80%. Esta situación está experimentando un cierto cambio desde el año 2005, en el marco de las políticas actuales en materia de energías renovables y de eficiencia energética. Así, en términos de consumo de energía primaria, las energías renovables han pasado de cubrir una cuota del 6,3% en 2004 a alcanzar el 11,3% en 2010. Esto supone una contribución de las energías renovables sobre el consumo final bruto de energía en 2010 de 13,2% (MINETUR, 2013). La elaboración del Plan de Energías Renovables de España (PER) 2011-2020 plantea consolidar y mejorar esta situación hasta cumplir el objetivo de la Directiva 2009/28/CE relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. Dicha Directiva fija como objetivo general para los Estados miembros alcanzar en 2020 una cuota del 20% de energía procedente de fuentes renovables en el consumo final bruto de energía (el valor recogido en el PER 2011-2020 plantea una contribución en España de 20,8%).



**Figura 1.1. Estructura energética española en el año 2010 en términos de consumo de energía primaria (Fuente IDAE, 2011).**

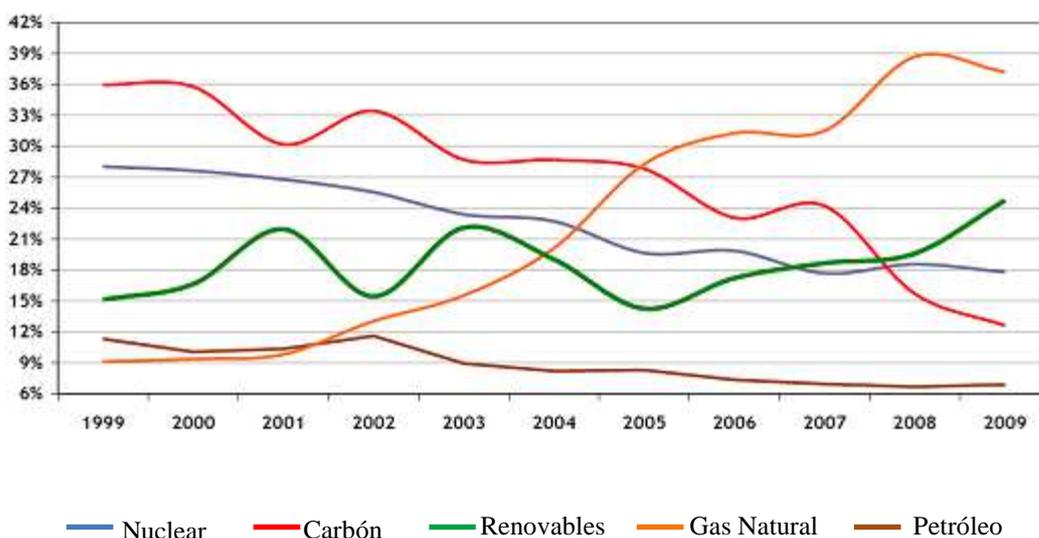
Atendiendo a la distribución sectorial del consumo de energía final, es el sector transporte el mayor consumidor, con el 40% del consumo final total en 2010. Le sigue en orden de importancia, el sector industria y el sector usos diversos (residencial, servicios y agricultura), ambos con un 30% del consumo.

El consumo de energía en el sector transporte está basado principalmente en productos petrolíferos, lo que en gran parte determina la elevada dependencia energética nacional y un fuerte impacto ambiental. Por otro lado, el consumo de electricidad para transporte crece a medida que lo hace el tráfico por ferrocarril, y el consumo de biocombustibles (biodiesel y bioetanol) ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años, pasando de las 136.000 toneladas en el año 2005 a 1,046 millones de toneladas en 2009, lo que representa un incremento del 669% (Torres y Carrera Consultores de Comunicación, 2010).

La importancia del transporte como sector económico y su peso en el consumo energético y en las emisiones lo constituyen como uno de los ejes principales de las actuales políticas para alcanzar los objetivos de competitividad, reducción de emisiones de Gases de Efecto Invernadero y seguridad de suministro energético. La Directiva de 2009/28/CE fija como objetivo general para los Estados miembros alcanzar una cuota del 10% de energía procedente de fuentes renovables en el consumo de energía en el sector del transporte para el año 2020. La Comisión Europea, a través de su Dirección General de Transportes y Energía (DGTREN), ha establecido el llamado Alternative Fuels Contact Group para analizar y aconsejar sobre las acciones más eficaces para alcanzar este objetivo. El Alternative Fuels Contact Group ha recomendado repartir este porcentaje entre el gas natural, el biodiesel y bioetanol y el hidrógeno, a los que considera como las únicas opciones técnica y económicamente viables.

Por otro lado, la generación eléctrica nacional ha experimentado una importante transformación desde finales de los años 90, a lo que ha contribuido la progresiva penetración del gas natural (principalmente en centrales de ciclo combinado y en cogeneración) y las energías renovables, cuya cobertura evoluciona al alza. En los últimos diez años, la producción eléctrica de origen renovable ha experimentado un incremento superior al 40%, alcanzando en el año

2010 el 32,3% de la producción eléctrica bruta de España (aproximándose a la contribución del gas natural situada en el 32%). Esta situación ha dado lugar a una pérdida de peso de otras fuentes energéticas como el carbón, el petróleo y la nuclear, llegando la producción eléctrica de origen renovable a superar de manera sostenida a la producción nuclear, con posterioridad al año 2006, y superando también en los últimos años a la producción con carbón. En la figura 1.2 está representada la evolución de la participación de las distintas fuentes de energía en la generación eléctrica durante el periodo 1999-2009 (MINETUR, 2013).



**Figura 1.2. Participación de las distintas fuentes de energía en la generación eléctrica (Fuente MINETUR, 2013).**

El análisis de la participación de las energías renovables por fuentes en el consumo final bruto de energía en España en el año 2010 sitúa la biomasa y residuos con el mayor porcentaje de participación (4,2%), seguida de la eólica (3,8%), la hidráulica (2,8%), los biocombustibles (1,5%), la solar (0,8%), y la geotérmica (0,02%). Respecto a la producción de electricidad, en España la producción eléctrica renovable fue aportada mayoritariamente por la energía eólica (15%) y por la energía hidroeléctrica (14,5%), seguida de la energía fotovoltaica (2,2%), la biomasa y residuos (1,4%) y la termoeléctrica (0,2%) (IDAE, 2011).

Entre las consecuencias más relevantes del presente escenario energético están la reducción de la dependencia energética, la sostenibilidad de sus fuentes y la reducción de las emisiones contaminantes. En relación a la reducción de las emisiones contaminantes, según la Agencia Internacional de la Energía, para alcanzar el escenario 450 ppm (que es el necesario para limitar el incremento de la temperatura global por debajo de 2 °C y que plantea una reducción de las emisiones globales de Gases de Efecto Invernadero en 2050 cercana al 50% frente al año 1990) las energías renovables son un instrumento prioritario responsable de casi un 20% de la reducción de emisiones. Por ello, las energías renovables son consideradas un elemento crucial para luchar contra el cambio climático (AIE, 2009).

### ***1.1.2. La gestión de los residuos biodegradables y su uso energético.***

Las sinergias entre la política europea energética y la política de gestión y eliminación de residuos favorecen que la utilización energética de los residuos contribuya al mix energético español.

La Directiva de 2009/28/CE relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables, define *biomasa* como “la fracción biodegradable de los productos, desechos y residuos de origen biológico procedentes de actividades agrarias (incluidas las sustancias de origen vegetal y de origen animal), de la silvicultura y de las industrias conexas, incluidas la pesca y la acuicultura, así como la fracción biodegradable de los residuos industriales y municipales”. Según esta definición la fracción biodegradable de los residuos, junto con el resto de fuentes de energía renovables, debe ser considerada a la hora de alcanzar los objetivos de contribución de las energías renovables en el mix energético nacional en el año 2020.

Por otro lado, la Directiva 2008/98/CE sobre los residuos (Directiva Marco de Residuos) establece que los Estados miembros deben adoptar medidas para tratar los residuos de conformidad con la siguiente jerarquía de prioridades:

- 1) Prevención en la generación de residuos;
- 2) Preparación para la reutilización;
- 3) Reciclado;
- 4) Otro tipo de valorización, por ejemplo, la valorización energética; y
- 5) Eliminación.

Por lo tanto, la valorización de residuos es una operación de gestión de los residuos prioritaria frente a operaciones de eliminación (como el depósito de los residuos en vertedero) y relevante a la hora de alcanzar los objetivos de desvío de vertedero de los residuos biodegradables. La Directiva 1999/31/CE relativa al vertido de residuos, traspuesta a la legislación española mediante el Real Decreto 1481/2001 de 27 de diciembre, define *residuo biodegradable* como “todos los residuos que, en condiciones de vertido, pueden descomponerse de forma aerobia o anaerobia, tales como residuos de alimentos y de jardín, el papel y el cartón”. Dicha Directiva fija como objetivo general que en el año 2016 la cantidad total (en peso) de residuos urbanos biodegradables destinados a vertedero no superará el 35% de la cantidad de residuos urbanos biodegradables generados en 1995 (lo que supone no superar 4 176 950 toneladas).

Actualmente en España los tratamientos biológicos (compostaje y digestión anaerobia) de los residuos urbanos biodegradables son la opción más utilizada para desviar los residuos biodegradables de los vertederos. Así, la Estrategia Nacional para la reducción de residuos biodegradables en vertedero, incluida en el II Plan Nacional Integral de Residuos (PNIR) 2008-2015, está centrada principalmente en los residuos urbanos, de forma que sirva para verificar el cumplimiento de los objetivos de reducción incluidos en el Real Decreto 1481/2001. Dicha Estrategia, a los efectos del cumplimiento de estos objetivos, considera como *residuo urbano biodegradable* “los residuos de cocina, los residuos de poda de parques, jardines, etc., el papel y cartón, la madera y ciertos residuos textiles”. Dentro de las medidas a desarrollar en aplicación de esta

Estrategia destaca el impulso a la implantación de la recogida selectiva de la fracción orgánica contemplando la disminución en un 70% (en peso) del vertido de materia orgánica biodegradable a partir del año 2015. A su vez, el II Plan Nacional de Residuos Urbanos (PNRU) 2008-2015 contempla medidas respecto a la valorización de la fracción orgánica para el año 2012. En la tabla 1.1 están recogidos los objetivos concretos para los sistemas mayoritarios en el tratamiento de la fracción orgánica (compostaje y digestión anaerobia).

**Tabla 1.1. Objetivos de valorización de la fracción orgánica de los residuos urbanos a partir del año 2012 (Fuente BOE, 2009).**

TRATAMIENTO	Con recogida selectiva <sup>1</sup>	Sin recogida selectiva <sup>2</sup>
Compostaje	50%	30%
Biometanización y otras técnicas similares	10%	

<sup>1</sup> Procedente de recogida selectiva de la fracción orgánica de residuos urbanos y de residuos verdes.

<sup>2</sup> Procedente de residuos urbanos sin recogida selectiva de la fracción orgánica.

Esta tendencia de desvío de vertedero de los residuos biodegradables promovida a nivel europeo, está refrendada por la Directiva Marco sobre Residuos (DOUE, 2008). Dicha Directiva define el concepto de *biorresiduo* como “residuo biodegradable de jardines y parques, residuos alimenticios y de cocina procedentes de hogares, restaurantes, servicios de restauración colectiva y establecimientos de consumo al por menor, y residuos comparables procedentes de plantas de procesado de alimentos”, y promueve su desvío del vertedero. La Ley de residuos y suelos contaminados (BOE, 2011), que traspone la Directiva 2008/98/CE al marco legislativo español, establece la recogida separada de biorresiduos con vistas al compostaje o la digestión anaerobia de los mismos. Esta normativa establece diversas opciones de recogida selectiva para cumplir con los objetivos establecidos: el compostaje doméstico, la recogida separada de la fracción vegetal, la recogida en grandes generadores y la recogida de la fracción

orgánica de los residuos domésticos. Además, antes del año 2020 deberá aumentar, en conjunto y como mínimo, hasta un 50% en peso la cantidad de residuos domésticos y comerciales destinados a la preparación para la reutilización y el reciclado para las fracciones de papel, metales, biorresiduos, plástico, vidrio u otras fracciones reciclables. A este respecto, el tratamiento biológico de los biorresiduos (compostaje y digestión anaerobia) es considerado como reciclado cuando el producto final (compost o digestato) es aplicado al suelo o utilizado para la producción de sustratos de cultivo. En caso contrario, es considerado como pretratamiento antes del depósito en vertederos o la incineración. Estos tratamientos obtienen diferentes calidades del producto final en función del sistema de recogida de la fracción orgánica (selectiva o mezclada, en esta última la fracción orgánica está incluida en la fracción resto).

En la actualidad, el compostaje es la opción de tratamiento biológico más común, y es el más adecuado para residuos verdes y material leñoso. La digestión anaerobia es especialmente adecuada para el tratamiento de biorresiduos húmedos, incluidas las grasas (por ejemplo, residuos de cocina). Produce una mezcla de gases (principalmente metano y dióxido de carbono) en reactores controlados. El biogás puede ser utilizado como combustible para el transporte o puede ser inyectado directamente en la red de distribución de gas, lo cual permite considerar este tratamiento biológico como recuperación de energía. El residuo del proceso, el digestato, puede ser compostado y ser utilizado para fines similares como compost, mejorando así la recuperación global de los recursos incluidos en los residuos (Comisión Europea, 2008).

Por otro lado, el tratamiento biomecánico describe las técnicas que combinan el tratamiento biológico con el tratamiento mecánico (clasificación). Este tratamiento es utilizado como pretratamiento de residuos mezclados con objeto de producir un material más estable para los vertederos o un producto con mejores propiedades de combustión. No obstante, el tratamiento biomecánico que utiliza la digestión anaerobia genera biogás y, por tanto, puede constituir asimismo un proceso de recuperación de energía. Los residuos combustibles separados en el proceso de tratamiento biomecánico pueden ser incinerados dado su potencial de recuperación energética.

Otra de las opciones de gestión de los biorresiduos es la incineración, así los biorresiduos son incinerados normalmente como parte de los residuos sólidos urbanos. Según su eficiencia energética, la incineración puede ser considerada recuperación de energía o eliminación (DOUE, 2008).

No existe una solución única para la gestión de los residuos biodegradables no depositados en vertederos. El equilibrio medioambiental de las distintas opciones disponibles para la gestión de este tipo de residuos depende de varios factores locales, en particular de los sistemas de recogida, la composición y la calidad de los residuos, y el potencial de utilización de los diversos productos derivados de los residuos, como electricidad, calor, biogás o compost.

Respecto a los sistemas de recogida selectiva, funcionan con éxito en muchos países, sobre todo para los residuos verdes. Los residuos de cocina son recogidos y tratados más a menudo como parte de los residuos sólidos urbanos mezclados. Entre las ventajas de la recogida selectiva figuran las siguientes: desviar los residuos fácilmente biodegradables de los vertederos, aumentar el poder calorífico de los residuos sólidos urbanos restantes y generar una fracción de biorresiduos más limpia que permita producir compost de alta calidad y facilite la producción de biogás (Comisión Europea, 2008). Sin embargo, la recogida selectiva de biorresiduos también sirve de apoyo a otras formas de reciclado y recuperación de energía que enlazan con la política energética actual que apoya firmemente la utilización de todo tipo de biomasa, incluidos los biorresiduos para fines energéticos. Entre las diferentes opciones está la producción biológica de hidrógeno por bacterias fermentativas en un proceso en dos fases que permite el tratamiento global de los residuos. Este proceso comprende una primera etapa (sistema de fermentación) para producir hidrógeno y una segunda etapa (sistema de digestión) para producir metano y un digerido estable con un contenido reducido en materia orgánica que puede ser compostado y ser utilizado para fines similares como compost, mejorando así la recuperación global de los recursos incluidos en los residuos (Gómez et al., 2006).

### ***1.1.3. Valorización de subproductos de la industria agroalimentaria: el lactosuero.***

La industria alimentaria persiguiendo su desarrollo sostenible está aplicando cada vez más medidas para la mejora de su impacto ambiental, entre las que está la valorización de subproductos. Algunas de las tecnologías que apoyan la evolución de esta tendencia más sostenible son las tecnologías de membranas y los tratamientos biológicos. Un ejemplo de aplicación es el tratamiento del lactosuero que es descrito a continuación.

El suero lácteo o lactosuero es el líquido resultante de la coagulación de la leche, una vez que la cuajada, la caseína y la grasa son separadas. Por cada kilogramo de queso son producidos 9 kilogramos de lactosuero, el cual representa en torno al 90% del volumen de la leche y contiene más de la mitad de sus nutrientes (Parra, 2010). Es un subproducto de alto valor nutritivo que contiene compuestos hidrosolubles como proteínas, lactosa, vitaminas y sales minerales. Este gran contenido en nutrientes provoca que el lactosuero presente una demanda biológica de oxígeno ( $DBO_5$ ) y una demanda química de oxígeno (DQO), con valores de 40000–60000 mg/l y 50000–80000 mg/l, respectivamente. Además, más del 90% de la demanda biológica de oxígeno ( $DBO_5$ ) es debida a la lactosa. Por todo ello el vertido del lactosuero provoca graves alteraciones en cauces y terrenos siendo necesario su procesamiento (Gekas y López-Leiva, 1985). La normativa medioambiental no permite el vertido del lactosuero (Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio) y exige su gestión, bien tratándolo y reutilizándolo en las instalaciones, o bien entregando el suero a una empresa para su empleo o transformación.

Las proteínas del suero suponen en torno al 20% de las proteínas totales aportadas por la leche y están caracterizadas por sus propiedades biológicas y funcionales. Además, el lactosuero es rico en vitaminas B y C y en lactosa (Parra, 2010). Las industrias han incrementado su interés por aprovechar y reutilizar estos nutrientes y como consecuencia de ello han sido desarrolladas y mejoradas diversas técnicas de separación, una de las más importantes es la ultrafiltración. Durante la ultrafiltración del lactosuero los glóbulos grasos, las caseínas en forma

micelar y las proteínas del lactosuero quedan retenidas y agrupadas dando lugar a un concentrado. Estos concentrados proteicos son empleados para la estandarización de las leches de quesería y en la industria de segunda transformación por sus propiedades nutritivas y funcionales. Durante esta circulación las sustancias de un tamaño menor al tamaño de poro de la membrana como son el agua, las sales minerales, la lactosa, los ácidos orgánicos y los péptidos, atraviesan dicha membrana dando lugar a un permeado. Dicho permeado presenta todavía una elevada demanda química de oxígeno (DQO) debido a su contenido en lactosa, por lo que la separación no es la solución al problema, sino una forma de rentabilizar un subproducto.

Por lo tanto, la industria productora de queso ha de realizar un tratamiento al permeado de ultrafiltración generado. Por su alta DQO, normalmente es sometido a secado o a cristalización para obtener lactosa de una determinada pureza. Esta alternativa, no proporciona un gran beneficio económico, sino todo lo contrario, inversiones para la construcción de una instalación adicional a la planta, para su operación y mantenimiento, etc., ya que el mercado de la lactosa o suero desecado, sufre importantes variaciones en función del volumen del producto ofertado.

A su vez, en algunas industrias utilizan la osmosis inversa para pre-concentrar el permeado obtenido en la ultrafiltración para posteriormente recuperar la lactosa por cristalización (Moya, 1995). Sin embargo, si no es sometido a una desmineralización previa, parte de la lactosa (entre el 20 y el 40%) es eliminada con las aguas madres de cristalización, efluente sin uso industrial por su alto contenido en sales. Los procedimientos que son utilizados para la desmineralización son la electrodiálisis, el intercambio iónico y la filtración por geles. Todos estos procesos rinden un producto rico en proteínas, lactosa y vitaminas, que es apto para el consumo animal y humano (Moya, 1995).

Dado el problema que plantea el aprovechamiento económico del lactosuero y la contaminación que implica su vertido sin tratamiento, su conversión biológica es una opción que está cobrando interés en la actualidad. Así, cuando el lactosuero es sometido a fermentación por microorganismos

seleccionados en las condiciones apropiadas, es eliminada su carga orgánica y es obtenido un producto final con cierto valor en el mercado. Además, el aprovechamiento biológico puede partir de lactosueros sometidos de forma previa a otros tratamientos tales como: el líquido madre sobrante de la cristalización de la lactosa o el permeado obtenido tras el aprovechamiento proteico del suero (Moya, 1995). Una alternativa consiste es valorizar el suero lácteo mediante la obtención de energía sometiéndolo a un proceso de digestión anaerobia (Ergüder et al., 2001; Parra, 2010). Sin embargo, el lactosuero es bastante problemático para ser tratado anaerobiamente, debido a su baja alcalinidad, alta demanda química de oxígeno (DQO) y su tendencia a acidificarse muy rápidamente (Malaspina et al., 1996). Por ello es necesario utilizar un suplemento de alcalinidad a fin de evitar la acidificación y el posterior fallo en el proceso anaeróbico (Lo y Liao, 1986; Wildenauer y Winter, 1985).

Antonopoulou et al. (2008) sugirió que la separación de la etapa de acidogénesis y la etapa de metanogénesis en un proceso anaerobio en dos fases podría ser una solución alternativa para el tratamiento del lactosuero. Dicho proceso permite la valorización del lactosuero mediante la obtención de energía a través de la producción de hidrógeno en una primera etapa y la producción de metano en una segunda etapa (Venetsaneas et al., 2009).

Cota-Navarro et al. (2011) también estudiaron la viabilidad de la producción integrada de hidrógeno y metano en un proceso en dos etapas utilizando un cultivo mixto y lactosuero en polvo como sustrato. Para ello utilizaron un reactor de mezcla completa para la producción de hidrógeno operando con un TRH de 6 y 3,5 h, y para la producción de metano utilizaron un reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente (UASB) operando con un TRH de 6 h. Dicho proceso recuperó en torno al 70% de la energía presente en el sustrato.

#### **1.1.4. El hidrógeno.**

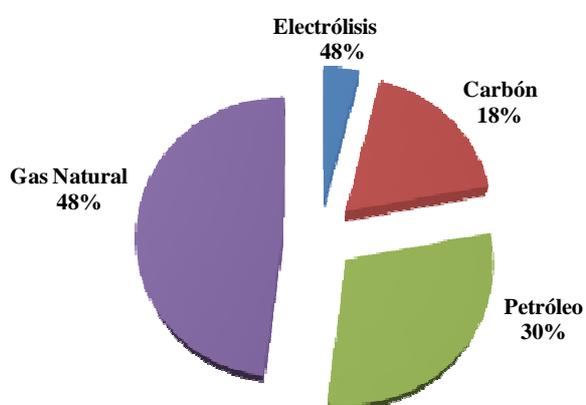
Las actuales preocupaciones con respecto a la disponibilidad a largo plazo de los combustibles fósiles y al calentamiento global debido a las emisiones de gases de efecto invernadero, han dado lugar a la búsqueda de un combustible alternativo. En los últimos años el hidrógeno ha centrado gran parte de la atención. Hay que señalar que el hidrógeno no es una fuente de energía en sí mismo, sino un elemento de “transporte” (un transportador de energía primaria hasta los lugares de consumo) que puede ser utilizado directamente para producir electricidad mediante pilas de combustible, siendo el agua el único producto de su combustión. Por lo tanto, entre las ventajas de su uso está que puede reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, en particular si es utilizado como biocombustible para el transporte.

El hidrógeno tiene una elevada densidad energética en base másica (122 KJ/g, 2,75 veces más alto que los combustibles hidrocarbonados) (Claasen et al., 2005; Kapdan y Kargi, 2006) con lo cual el peso del combustible en tanques de almacenamiento no es elevado. Sin embargo, el hidrógeno tiene una baja densidad energética en base volumétrica (10,37 MJ//Nm<sup>3</sup>) por lo que requiere tanques de almacenamiento grandes o bien almacenarlo en otro estado (líquido o en forma de hidruros metálicos) lo que implica una tecnología sofisticada y costosa (Laborde y Rubiera, 2010).

Debido a su alto contenido energético (en base másica) ha sido considerado como un vector energético alternativo, con importantes ventajas medioambientales y de disponibilidad, sobre los combustibles fósiles tradicionales. Sin embargo, el carácter limpio y no contaminante del hidrógeno como combustible dependerá de la materia prima utilizada para obtenerlo, del proceso y del origen de la energía requerida. La figura 1.3 recoge la distribución actual de la producción de hidrógeno por fuente de energía primaria. El 96% del hidrógeno es obtenido a partir de procesos que tienen como materia prima inicial combustibles fósiles (reformado con vapor de agua, craqueo térmico, oxidación parcial de hidrocarburos y gasificación del carbón). La electrólisis del agua contribuye con un 4% permitiendo obtener hidrógeno de alta pureza libre de

óxidos de carbono, pero a un costo actualmente mucho más elevado que el del reformado con vapor de hidrocarburos (Laborde y Rubiera, 2010).

Entre otras posibilidades de producción de hidrógeno estudiadas actualmente, destacan la gasificación de biomasa, la separación del agua a través de ciclos termoquímicos empleando calor a altas temperaturas procedente de energía nuclear o solar y la producción biológica con algas o bacterias en condiciones controladas (Comisión Europea, 2009).



**Figura 1.3. Distribución de la producción de hidrógeno por fuente de energía primaria. (Laborde y Rubiera, 2010).**

De este modo, como el hidrógeno puede ser producido a partir de muy diversas fuentes de energía, puede contribuir considerablemente a mejorar la seguridad del suministro de energía. Además, el desarrollo de la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos biodegradables permite promover el uso energético de los residuos y apoyar la transición hacia un modelo energético más sostenible.

## 1.2. BIBLIOGRAFÍA.

A.I.E. (2009). Agencia Internacional de la Energía. How the energy sector can deliver on a climate agreement in Copenhagen. Special early excerpt of the World Energy Outlook 2009 for the Bangkok UNFCCC meeting.

[http://www.iea.org/weo/docs/weo2009/climate\\_change\\_excerpt.pdf](http://www.iea.org/weo/docs/weo2009/climate_change_excerpt.pdf)

Antonopoulou G., Gavala H.N., Skiadas I.V., Angelopoulos K. and Lyberatos G. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 110-119.

B.O.E. (2011). Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. *Boletín Oficial del Estado*, 29 de julio de 2011, 181, pp. 85650-85705.

B.O.E. (2001). Real Decreto 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. *Boletín Oficial del Estado*, 24 de julio de 2001, 176, pp. 26791-26817.

B.O.E. (2002). Real Decreto 1481/2001, de 27 de diciembre, por el que se regula la eliminación de residuos mediante depósito en vertedero. *Boletín Oficial del Estado*, 29 de enero de 2002, 25, pp. 3507-3521.

B.O.E. (2009). Plan Nacional Integrado de Residuos (PNIR) para el período 2008-2015. *Boletín oficial del Estado*, 26 de febrero de 2009, 49, pp.19893-20016.

Cátedra BP de Energía y Sostenibilidad de la Universidad Pontificia de Comilla (2010). Observatorio de Energía y Sostenibilidad en España. Informe basado en indicadores. [http://www.bp.com/liveassets/bp\\_internet/spain/STAGING/home\\_assets/downloads\\_pdf/fs/i/InformeComillas\\_2010.pdf](http://www.bp.com/liveassets/bp_internet/spain/STAGING/home_assets/downloads_pdf/fs/i/InformeComillas_2010.pdf)

Claassen P., Lier B., Contreras A., Sijtsma W., Stams J., Vries S. and Weusthuis R. (2005). Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology Biotechnology*. Vol. 52, pp. 741-755.

Comisión Europea (2008). Libro Verde sobre la gestión de los biorresiduos en la Unión Europea. Comisión de las Comunidades Europeas, 3 de diciembre de 2008, COM(2008) 811 final.

Comisión Europea (2009). La investigación europea en acción. Energía. El Hidrógeno. [http://ec.europa.eu/research/leaflets/h2/index\\_es.html](http://ec.europa.eu/research/leaflets/h2/index_es.html)

Cota-Navarro C.B., Carrillo-Reyes J., Davila-Vazquez G., Alatríste-Mondragón F. y Razo-Flores E. (2011). Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system. *Water Science Technology*. Vol. 64, pp. 367-374.

- D.O.C.E. (1999). Directiva 1999/31/CE del Consejo de 26 de abril de 1999, relativa al vertido de residuos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 16 de julio de 1999, L182. pp. 1-19.
- D.O.U.E. (2008). Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos. Diario Oficial de la Unión Europea, 22 de noviembre de 2008, L313. pp. 3-30.
- D.O.U.E. (2009). Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de abril de 2009, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. Diario Oficial de la Unión Europea, 5 de junio de 2009, L140. pp. 16-62.
- Ergüder T.H., Tezel U., Güven E. and Demirer G.N. (2001). Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. Waste Management. Vol. 21, pp. 643-650.
- Gekas V. and López-Leiva M. (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review. Process Biochemistry. Vol. 20, pp. 2-12.
- Gómez X., Morán A., Cuetos M.J. and Sánchez M.E. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: A two-phase process. Journal of Power Sources. Vol. 157, pp. 727-732.
- I.D.A.E. (2011). Instituto para la Diversificación y Ahorro de Energía. Plan de Energías Renovables de España (PER) 2011-2020.  
[http://www.idae.es/index.php/mod.documentos/mem.descarga?file=/documentos\\_11227\\_PER\\_2011-2020\\_def\\_93c624ab.pdf](http://www.idae.es/index.php/mod.documentos/mem.descarga?file=/documentos_11227_PER_2011-2020_def_93c624ab.pdf)
- Kapdan I. and Kargi F. (2006). Biohydrogen production from waste materials. Review. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 38, pp. 569-582.
- Laborde M.A. y Rubiera F. (2010). La energía del hidrógeno. Red Iberoamericana de Hidrógeno. Ediciones CYTED.  
<http://www.redhidrogenocyted.com.ar/esp/upload/Publicaciones/La%20energia%20del%20hidrogeno.pdf>
- Lo K.V. and Liao P.H. (1986). Digestion of cheese whey with anaerobic rotating biological contact reactor. Biomass. Vol. 10, pp. 243-252.
- Malaspina F., Cellamare C.M. and Tilche A. (1996). Anaerobic treatment of cheese-whey with a downflow-upflow hybrid reactor. Bioresource Technology. Vol. 55, pp. 131-139.
- Ministerio de industria, energía y turismo, MINETUR (2013). Plan de acción Nacional de Energías Renovables de España (PANER) 2011-2020.  
[http://www.minetur.gob.es/energia/desarrollo/EnergiaRenovable/Documents/20100630\\_PANER\\_Espanaversion\\_final.pdf](http://www.minetur.gob.es/energia/desarrollo/EnergiaRenovable/Documents/20100630_PANER_Espanaversion_final.pdf)

- Moya A. (1995). Aprovechamiento de lactosuero por fermentación: producción de ácido L-Láctico. PhD Tesis. Universidad de Castilla la Mancha.
- Parra R.A. (2010). Digestión anaerobia de lactosuero: Efecto de altas cargas puntuales. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín. Vol. 63, pp. 5385-5394.
- Torres y Carrera Consultores de Comunicación (2010). Informe biocombustibles 2010. <http://www.torresycarrera.com/newcorp/wp-content/uploads/2011/04/Informe-biocombustibles-2010.pdf>
- Venetsaneas N., Antonopoulou G., Stamatelatou K., Kornaros M. and Lyberatos G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. Bioresource Technology. Vol.100, pp. 3713-3717.
- Wildenauer F.X. and Winter J. (1985). Anaerobic digestion of high strength acidic whey in a pH-controlled up-flow fixed-film loop reactor. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 22, pp. 367-372.



## *2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS*

---



## **2.1. ANTECEDENTES.**

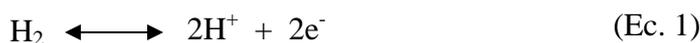
### ***2.1.1. Procesos de producción biológica de hidrógeno.***

Los procesos de producción de hidrógeno por vía biológica son recientes y abren un nuevo campo de desarrollo tecnológico que permitirá desviar en el futuro los métodos de obtención de hidrógeno de la utilización de combustibles no renovables. Entre estos procesos están aquellos que requieren luz para la obtención de la molécula de hidrógeno y aquellos que pueden ser llevados a cabo en oscuridad.

En general, todos los procesos de generación de hidrógeno por vía biológica están fundamentados en la presencia de una enzima productora de hidrógeno capaz de catalizar la reacción entre los electrones ( $e^-$ ) y los protones ( $H^+$ ) para generar hidrógeno molecular ( $H_2$ ). En la actualidad, las enzimas conocidas que tienen capacidad para llevar a cabo esta reacción son la nitrogenasa

y la hidrogenasa (Fe-hidrogenasa, NiFe-hidrogenasa). La presencia de estas enzimas depende del tipo de microorganismo y del proceso empleado para llevar a cabo la producción de hidrógeno (Hallenbeck y Benemann, 2002).

La **hidrogenasa** está ampliamente distribuida en los microorganismos anaeróbicos. Ésta tiene diversos orígenes filogenéticos y puede ser clasificada en dos categorías: hidrogenasa consumidora de hidrógeno e hidrogenasa reversible. Las hidrogenasas reversibles tienen la capacidad de producir y consumir hidrógeno dependiendo de las condiciones de la reacción (representada en la ecuación 1). Estas enzimas tienen como función remover el exceso de equivalentes reductores ( $H^+$ ) en los anaerobios estrictos y pueden ser inhibidas por la presencia de oxígeno o por altas concentraciones de su producto hidrógeno (Vignais et al., 2006).



La **nitrogenasa** está presente en gran cantidad de microorganismos fijadores de nitrógeno y puede producir hidrógeno en una reacción irreversible (representada en la ecuación 2), incluso con saturación de producto (en atmósfera 100%  $H_2$ ). Esta enzima es empleada para reducir el nitrógeno molecular ( $N_2$ ) a amoníaco ( $NH_3$ ) pero cuando hay ausencia de nitrógeno reduce los protones ( $H^+$ ) a hidrógeno consumiendo 4 moles de adenosín trifosfato (ATP) (Kovács et al., 2006). Las nitrogenasas presentan una baja replicación, requieren grandes cantidades de energía para llevar a cabo su biosíntesis y necesitan ATP para llevar a cabo la catálisis. Por ello estas enzimas no son una vía metabólica efectiva para la producción de hidrógeno (Hallenbeck y Benemann, 2002).



Entre los procesos de producción de hidrógeno por vía biológica están la biofotólisis directa o indirecta, la foto-fermentación, la producción a partir de la reacción de water gas shift (WGS), la electrólisis biocatalítica y la fermentación oscura.

La **biofotólisis** del agua mediante algas y cianobacterias consiste en el proceso fotosintético de producción de hidrógeno mediante electrones derivados

del agua. Este proceso involucra la oxidación del agua y la transferencia de electrones a la enzima hidrogenasa (proceso dependiente de la luz) generando hidrógeno y oxígeno. Si el oxígeno no es eliminado del sistema no es posible operar de forma continuada ya que es un inhibidor potente de la actividad enzimática de la hidrogenasa (Melis, 2002).

La **foto-fermentación** de compuestos orgánicos está basada en la capacidad de algunas bacterias foto-heterotróficas para convertir los ácidos orgánicos (acético, láctico y butírico) a hidrógeno y dióxido de carbono, bajo condiciones anaerobias y en presencia de luz. Las bacterias fotosintéticas púrpuras no sulfurosas (PNS) pueden descomponer ácidos orgánicos mediante la utilización de nitrogenasas en un proceso foto-fermentativo bajo condiciones deficientes en nitrógeno molecular (Basak y Das, 2007). En este proceso también interviene la hidrogenasa, la cual compite por el hidrógeno disponible en el medio reduciendo la actividad de la nitrogenasa al quedar sin sustrato.

Las bacterias fotosintéticas son capaces de convertir los compuestos presentes en el gas de síntesis en combustibles biológicos siguiendo rutas energéticamente favorables. Algunas bacterias foto-heterotróficas de la familia *Rhodospirillaceae* son capaces de crecer en oscuridad utilizando monóxido de carbono (CO) como fuente de C. La oxidación de monóxido de carbono a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) sigue la **reacción de water gas shift** (WGS) utilizando enzimas para catalizar el proceso y produciendo cantidades estequiométricas de dióxido de carbono e hidrógeno. Para ello interviene la enzima CO-deshidrogenasa la cual forma parte de un complejo de enzimas (Najafpour et al., 2004).

El proceso de **electrólisis biocatalítica** utiliza microorganismos capaces de convertir, mediante la aplicación de una cierta cantidad de corriente eléctrica, la materia orgánica biodegradable en hidrógeno. Las celdas electrolíticas, que utilizan como mediadores microorganismos, son denominadas MEC (microbial electrolysis cells). Este proceso tiene como ventaja la generación de una corriente de hidrógeno de alta pureza, lo que permite prescindir de instalaciones posteriores de separación de corrientes gaseosas (Call y Logan, 2008).

La **fermentación oscura** consiste en la obtención de hidrógeno a partir de compuestos orgánicos en ausencia de luz mediante la acción de un consorcio de bacterias que son sensibles o completamente inhibidas por el oxígeno. En los microorganismos heterotróficos, el metabolismo anaerobio genera problemas relacionados con el destino final de los electrones derivados de las reacciones que liberan energía, agravándose particularmente cuando los requerimientos para la actividad biosintética solo pueden ser satisfechos a partir de la degradación exclusiva de compuestos orgánicos. Una de las formas de remover los electrones excedentes es mediante la generación de hidrógeno en forma molecular a través de la hidrogenasa (Das y Veziroglu, 2001).

Entre los distintos procesos de producción de hidrógeno por vía biológica, es el proceso de fermentación oscura el que mayores posibilidades de escalado y aplicación industrial a corto plazo presenta, gracias a la similitud de las condiciones de operación frente a los procesos de digestión anaerobia convencional. Los rendimientos de producción de gas en el proceso de fermentación oscura, al ser comparados en términos de la unidad de volumen de reactor, son superiores a los demás procesos biológicos (en algunos casos capaces de lograr una mayor conversión de la materia orgánica en hidrógeno pero con menores rendimientos a la misma unidad de reactor considerada) (Levin et al., 2004). Otra ventaja que presenta el proceso producción de hidrógeno por fermentación oscura es que no depende de fuentes de luz externa y por lo tanto no requiere transparencia en el licor en el que están presentes los microorganismos (Vijayaraghavan y Soom, 2006). Por otro lado, en el caso de utilizar cultivos mixtos no requiere la esterilización previa del material utilizado como sustrato, lo que hace adecuado el proceso para el tratamiento de biomasa residual. Esto convierte al proceso de fermentación oscura no solo en un sistema con capacidad de generar un gas combustible, sino como una vía de valorización de los residuos orgánicos. Sin embargo, el producto líquido remanente del proceso de fermentación oscura consiste en un licor rico en ácidos grasos volátiles (AGV) y precisa de un tratamiento posterior. Puesto que los AGV son compuestos precursores de la metanogénesis, una opción que permite el tratamiento global de los residuos biodegradables consiste en acoplar al sistema de fermentación una

segunda etapa, en un reactor separado, donde llevar a cabo la metanogénesis del líquido remanente para alcanzar su estabilización química y producir metano (CH<sub>4</sub>) (Gómez et al., 2006).

### ***2.1.2. Etapas del proceso de digestión anaerobia.***

La degradación anaerobia es un proceso complejo en el que intervienen diferentes grupos microbianos, de manera coordinada y secuencial, para descomponer la materia orgánica, en ausencia de oxígeno libre. La interacción cooperativa de varios grupos fisiológicos de procariotas permite la formación de hidrógeno y metano a partir de sustancias de elevado peso molecular, tales como polisacáridos, proteínas y grasas. Una descripción detallada del proceso de digestión anaerobia obliga a considerar hasta 4 etapas sucesivas tal y como está representado en la figura 2.1 (Breure, 1986; Romero et al., 2002).

La materia orgánica polimérica no puede ser utilizada directamente por los microorganismos a menos que tenga lugar su hidrólisis en compuestos solubles que puedan atravesar la membrana celular. Por lo tanto, **la hidrólisis** es el primer paso necesario para la degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos. La hidrólisis de estos materiales orgánicos complejos es llevada a cabo por enzimas extracelulares excretadas por bacterias celulolíticas, bacterias hidrolíticas y bacterias acidógenas, que permiten la ruptura de los polímeros orgánicos hasta subunidades más pequeñas fácilmente transportadas al interior celular. De este modo, la etapa hidrolítica es una etapa indispensable que constituye generalmente el paso limitante de todos los procesos de digestión anaerobia, especialmente si el sustrato está en forma sólida (Vavilin et al, 2001) o con altas concentraciones de materia orgánica particulada (debido a la disponibilidad de superficie para la adsorción de las enzimas hidrolíticas).

La materia orgánica puede estar compuesta de tres tipos básicos de macromoléculas (carbohidratos, proteínas y lípidos) y la hidrólisis de cada tipo de compuesto es realizada por diferentes grupos enzimáticos. Las proteínas son hidrolizadas fundamentalmente por las proteasas de las especies de *Clostridium*

(Salminen y Rintala, 2002) a proteosas, peptonas, péptidos y aminoácidos; las grasas son hidrolizadas por las lipasas a ácidos grasos de cadena larga (AGCL) y moléculas de glicerol o galactasa (Zinder, 1984; Koster, 1989); y los productos de la hidrólisis de los polícarbohidratos son azúcares y alcoholes (Zinder, 1984; Pavlostathis y Giraldo-Gomez, 1991). Los residuos lignocelulósicos están caracterizados por ser un material refractario a la degradación anaerobia, ya que contienen complejas matrices de celulosa, hemicelulosa y lignina, que tienen un efecto limitante en la actividad de los microorganismos o sus enzimas para degradar rápidamente estos materiales, en especial la lignina (Jiménez et al., 1990; Fermor, 1993). Los polímeros de cadena larga de la celulosa y hemicelulosa son hidrolizados a mono o disacáridos por enzimas holocelulóticas extracelulares.

Después de la etapa de hidrólisis, durante **la fase ácida o fermentación acidogénica**, las bacterias acidificantes transforman la materia orgánica disuelta en una gran variedad de productos de fermentación. Los productos finales son principalmente ácidos grasos volátiles (AGV) tales como el acetato, el propionato, el butirato y el succinato, así como pequeñas cantidades de ácido láctico y etanol, dióxido de carbono e hidrógeno. La cinética del proceso es relativamente rápida y el pH óptimo bajo. Estos procesos son la base energética de las poblaciones no metanogénicas.

Los componentes más reducidos de la fermentación acidogénica son oxidados en la **etapa de acetogénesis** bajo condiciones anaerobias, a ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno, que sirven de sustrato a bacterias metanogénicas. Así, los AGV y AGCL con tres o más carbonos son oxidados a acético, hidrógeno y dióxido de carbono. Esta conversión es sólo posible si la presión parcial de hidrógeno está en valores bajos, con presiones parciales menores de  $10^{-3}$  atm (Zinder, 1984). Esta oxidación es llevada a cabo por bacterias facultativas que viven en estrecha colaboración con las bacterias metanógenas, son bacterias sintróficas denominadas “acetógenas” u “organismos protón-reductores obligados” (McCarty et al., 1981). También tiene lugar la respiración acetogénica de bicarbonato por bacterias homoacetogénicas (denominada homoacetogénesis). Estas bacterias catabolizan mezclas de dióxido de carbono e hidrógeno a compuestos de carbonos múltiples. Pueden producir

ácido acético, pero las bacterias metanogénicas compiten con ellas por el hidrógeno.

La **fase metanogénica** es la etapa final del tratamiento, que implica dos tipos de reacciones, aquellas en las que el dióxido de carbono e hidrógeno son combinados para producir metano y agua (metanogénesis hidrogenotrófica), y las que convierten el ácido acético en metano y dióxido de carbono (metanogénesis acetoclástica). Los microorganismos responsables de la primera etapa suelen denominarse utilizadores de hidrógeno o “hidrogenotróficos”, mientras que los responsables de la segunda transformación son denominados “acetoclásticos”. Las bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno crecen en asociación sintrófica con los organismos metanogénicos hidrogenotróficos. Éstos últimos mantienen la presión parcial de hidrógeno (mediante su consumo) lo suficientemente baja, de tal manera que la acetogénesis está favorecida termodinámicamente (Boone y Xun, 1987).

Como indica la figura 2.1, el hidrógeno es producido como intermediario en un paso crucial de la digestión anaerobia. Sin embargo, cuando es de interés obtener hidrógeno como producto final, es necesario desacoplar su producción (fermentación acidogénica) de su consumo (metanogénesis). Para lograrlo, una de las posibles modificaciones consiste en una separación tempo-espacial del proceso en dos etapas en serie. En la primera etapa, en un primer reactor, tiene lugar la hidrólisis y la fermentación acidogénica de la materia orgánica compleja produciendo hidrógeno. En la segunda etapa, el líquido remanente es introducido en un segundo reactor donde tiene lugar la conversión de los ácidos orgánicos en metano. El producto líquido final presenta una mayor estabilidad química y contiene los componentes difíciles de degradar junto con el nitrógeno, fósforo y otros elementos minerales presentes inicialmente en la biomasa.

La figura 2.2 representa el esquema del proceso de producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas a partir de la fermentación oscura de biorresiduos.

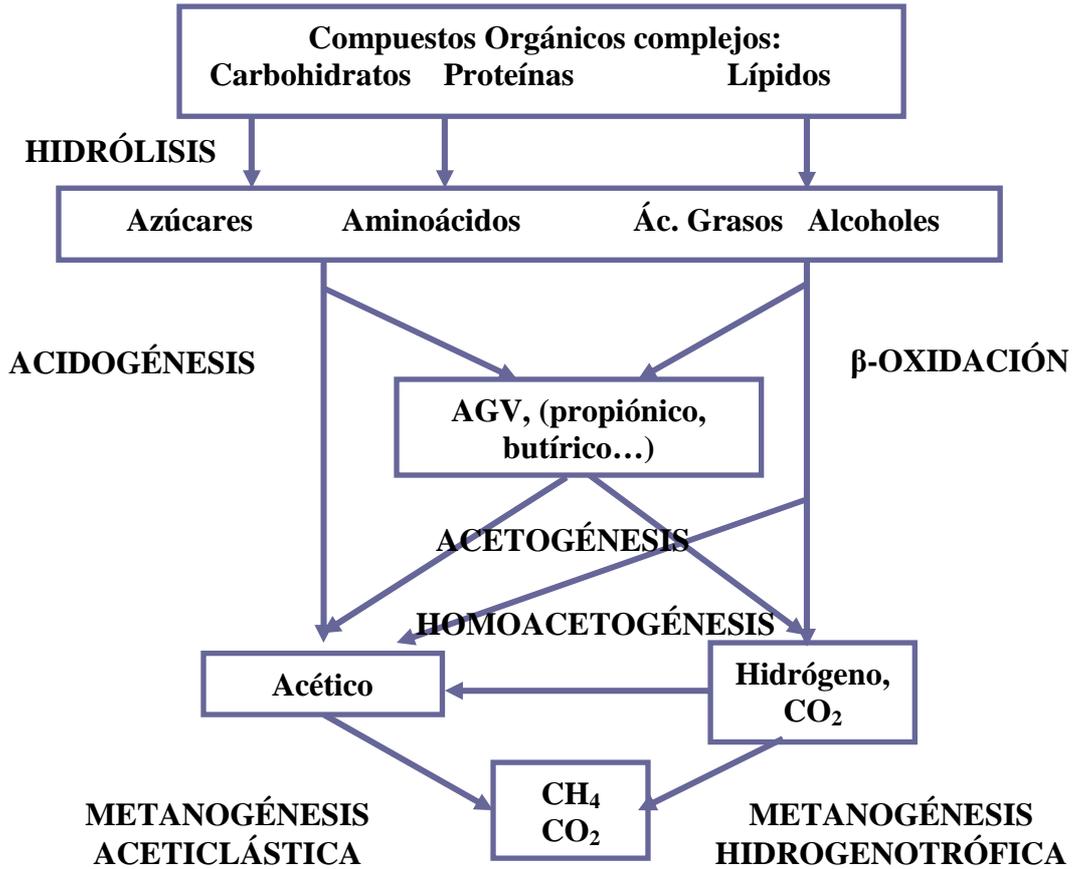


Figura 2.1. Diagrama completo de digestión anaerobia considerando los procesos simultáneos (Zinder, 1984; Koster, 1989; Pavlostathis y Giraldo-Gomez, 1991).

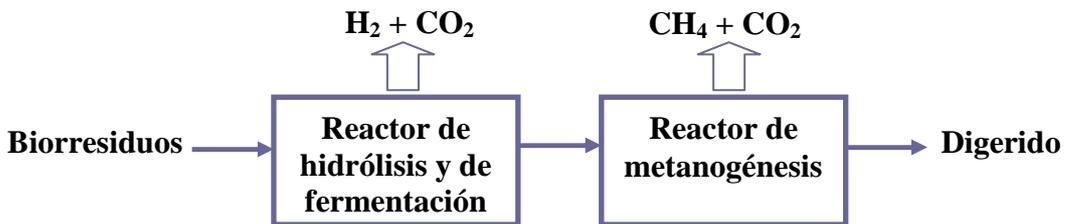


Figura 2.2. Esquema del proceso de digestión anaerobia en dos etapas para la obtención de hidrógeno y metano a partir de biorresiduos.

### ***2.1.3. Microbiología y bioquímica de la producción de hidrógeno por fermentación oscura.***

El entendimiento de los fundamentos microbiológicos y bioquímicos de la producción biológica de hidrógeno es fundamental para su investigación aplicada. De este modo, la heterogeneidad genética de las poblaciones de microorganismos durante la producción de hidrógeno a partir de inóculos mixtos ha sido estudiada por diferentes autores (Fang et al., 2000; Kim et al., 2006). Estos estudios indican que la producción de hidrógeno en los sistemas de fermentación oscura es debida a bacterias anaerobias obligadas pertenecientes al género *Clostridium*, o bien a bacterias facultativas de los géneros *Bacillus* y *Enterobacter*, que pueden obtener energía tanto por respiración (en presencia de oxígeno) como por fermentación (en ausencia de oxígeno) produciendo en este último caso hidrógeno (Hawkes et al., 2002).

La fermentación es un tipo de catabolismo anaerobio que consiste en un proceso de oxidación-reducción equilibrado en ausencia de aceptores de electrones externos (tales como el oxígeno, el sulfato, el nitrato y el hierro férrico), y cuya función es la síntesis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato. Una ruta bioquímica muy utilizada para la fermentación de la glucosa es la **glucólisis** (vía de Embden - Meyerhof) que genera a partir de una molécula de glucosa dos moléculas de piruvato, dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH (dinucleótido de nicotinamida adenina reducido). Para que este proceso tenga lugar es necesaria la presencia de la molécula  $\text{NAD}^+$  (dinucleótido de nicotinamida adenina), que acepta los electrones liberados durante la oxidación de la glucosa formando NADH. A su vez, en ambientes donde no hay aceptores de electrones terminales o bien cuando las bacterias carecen de la capacidad de utilizar dichos aceptores, el hidrógeno es producido para disipar el exceso de electrones liberados en la oxidación de los sustratos. Cuando todo el  $\text{NAD}^+$  es reducido a NADH la oxidación de la glucosa es detenida. Este bloqueo es superado en la fermentación mediante la oxidación del NADH a  $\text{NAD}^+$  a través de la formación de hidrógeno y/o de reacciones que suponen la reducción del piruvato a una extensa variedad de productos de fermentación (tales como el

etanol, el butanol y el ácido láctico). El resultado final es el mismo, el NADH debe regresar a la forma oxidada,  $\text{NAD}^+$ , a fin de que la glucólisis pueda continuar. Pero, en algunos casos, además de servir para la regeneración de  $\text{NAD}^+$ , las fermentaciones sirven para la formación de ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato (como ocurre con la formación de los ácidos butírico, succínico y propiónico); la formación de ácido acético sólo está acoplada a la formación de ATP (Madigan et al., 2000).

Han sido realizados estudios estequiométricos en microorganismos productores de hidrógeno con el fin de aclarar las vías metabólicas utilizadas en su producción (Chen et al., 2005; Chen et al., 2006). Estos estudios indican que la producción de hidrógeno por vía microbiana está basada principalmente en el metabolismo anaerobio del piruvato formado mediante el catabolismo de diferentes sustratos. Las hexosas son metabolizadas hasta piruvato mediante varias rutas, con frecuencia mediante la glucólisis. La posterior **degradación anaerobia del piruvato** formado está catalizada mediante uno de los sistemas enzimáticos siguientes: Piruvato-formiato-liasa (PFL) o Piruvato-ferredoxina-óxido-reductasa (PFOR). Los microorganismos facultativos generan hidrógeno utilizando el sistema PFL, mientras que los anaerobios obligados lo obtienen utilizando el sistema PFOR (Hallenbeck y Benemann, 2002).

Chen y colaboradores (2006) estudiaron las posibles rutas metabólicas del hidrógeno para la especie *Clostridium butyricum*. En una de estas rutas el piruvato interacciona con el **sistema enzimático PFOR** produciéndose la descarboxilación oxidativa del piruvato que da lugar a dióxido de carbono y acetil coenzima A (Acetil-CoA). Los electrones generados son transferidos a la ferredoxina (Fd) que es reducida (Fd(red)). Debido al bajo potencial redox de la Fd(red), una hidrogenasa puede oxidarla generando hidrógeno (figura 2.3 Ruta A). Además, dos moles de  $\text{NAD}^+$  son reducidos durante la descarboxilación oxidativa del piruvato a NADH, el cual proporciona equivalentes reductores para la síntesis de hidrógeno en la segunda ruta metabólica. Así, en la segunda ruta el NADH formado durante la glucólisis y la descarboxilación oxidativa del piruvato es utilizado para producir hidrógeno por medio de la hidrogenasa (figura 2.3 Ruta B), permitiendo a su vez regenerar el  $\text{NAD}^+$  (Chen et al., 2006). En este paso el

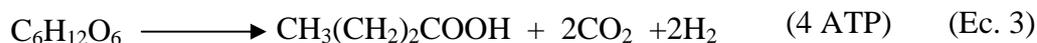
NADH es oxidado por la ferredoxina a  $\text{NAD}^+$  y de nuevo el hidrógeno puede ser producido por la oxidación de la Fd(red) vía hidrogenasa (Hallenbeck, 2005). Sin embargo, esta oxidación de NADH sólo es termodinámicamente favorable cuando la presión parcial de hidrógeno ( $\text{PpH}_2$ ) es menor a  $6.10^{-4}$  atm (60 Pa), en caso contrario la mayoría del NADH es oxidado mediante otras rutas. Por el contrario, la producción de hidrógeno vía oxidación del piruvato y ferredoxina es favorable a altas  $\text{PpH}_2$ , superiores a 0,3 atm ( $3 \times 10^4$  Pa) (Angenent et al., 2004). A elevadas temperaturas, las condiciones termodinámicas son más favorables para la producción adicional de hidrógeno a través de la reducción del NADH (Hallenbeck, 2005).

Según las rutas descritas anteriormente, el metabolismo de las hexosas en bacterias que poseen el sistema PFOR puede resultar en la formación de 2 moles de hidrógeno por mol de hexosa. Además, si la  $\text{PpH}_2$  es suficientemente baja ( $<6.10^{-4}$  atm), el NADH producido también puede ser utilizado para generar hidrógeno rindiendo en el mejor de los casos 2 moles de hidrógeno adicionales por mol de hexosa, y permitiendo regenerar el  $\text{NAD}^+$  necesario para mantener la glucólisis. En este caso el Acetil-CoA puede ser utilizado para obtener ATP produciendo ácido acético (Van Ginkel y Logan, 2005). Por lo tanto, el rendimiento máximo teórico para la producción de hidrógeno es de 4 moles de hidrógeno por mol de hexosa removida cuando es obtenido el ácido acético como producto final de la fermentación (ecuación 3). En caso contrario ( $\text{PpH}_2 > 6.10^{-4}$  atm), cuando todo el  $\text{NAD}^+$  está en forma de NADH debido a la desfavorable transferencia de electrones hacia el hidrógeno, algunas bacterias desvían los electrones del NADH hacia la producción de ácido butírico lo que permite regenerar el  $\text{NAD}^+$  necesario para mantener la glucólisis y obtener un rendimiento máximo de 2 moles de hidrógeno por mol de hexosa removida y la producción de 3 moles de ATP (ecuación 4) (Hallenbeck et al., 2005).

De este modo, los productos finales de la fermentación dependen de los procesos empleados para la regeneración del  $\text{NAD}^+$  a partir del NADH y para la obtención de ATP. Dichos procesos marcan el destino final del metabolito clave, el piruvato, y son función de las condiciones en las que transcurre la fermentación y del organismo involucrado.

Chen y otros (2006) han demostrado que la vía del ácido acético permite un mayor rendimiento de hidrógeno que la del ácido butírico, y han encontrado que potenciar esta ruta metabólica mejora considerablemente su producción. En la práctica, la cantidad de hidrógeno producido por mol de glucosa es 2-3 moles de hidrógeno por mol de hexosa (Hallenbeck y Benemann, 2002) debido a la obtención de una mayor proporción relativa de ácido butírico con respecto a la de ácido acético, y a la utilización de sustrato para la síntesis celular o la producción de metabolitos. A su vez, para lograr óptimos rendimientos de hidrógeno debe ser evitada la producción de etanol, ácido propiónico y ácido láctico porque ellos consumen intermedios bioquímicos hidrogenados tales como el NADH (Venkata et al., 2008; Aceves-Lara et al., 2008).

La figura 2.3 muestra las dos rutas indicadas para la producción de hidrógeno con la formación de ácido acético y ácido butírico como productos finales de la fermentación. A su vez, las siguientes ecuaciones representan la formación de ácido acético y butírico, respectivamente (Morimoto et al., 2004).



Las rutas de fermentación de azúcares mostradas en la figura 2.3 pueden sufrir modificaciones que derivan en la formación de compuestos neutros adicionales, tales como el butanol, acetona e isopropanol (figura 2.4), y su formación conlleva una reducción de las cantidades de ácido acético y butírico y de hidrógeno. *Clostridium acetobutylicum* produce disolventes neutros junto a una mezcla de los ácidos acético y butírico, y de dióxido de carbono e hidrógeno. Los ácidos son formados en una primera etapa (fase acidogénica), así como el hidrógeno, provocando un descenso del pH. Esto provoca el cese de la producción de los ácidos y el comienzo de la producción de los solventes (fase solventogénica), así como la reabsorción de los ácidos orgánicos para producir dichos solventes. Sin embargo, si el descenso del pH es evitado mediante el empleo de una solución alcalina, la producción de ácidos e hidrógeno puede continuar. A su vez, al contrario que la formación de productos neutros, la producción de ácidos permite la síntesis adicional de ATP (Stainer et al., 1992).

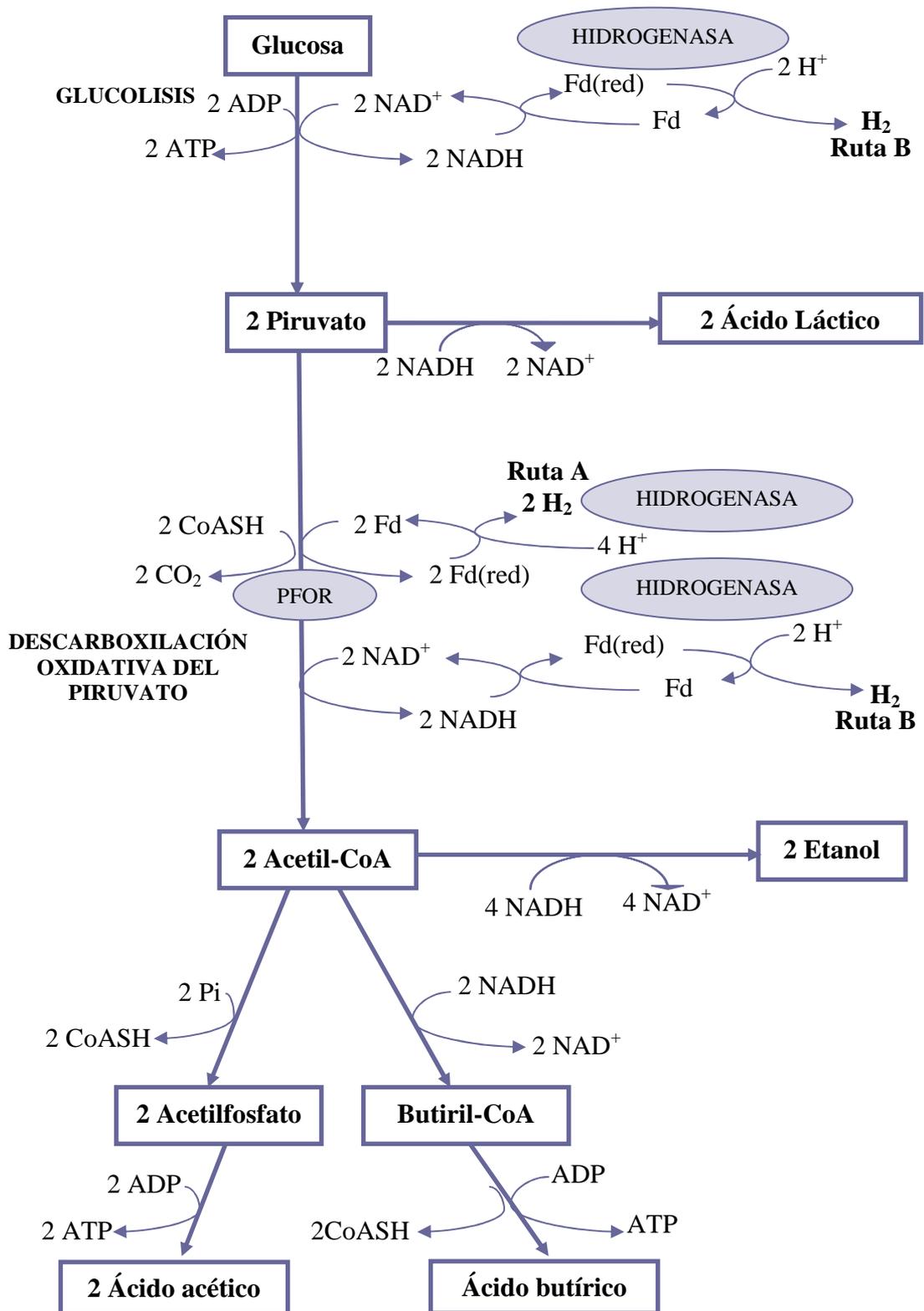
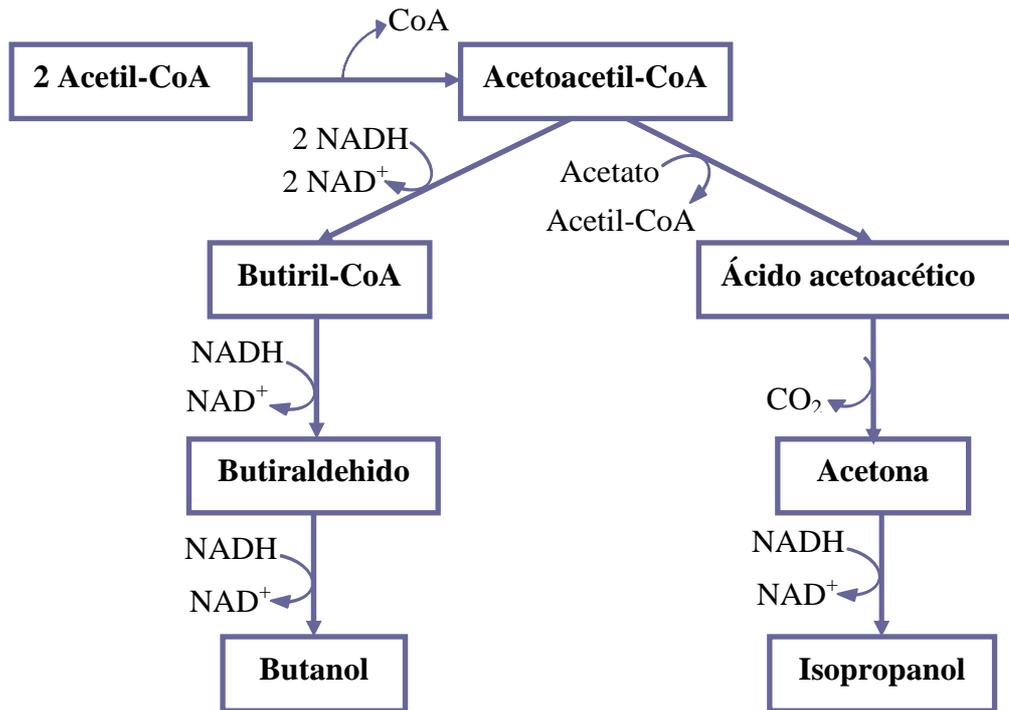


Figura 2.3. Esquema de las principales rutas de fermentación de glucosa implicadas en la producción de hidrógeno de *Clostridium butyricum* (modificado de Chen et al., 2006; Angenent et al., 2004).



**Figura 2.4. Rutas de formación de butano, acetona e isopropanol a partir del acetil-CoA (Stainer et al., 1992).**

En las bacterias facultativas el metabolismo está bajo el control estricto de la presión de oxígeno. Si la presión de oxígeno disminuye es activado un factor de transcripción (FNR) que promueve la activación de genes que codifican reductasas terminales capaces de generar la fuerza motriz de protones ( $\Delta p$ ) tales como el **sistema enzimático PFL**. A su vez, este factor de transcripción también reprime genes aeróbicos. Muchas de las bacterias, especialmente los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, pueden metabolizar el piruvato en ácido fórmico y otros productos mediante las rutas metabólicas representadas en la figura 2.5. Para ello el piruvato es escindido en ácido fórmico y Acetil-CoA por la acción del sistema PFL. El ácido fórmico es oxidado a dióxido de carbono por medio del sistema formiato-hidrogeno-liasa (FHL). Este complejo enzimático está constituido por formiato-deshidrogenasa e hidrogenasa permitiendo la producción de hidrógeno. El ácido fórmico también es acumulado en aquellas bacterias que no presentan la enzima formiato-deshidrogenasa (Parés y Juárez, 1997).

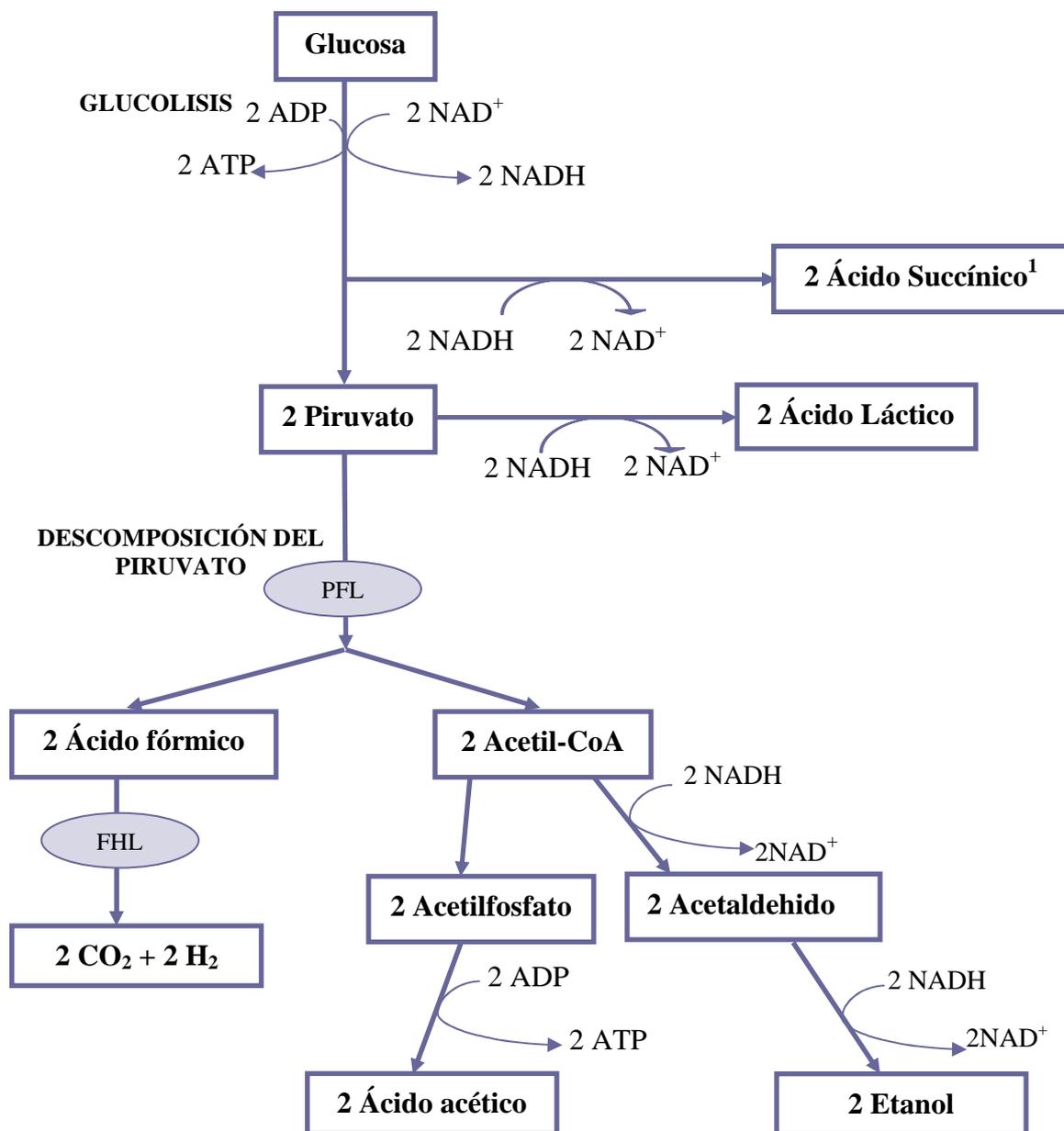
Por otro lado, el Acetil-CoA es transformado en ácido acético por el sistema fosfotrans-acetilasa y la acetoquinasa para obtener ATP. Sin embargo, también puede dar etanol por la acción de las enzimas acetaldehído-deshidrogenasa y alcohol-deshidrogenasa, para regenerar el  $\text{NAD}^+$  necesario para mantener la glucólisis (Parés y Juárez, 1997; Rodríguez y Roldán, 2005).

Los rendimientos de producción de hidrógeno en las bacterias facultativas están limitados por la incompleta degradación del ácido fórmico a través del sistema FHL y por la formación de ácido láctico y etanol para regenerar el  $\text{NAD}^+$ . Por ello, en general los rendimientos de hidrógeno por bacterias facultativas desde glucosa están próximos a la mitad del rendimiento máximo teórico de 2 moles de hidrógeno por mol de glucosa (Hallenbeck, 2005).

Las rutas metabólicas para la producción de hidrógeno a partir de glucosa involucrando el sistema PFL están recogidas en la figura 2.5.

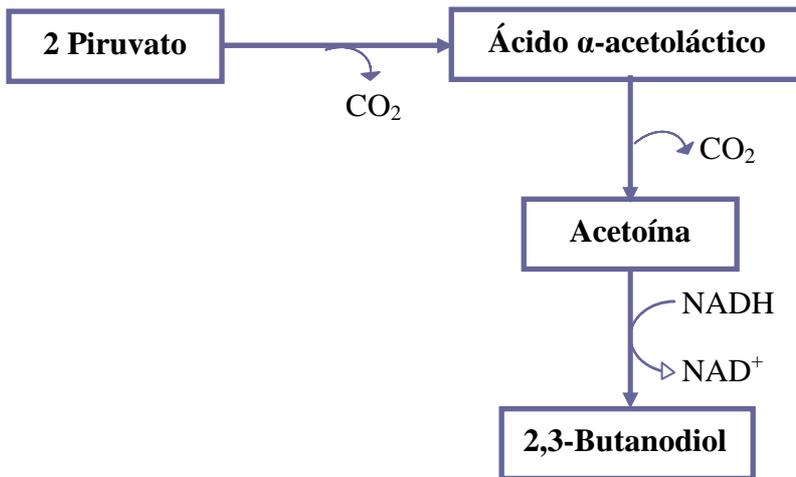
En algunas bacterias facultativas (de los géneros *Klebsiella*, *Serratia* y *Erwinia*) la fermentación de glucosa da lugar a un producto final adicional, el 2,3-butanodiol que es formado a partir de ácido pirúvico. Los fermentadores del 2,3-butanodiol también producen dióxido de carbono e hidrógeno a partir del ácido fórmico, así como dos moléculas adicionales de dióxido de carbono por cada una de 2,3-butanodiol, tal y como indica la figura 2.6.

La ruta metabólica que conduce a la formación de 2,3-butanodiol parte del piruvato generado durante la glicolisis. La enzima  $\alpha$ -acetolactato sintasa transforma una molécula de piruvato en acetaldehído-tiamina pirofosfato (con la pérdida concomitante de una molécula de dióxido de carbono) y la condensa con una segunda molécula de piruvato para formar el ácido  $\alpha$ -acetoláctico. El ácido  $\alpha$ -acetoláctico, que es una molécula inestable, origina acetoína por descarboxilación enzimática catalizada por la  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa. Finalmente, la acetoína da lugar a 2,3-butanodiol, en una reacción catalizada por la acetoína reductasa, con la oxidación de una molécula de  $\text{NADH}$  a  $\text{NAD}^+$ .



**Figura 2.5.** Esquema de las principales rutas de fermentación de glucosa implicadas en la producción de hidrógeno de *Escherichia coli* (Parés y Juárez, 1997; Rodríguez y Roldán, 2005; Turcot 2008).

<sup>1</sup> El ácido succínico es formado mediante la ruta fosfoenolpiruvato (PEP) → oxalacetato → Malato → Fumarato → Succinato



**Figura 2.6. Rutas de formación de 2,3-butanodiol a partir del piruvato (Parés y Juárez, 1997).**

Si bien hasta ahora nos hemos referido sólo a la fermentación de hidratos de carbono como procedimiento para obtener energía por parte de las bacterias, debemos destacar que otros compuestos orgánicos pueden ser fermentados como por ejemplo, **los aminoácidos**. En el caso de los microorganismos del género *Clostridium* la fermentación de pares de aminoácidos más característica es la reacción de Stickland en la cual un aminoácido es oxidado y un segundo aminoácido actúa como aceptor de electrones. Algunos aminoácidos actúan únicamente como donadores de electrones (por ejemplo, la Alanina, Leucina, Valina y Histidina), otros actúan como aceptores (Glicina, Prolina, Hidroxiprolina y Arginina), y sólo el Triptófano y la Tirosina pueden desempeñar ambas funciones. Los productos de la oxidación de Stickland son siempre amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), dióxido de carbono y un ácido carboxílico con un átomo menos de carbono que el aminoácido que es oxidado. Durante la fermentación también es producido ATP por fosforilación a nivel de sustrato. La figura 2.7 muestra la fermentación acoplada de la Alanina y la Glicocola, aminoácidos que no pueden ser fermentados individualmente por la mayoría de los *Clostridium*. Durante este proceso la Alanina es desaminada oxidativamente a piruvato, el cual sufre la rotura tiolítica dando acetil-CoA y dióxido de carbono. El ATP es formado mediante la conversión de acetil-CoA a ácido acético. El NADH generado durante la degradación de la Alanina es oxidado por una desaminación reductora



Uno de los mecanismos principales de ataque de aminoácidos individuales bajo condiciones anaerobias es la desaminación. La reacción general de desaminación reductora puede ser representada por la ecuación 6 (Madigan et al., 2000) y la reacción general de desaminación oxidativa por la ecuación 7:



Según los mecanismos anteriores la degradación de los aminoácidos involucra la producción de ácidos grasos volátiles y amonio. La concentración de amonio producida puede ser correlacionada con la cantidad de aminoácidos degradados. De este modo, el grado de degradación de sustratos proteicos puede ser estimado mediante la observación de la concentración de amonio en el medio de reacción (Dong et al., 2009).

Aproximadamente el 90% de la degradación de los aminoácidos ocurre mediante la reacción de Stickland, la cual no produce hidrógeno. La desaminación oxidativa de un único aminoácido produce hidrógeno pero es termodinámicamente desfavorable a menos que la presión parcial de hidrógeno alcance valores extremadamente bajos. Además, aminoácidos tales como la Glicina que son degradados por desaminación reductora consumen hidrógeno como donador de electrones. De este modo, incluso si el hidrógeno es producido por desaminación oxidativa puede ser utilizado por desaminación reductora. Por todo ello, la producción de hidrógeno desde sustratos principalmente proteicos es difícil de llevar a cabo (Dong et al, 2009).

Respecto a los **lípidos**, son utilizados con frecuencia por los microorganismos como fuente de energía. Los lípidos pueden ser hidrolizados anaerobicamente a glicerol y ácidos grasos de cadena larga (AGCL) por las lipasas microbianas. El glicerol obtenido es fosforilado, oxidado a dihidroxiacetona fosfato y catabolizado vía glucolítica. El glicerol puede ser un sustrato para la producción de hidrógeno (Heyndrickx et al., 1991). Ito et al. (2005) estudiaron la producción de hidrógeno en un reactor de lecho empaquetado con células inmovilizadas y observaron que la velocidad máxima de producción

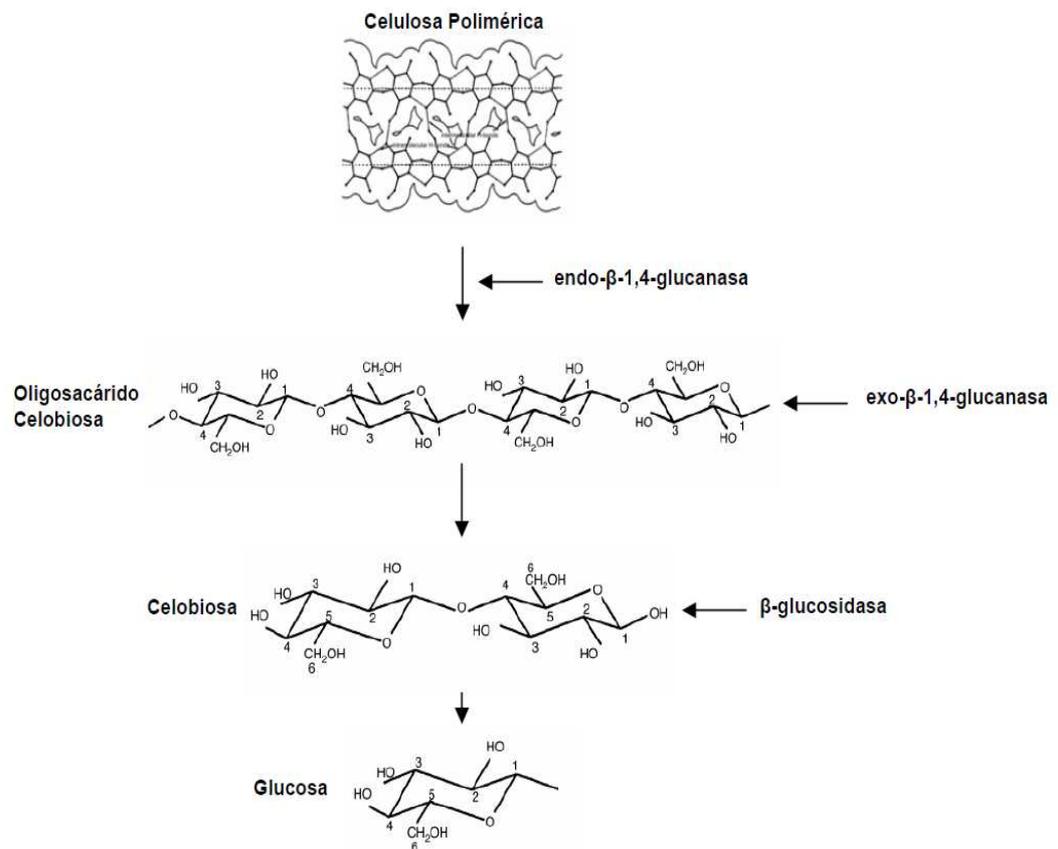
de hidrógeno a partir de glicerol crudo fue 80 mmol/L/h. Fountoulakis y Manios (2009) estudiaron los efectos de la adición de glicerol crudo en la producción de hidrógeno cuando eran tratados distintos tipos de residuos orgánicos. Observó que el glicerol tenía un efecto positivo en todos los casos sobre la producción de hidrógeno. En concreto cuando el residuo tratado fue la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), la adición de glicerol mejoró la producción de hidrógeno en 2,9 mmol H<sub>2</sub>/g glicerol añadido.

Por otro lado, los AGCL obtenidos de la hidrólisis de los lípidos son a menudo oxidados en la vía  $\beta$ -oxidación pero las reacciones de degradación involucradas son termodinámicamente desfavorables a menos que la presión parcial de hidrógeno alcance valores muy bajos (inferiores a 10<sup>-3</sup> atm). Además, los AGCL son uno de los inhibidores de bacterias anaerobias (Hanaki et al., 1981). Por lo tanto, debido a que una gran parte de la demanda química de oxígeno (DQO) contenida en los lípidos es convertida a AGCL durante las reacciones de hidrólisis, la producción de hidrógeno desde lípidos no es alta (Dong et al, 2009).

Por último, nos referimos a la **celulosa** que es el componente básico de los vegetales y consta de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas reunidas por enlaces 1,4-glicosídicos. La molécula de celulosa tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas. La insolubilidad de la celulosa y su alta resistencia mecánica es debida a la presencia de puentes hidrógeno inter e intramoleculares y a fuerzas de Van der Waals. La degradación de la celulosa (figura 2.8) es catalizada por un sistema constituido por tres enzimas: (a) endo- $\beta$ -1,4-glucanasa que ataca los enlaces  $\beta$ -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula dando largos fragmentos solubles (oligosacáridos); (b) exo- $\beta$ -1,4-glucanasa que separa el disacárido celobiosa desde los extremos de la molécula; (c)  $\beta$ -glucosidasa que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa (Dumitriu, 2005). La hidrólisis de la celulosa está favorecida cuando estas tres enzimas operan al unísono, como ocurre en el celulosoma de *Clostridium thermocellum* localizado en la superficie de la célula (Levin et al., 2006). Levin et al. (2006) estudiaron la producción de hidrógeno a partir *Clostridium thermocellum* utilizando un medio rico en celulosa, el rendimiento obtenido fue de 1,6 mol H<sub>2</sub>/mol de glucosa.

La digestión de la celulosa por diversas bacterias está acompañada de la secreción de una sustancia carotenoide amarilla que sirve como indicador de la hidrólisis.

En la mayoría de los casos las fibras de celulosa están integradas en una matriz de otro biopolímero estructural, principalmente hemicelulosa y lignina. Esta estructura complicada limita la velocidad y extensión de la hidrólisis. De este modo, es difícil producir hidrógeno desde sustratos lignocelulósicos a menos que un pretratamiento adecuado sea adoptado (Dong et al., 2009).



**Figura 2.8.** Esquema general de la degradación de la celulosa (modificado de Dumitriu, 2005).

#### **2.1.4. Factores que afectan a la producción de hidrógeno por fermentación oscura.**

Los procesos de producción de hidrógeno por vía fermentativa están afectados por diversos factores, entre ellos están el inóculo, el sustrato, el pH, la temperatura, el tiempo de retención hidráulico (TRH), la carga orgánica (CO) y la presión parcial de hidrógeno (Oh, et al., 2003; Lin y Lay, 2005). Estos factores son considerados los más importantes en el estudio que es abordado en este trabajo y por ello son descritos a continuación.

##### **2.1.4.1. Inóculo.**

La producción de hidrógeno por fermentación oscura puede ser llevada a cabo utilizando como inóculo cultivos puros y cultivos mixtos. En cuanto a los **cultivos puros**, los géneros *Clostridium* y *Enterobacter* son los más utilizados. Las especies del género *Clostridium* son gran positivas, baciloformes, anaerobias obligadas y formadoras de esporas. Sin embargo, las especies del género *Enterobacter* son gran negativas, baciloformes, anaerobias facultativas y no formadoras de esporas. La mayoría de los estudios que emplean cultivos puros de bacterias para la producción fermentativa de hidrógeno son conducidos en modo discontinuo y utilizan glucosa como sustrato (Wang y Wan, 2009). Sin embargo, el uso de cultivos puros resulta complicado, especialmente si son utilizados residuos como sustratos, ya que es necesario mantener condiciones asépticas (Venkata et al., 2008). A su vez, el uso conjunto de microorganismos anaerobios obligados y anaerobios facultativos en la producción de hidrógeno es beneficioso ya que los microorganismos facultativos permiten reducir el oxígeno a agua creando un ambiente anaerobio favorable para los microorganismos anaerobios obligados. De este modo, puede ser evitado el uso de agentes reductores en el medio de crecimiento. Yokoi y colaboradores (1998) utilizaron una mezcla de *Enterobacter sp.* y *Clostridium sp.* para producir hidrógeno bajo un medio de cultivo libre de agentes reductores y así disminuir los costes de producción de hidrógeno.

Las bacterias capaces de producir hidrógeno están ampliamente distribuidas en diferentes ambientes, tales como el suelo, aguas residuales y compostadas y, de manera especial, en el lodo anaerobio utilizado en procesos metanogénicos, el cual representa un buen ejemplo de cultivo mixto. El **cultivo mixto** de bacterias provenientes de estos ambientes puede ser utilizado como inóculo para los procesos de producción de hidrógeno por fermentación (Wang y Wan, 2009). Sin embargo, en los cultivos mixtos coexisten organismos productores de hidrógeno y otros organismos consumidores de hidrógeno, tales como los metanogénicos. Por ello puede ser necesario un tratamiento adicional previo a su uso para suprimir la actividad de las bacterias consumidoras de hidrógeno, y así favorecer la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno. Han sido utilizados diversos tipos de pre-tratamientos tales como, el térmico, el ácido, el básico, la aireación, el uso de 2-bromoetanosulfonato de sodio y yodopropano (Wang y Wan, 2009). Estos tratamientos consisten en someter a los cultivos mixtos a condiciones de estrés permitiendo seleccionar aquellas bacterias que experimentan una mejor adaptación a las nuevas condiciones. Este es el caso de las bacterias que forman esporas, tales como *Clostridium sp.* y *Bacillus sp.*, mientras que los organismos metanogénicos no son capaces de esporular (Cheong y Hansen, 2006). Posteriormente, las esporas formadas en condiciones de estrés pueden ser activadas cuando las condiciones son adecuadas para la producción de hidrógeno. Los costes asociados a esta etapa, de pre-tratamiento para la obtención de microorganismos productores de hidrógeno, es uno de los principales inconvenientes del proceso de fermentación oscura al considerar su aplicación en plantas de gran escala. Sin embargo, si el inóculo pre-tratado puede ser fácilmente obtenido, el coste es reducido de forma considerable. Tal es el caso de los pellets de biosólidos generados por las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR). En dichas plantas, el digerido obtenido del tratamiento anaerobio es secado térmicamente para eliminar la humedad y, de este modo, obtener un producto fácil de manejar y distribuir. La utilización de dichos pellets como inóculo en los sistemas de producción de hidrógeno ha sido evaluada por Kalogo y Bagley (2008).

La aplicación de la microflora mixta anaeróbica sin pre-tratamientos en sistemas de fermentación es otra alternativa. Una estrategia para obtener una población de microorganismos productores de hidrógeno a partir de un cultivo mixto en fermentadores en continuo, consiste en utilizar pH bajos (entre 4 y 6) y TRH cortos (inferiores a 3 días) (Gómez et al., 2006). De este modo, la proliferación de consumidores de hidrógeno, tales como los microorganismos metanogénicos, es evitada ya que dichos microorganismos son menos tolerantes a condiciones ambientales ácidas que los productores de hidrógeno y, a su vez, presentan una tasa de crecimiento baja que provoca su lavado celular del reactor cuando son empleadas velocidades de dilución altas.

Por otro lado, también han sido estudiados sistemas de producción de hidrógeno por fermentación oscura sin inoculación, aprovechando la microflora indígena presente en los residuos sólidos (Kim et al., 2009).

Los métodos de análisis microbiológico permiten determinar la estructura de la comunidad de microorganismos de cultivos mixtos durante la producción fermentativa de hidrógeno. Una de las técnicas ampliamente utilizadas para el estudio de la población de microorganismos responsables de la producción de hidrógeno es la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) (Akutsu et al., 2008; Iyer et al., 2004; Ueno et al., 2001).

#### **2.1.4.2. Sustrato.**

Muchos sustratos han sido utilizados para la producción de hidrógeno por fermentación oscura. La mayoría de los estudios han sido realizados a escala de laboratorio utilizando carbohidratos basados en compuestos modelos, principalmente glucosa, sacarosa y almidón, aunque también han sido utilizados otros como la maltosa, lactosa, galactosa, manosa y xilosa (Lin et al., 2006; Lin y Cheng, 2006). Estos estudios concluyen que en términos de velocidad de producción de hidrógeno y rendimiento por unidad de reactor, los carbohidratos constituyen la alimentación más adecuada para la producción fermentativa de hidrógeno, seguidos de las proteínas y péptidos. La producción de hidrógeno

desde los lípidos es considerada muy limitada (Okamoto et al., 2000; Lay et al., 2003; de Vrije y Claassen 2003).

Sin embargo, aunque los sustratos puros han sido ampliamente utilizados, en la actualidad los estudios de producción de hidrógeno por fermentación oscura están enfocados a la utilización de residuos orgánicos, como sustratos aptos para un proceso sostenible. El rango de residuos orgánicos que pueden ser usados es muy amplio. Los residuos de las industrias agroalimentarias poseen un gran contenido de carbohidratos en forma de azúcares simples (como glucosa, lactosa y sacarosa), almidón y celulosa. Así mismo, las aguas residuales de estas industrias son ricas en carbohidratos y también pueden ser utilizadas para producir hidrógeno. Han sido utilizadas en diferentes estudios aguas residuales de industrias lácteas, residuos de la industria de la oliva, residuos de la industria cervecera, melazas, etc. (Yokoi et al., 2001; Claassen et al., 2005; Van Ginkel et al., 2005; Kapdan y Kargi, 2006; Fang et al., 2006; Levin et al., 2006). Además, el uso de residuos de frutas y verduras como sustrato ha sido reportado en investigaciones recientes, debido a su alto contenido de carbohidratos (Venkata et al., 2009).

Por otro lado, algunos sustratos complejos no son ideales para la producción de hidrógeno por fermentación oscura debido a sus estructuras complejas, por ejemplo, los residuos constituidos por material ligno-celulósico. Sin embargo, estos residuos tras ser pre-tratados por algunos métodos pueden ser utilizados por bacterias productoras de hidrógeno. Dependiendo de la alimentación y de los microorganismos utilizados, el material puede requerir pre-tratamientos con procesos, tales como corte o aplastamiento mecánico (Okamoto et al., 2000; Kim et al 2004), hidrólisis enzimática ácida (Okamoto et al., 2000; Kadar et al 2003; Wang et al., 2003; Fang et al 2006) o esterilización (Wang et al., 2003). Por ejemplo, Zhang et al. (2007) reportó que el rendimiento de producción de hidrógeno desde residuos de tallos de maíz tras un pre-tratamiento de acidificación, fue mucho mayor que el obtenido desde residuos de tallos de maíz sin pre-tratar. Sin embargo, para que la producción de hidrógeno por fermentación oscura pueda ser considerada un proceso sostenible, los sustratos además de ser producidos a partir de recursos renovables y estar disponibles en suficiente

cantidad y/o concentración para que la producción de hidrógeno resulte favorable energéticamente, deben cumplir que los pre-tratamientos sean mínimos y de bajo coste (Bedoya et al., 2008).

### **2.1.4.3. pH del medio.**

El pH del medio afecta el rendimiento de producción de hidrógeno y el tipo de ácidos orgánicos producidos. Durante la producción de hidrógeno por fermentación oscura tiene lugar una disminución gradual del pH, la cual es debida a la producción de ácidos orgánicos que agotan la capacidad amortiguadora del sistema dando como resultado un pH bajo (Khanal, et al., 2004). Esta disminución gradual del pH inhibe la producción de hidrógeno ya que afecta a la actividad del hierro que contiene la enzima hidrogenasa e induce el desvío a rutas metabólicas que no conducen a la producción de hidrógeno (Dabrock, et al., 1992). Por lo tanto, es necesario un control activo del pH a niveles óptimos. En general el pH óptimo para la producción de hidrógeno en cultivos mesófilos está entre 5 y 6. (Fang y Liu, 2002; Khanal, et al., 2004; Chen, et a., 2001). Fang y Liu (2002) han reportado que si el pH del medio alcanza un valor de 4 a 6 la cantidad de ácido butírico es mayor que la de ácido acético, mientras que si el pH está entre 6,5 y 7 las cantidades de ácido acético y ácido butírico son semejantes. Estas observaciones indican que la preferencia hacia la formación de ácido acético y ácido butírico está influenciada por el pH. Por otro lado, en el caso de cultivos termófilos los pH óptimos están alrededor de 4,5 (Shin, et al. 2004).

La alcalinidad inherente de la alimentación contribuye a controlar el pH del reactor, pero a su vez es necesaria la adición de una solución alcalina. Así, una de las desventajas principales de los sistemas de fermentación oscura es el alto consumo de alcalinidad externa para mantener el sistema en el rango de pH deseado. Cuando los sustratos son residuos basados en carbohidratos, estos suplementos de alcalinidad pueden constituir los costes operacionales más altos. De este modo, el estudio de métodos para reducir la cantidad externa de alcalinidad es importante para la implementación a gran escala de la tecnología de producción de hidrógeno mediante sistemas de fermentación oscura. Dentro de las

estrategias estudiadas para reducir estos requerimientos están la recirculación del efluente metanogénico a la fase de producción de hidrógeno en un sistema de producción de hidrógeno y metano en dos fases (Kraemer y Vagley, 2005) y la co-fermentación de residuos (Zhu et al., 2008; Cuetos et al., 2007).

#### **2.1.4.4. Presión parcial de hidrógeno.**

La producción de hidrógeno a partir de sustratos orgánicos es limitada por la termodinámica de la reacción de las hidrogenasas, la cual implica la transferencia de electrones desde una molécula intracelular portadora de electrones hacia los protones. Los protones son pobres aceptores de electrones (potencial de óxido reducción (ORP) del  $H_2 = -14$  mV), por lo que el donante del electrón debe ser un fuerte agente reductor. La ferridoxina es una proteína sulfuro-hierro de bajo potencial redox (ORP = -400 mV), la cual es capaz de reducir los protones a hidrógeno. Otro portador de electrones intracelular importante es el NADH, ya que tiene un potencial redox más alto (ORP = -320 mV) (Angement, et al., 2004). La capacidad de reducción de la ferridoxina y el NADH para reducir los protones es determinada por el potencial redox de la reacción neta bajo condiciones reales. Si se supone que las concentraciones intracelulares son iguales tanto para las formas oxidadas como para las reducidas de la ferridoxina y del NADH, la producción de hidrógeno llega a ser termodinámicamente desfavorable cuando ocurre un aumento en la presión parcial de hidrógeno. Para la ferridoxina, la producción de hidrógeno puede continuar mientras la presión parcial de hidrógeno es menor de 0,3 atm; para el NADH, la presión parcial de hidrogeno debe ser menor a 60 Pa. Sin embargo, altas presiones parciales de hidrógeno pueden ser logradas si el cociente de la ferridoxina reducida a ferridoxina oxidada es mayor a uno. De este modo, no es inesperado encontrar concentraciones de más de 30% de hidrógeno en el espacio libre de cabeza (Angement, et al., 2004).

### **2.1.4.5. Temperatura.**

El proceso de producción de hidrógeno por vía fermentativa, al igual que otros procesos biológicos, es fuertemente dependiente de la temperatura. El incremento de la temperatura en los sistemas biológicos suele estar asociada con mayores producciones y esto es debido a que la velocidad de reacción del proceso depende de la velocidad de crecimiento de los microorganismos involucrados que a su vez, depende de la temperatura. A medida que aumenta la temperatura, en un rango apropiado y en ausencia de inhibidores, aumenta la velocidad de crecimiento de los microorganismos y el proceso de fermentación es acelerado, dando lugar a mayores producciones de gas. Esto sucede hasta llegar a una temperatura óptima para la cual la tasa específica de crecimiento es máxima ( $\mu_{max}$ ) y que depende de cada especie. A su vez, la mayoría de los organismos termofílicos (con una temperatura óptima entre 50 y 60 °C) presentan tasas específicas de crecimiento máximas mayores que los organismos mesofílicos (con una temperatura óptima entre 30 y 40 °C) (Ahring, 1995).

La mayoría de los sistemas de producción de hidrógeno por vía fermentativa descritos en la literatura operan en los intervalos mesofílico (entre 30-35°C) y termofílico (entre 50-60 °C) (Angenent et al., 2004; Kapdan y Kargi, 2006; Akutsu et al., 2008; Lee et al., 2010). La sensibilidad a los cambios de temperatura ambiental depende de diversos factores, principalmente del grado de adaptación del cultivo, del modo de operación y del tipo de reactor. Los sistemas que operan en el rango termofílico suelen ser más inestables ante cambios de temperatura. En dichos sistemas un aumento brusco de la temperatura puede provocar un importante descenso en la producción de gas, mientras que una bajada puede suponer un descenso en la producción de gas, pero completamente reversible (van Lier, 1993). Por otro lado, en los sistemas termofílicos tiene lugar una menor inhibición por producto ya que la solubilidad del hidrógeno en el líquido de reacción disminuye al aumentar la temperatura (Wang and Wan, 2009). Del mismo modo, la solubilidad del dióxido de carbono en el medio de reacción disminuye al aumentar la temperatura no favoreciendo el descenso del pH en el reactor y, por lo tanto, no contribuyendo a aumentar el consumo de alcalinidad. A

su vez, la solubilidad de la mayoría de las sales aumenta con la temperatura de manera que la materia orgánica es más accesible para los microorganismos aumentando así la velocidad del proceso. Sin embargo, si se trata de compuestos tóxicos, al aumentar su solubilidad con la temperatura son potencialmente más tóxicos, lo que puede explicar parcialmente la mayor inhibición de determinados compuestos orgánicos en el rango termofílico (Hwu et al., 1997).

Los sistemas termofílicos son especialmente apropiados para el tratamiento de materias primas que contienen agentes patógenos, o bien para ser acoplados a un proceso con calor residual asociado. De lo contrario, la entrada de energía necesaria para la operación en régimen termofílico eleva los costes de operación de forma considerable (Hawkes et al., 2007). A su vez, la tasa de hidrólisis también aumenta con la temperatura (Veeken y Hamelers, 1999), por lo que el régimen termofílico tiene gran interés al tratar residuos en los que la hidrólisis es la etapa limitante, como los residuos con alto contenido en componentes lignocelulósicos.

#### **2.1.4.6. Tiempo de retención hidráulico y velocidad de carga orgánica.**

El tiempo de retención hidráulico (TRH) indica el tiempo medio teórico que permanecen las partículas de fluido alimentadas en el interior del reactor y es igual al volumen del reactor entre el caudal del influente. En los sistemas de mezcla completa, asumiendo que no existe acumulación de sólidos, el TRH coincide con el tiempo de retención celular (TRC) definido como el tiempo medio de permanencia de los microorganismos en el sistema. Por ello el TRH debe ser suficientemente largo para permitir el desarrollo de la población bacteriana y para permitir una eficaz degradación por parte de la biomasa de los residuos alimentados. Por lo tanto, el TRH determina las poblaciones microbianas presentes en el reactor, así como el uso eficiente del sustrato (Wang y Zhao, 2009). Un estudio de la cinética de producción de hidrógeno utilizando como sustrato limitante sacarosa determinó una velocidad de crecimiento específica

máxima de  $0,172 \text{ h}^{-1}$  para los productores de hidrógeno, lo que permitió mantener en el reactor CSTR a los microorganismos productores de hidrógeno con un tiempo de retención hidráulica bajo. Por el contrario, las bacterias productoras de metano fueron lavadas del reactor debido a su baja velocidad específica de crecimiento de  $0,0167 \text{ h}^{-1}$  (Chen et al., 2001). Las bacterias requieren de un cierto tiempo para degradar la materia orgánica y su velocidad de degradación depende en gran parte de la temperatura, mientras mayor sea la temperatura, menor es el TRH para obtener una buena producción de gas y consecuentemente menores son los volúmenes de reactor necesarios para digerir un determinado volumen de material.

Por otro lado, la velocidad de carga orgánica (VCO) es la cantidad de materia orgánica que entra al sistema (expresada generalmente como Demanda Química de Oxígeno o bien como Sólidos Volátiles) por unidad de volumen del reactor y unidad de tiempo, siendo directamente dependiente de la concentración de sustrato y del TRH. Así, a medida que el TRH disminuye la VCO aumenta. El TRH junto con la VCO, determinada por el tipo de sustrato, son los principales parámetros de diseño, determinando el volumen del reactor.

## **2.2. LOS OBJETIVOS Y LA PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO.**

### ***2.2.1. Objetivo general.***

En el capítulo anterior quedó patente la necesidad de promover el uso energético de los residuos y desarrollar un modelo energético más sostenible. Bajo este contexto fue planteado este trabajo, cuyo objetivo general es el estudio de la producción de hidrógeno a partir de residuos orgánicos de alta carga, como son los residuos de comida y el permeado de suero de leche, mediante sistemas de fermentación oscura integrados en un proceso de producción continua de hidrógeno y metano en dos etapas, y utilizando cultivos mixtos como inóculo. El trabajo está centrado en el estudio del proceso a escala de laboratorio para posteriormente realizar un cambio de escala y abordar el estudio en planta piloto.

### **2.2.2. Objetivos específicos.**

Las actividades desarrolladas en este trabajo han sido realizadas con el fin de dar respuesta a los siguientes objetivos:

- ❖ Estudio de la viabilidad del uso de pellets de biosólidos generados por las plantas de tratamiento de aguas residuales como inóculo en los sistemas de fermentación oscura en régimen termofílico y en régimen mesofílico a escala de laboratorio.
- ❖ Evaluación de la producción de hidrógeno a escala de laboratorio en un bioreactor de membrana (MBR) en régimen termofílico y en régimen mesofílico, utilizando como sustrato residuos vegetales de comida.
- ❖ Estudio a escala de laboratorio del efecto, en la producción de hidrógeno y en el consumo de alcalinidad, de la recirculación al sistema de fermentación oscura de sobrenadante de la fase metanogénica con y sin previo tratamiento en un sistema de filtración con membrana.
- ❖ Estudio del proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas a escala de planta piloto con y sin recirculación de sobrenadante de la fase metanogénica al sistema de fermentación oscura, utilizando como sustrato residuos de comida.
- ❖ Evaluación del efecto del tiempo de retención hidráulico (TRH) en el rendimiento de un sistema de fermentación oscura alimentado con residuos de comida y evaluación del rendimiento de una segunda etapa metanogénica a escala de planta piloto.
- ❖ Estudio de la producción de hidrógeno en discontinuo a partir de lactosuero según el tipo de inóculo utilizado.
- ❖ Evaluación del efecto del tiempo de retención hidráulico (TRH) y la carga orgánica (CO) en el rendimiento de un sistema de fermentación oscura alimentado con lactosuero a escala semi-piloto.

- ❖ Estudio mediante la técnica PCR-DGGE de la población microbiana involucrada en la producción de hidrógeno.

### **2.2.3. Planificación del trabajo.**

En la figura 2.9 está representado el esquema general seguido en la elaboración del presente trabajo y su distribución por capítulos:

- ❖ El capítulo 3 describe los residuos empleados para los ensayos realizados en esta tesis y recoge los métodos analíticos y los parámetros analizados en la experimentación del trabajo.
- ❖ El capítulo 4 desarrolla los ensayos discontinuos llevados a cabo para estudiar la viabilidad del uso de pellets de biosólidos como inóculo en los sistemas de fermentación oscura bajo condiciones termofílicas y mesofílicas. A su vez, este capítulo incluye un estudio de la producción continua de hidrógeno utilizando pellets de biosólidos como inóculo y residuo vegetal de comida como sustrato en un bioreactor de membrana (MBR) en régimen termofílico y mesofílico.
- ❖ El capítulo 5 recoge los ensayos realizados, tanto a escala de laboratorio como a escala de planta piloto, con sistemas de fermentación oscura con recirculación de sobrenadante metanogénico utilizando como sustrato residuos de comida. El estudio a escala de planta piloto incluye la evaluación de una segunda etapa de producción de metano.
- ❖ El capítulo 6 desarrolla el estudio del efecto del tiempo de retención hidráulico en el proceso de producción de hidrógeno a partir de residuos de comida, manteniendo constante la concentración de sólidos totales de la alimentación. Así mismo, incluye el estudio de las poblaciones microbianas presentes en el reactor mediante la técnica PCR-DGGE.
- ❖ El capítulo 7 aborda el estudio a escala semipiloto de la producción de hidrógeno utilizando como sustrato lactosuero.
- ❖ El trabajo finaliza con las conclusiones generales en el capítulo 8.

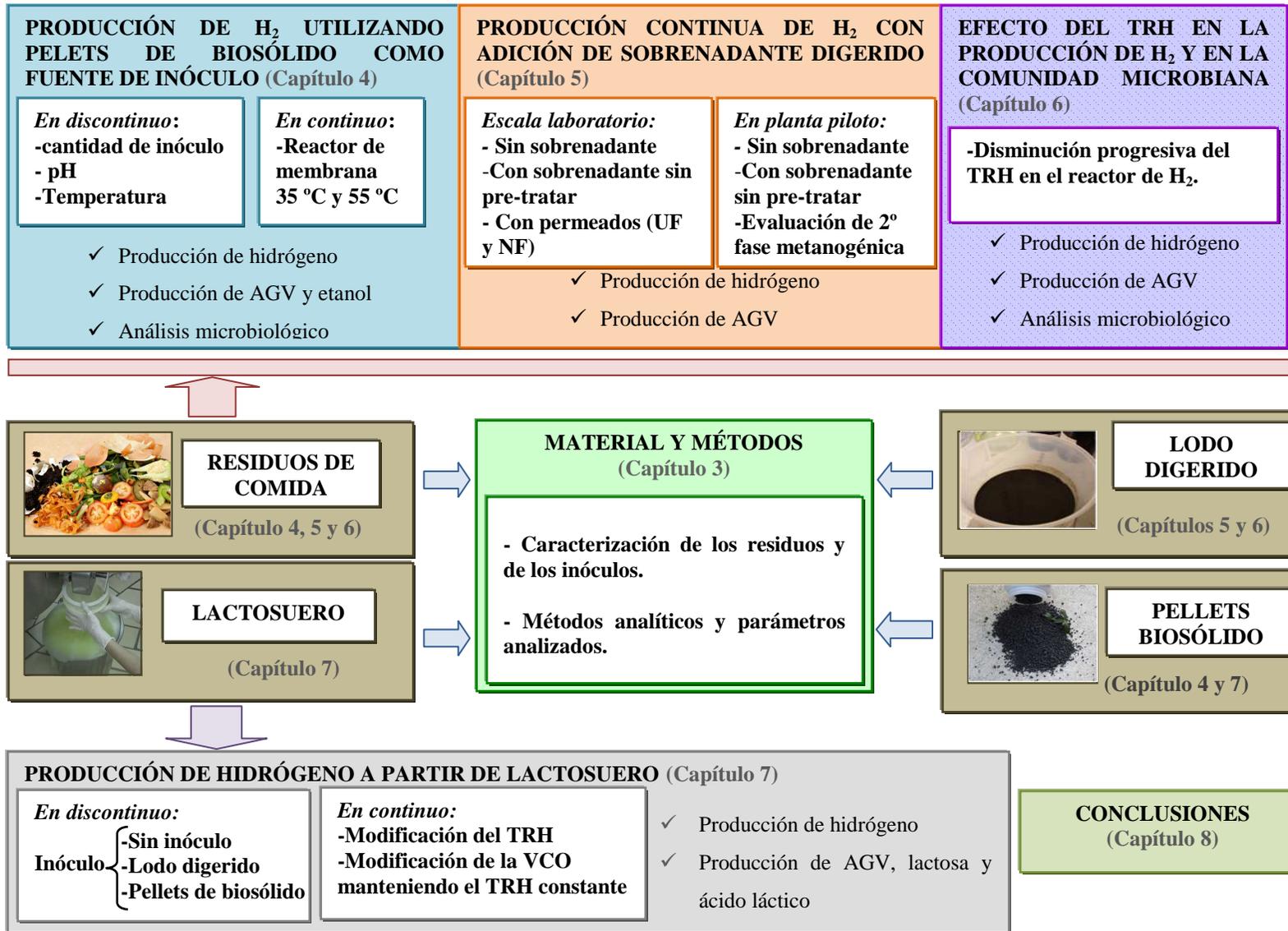


Figura 2.9. Esquema general de trabajo.

### 2.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Aceves-Lara C.A., Latrille E., Buffiere P., Bernet N. and Steyer J.-P. (2008). Experimental Determination by Principal Component Analysis of a Reaction Pathway of Biohydrogen Production by Anaerobic Fermentation. *Chemical Engineering and Processing*. Vol. 47, pp. 1968-1975.
- Ahring, B.K. (1995). Methanogenesis in thermophilic biogas reactors. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 67, pag. 91-102.
- Akutsu Y., Li Y.-Y., Tandukar M., Kubota k. and Harada H. (2008). Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 6541- 6548.
- Angenent L.T., Karim K., Al-Dahhan M.H., Wrenn B.A. and Domínguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*. Vol. 22, pp. 477-485.
- Basak N. and Das D. (2007). The prospect of Purple Non-Sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 23, pp. 31-42.
- Bedoya A., Castrillón J.C., Ramírez J.E., Vásquez J.E. and Arias M. (2008). Producción biológica de hidrógeno: Una aproximación al estado del arte. *Dyna*. Vol.75, pp. 75-154.
- Breure A.M. (1986). Hydrolysis and acidogena fermentation of protein and carbohydrates in anaerobic wastewater treatment. *Off. Setduikkerrij, Kanters B. V., Alblasserdam*.
- Boone D. R. and Xun L. (1987). Effects of pH, temperature, and nutrients on propionate degradation by a methanogenic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 53, pp. 1589-1592.
- Call D. and Logan B.E. (2008). Hydrogen production in a single chamber microbial electrolysis cell (MEC) lacking a membrane. *Environmental Science and Technology*. Vol. 42, pp. 3401-3406.
- Claassen P.A.M., Budde M.A.W., van Niel E.W.J. and de Vrije T. (2005). Utilisation of biomass for hydrogen fermentation. Ed: Lens P., Westermann P., Harberbauer M. and Moreno A. *Biofuels for fuel cells: renewable energy from biomass fermentation*. London.
- Cuetos M.J., Gómez X., Escapa A. and Morán A. (2007). Evaluation and simultaneous optimization of bio-hydrogen production using 3<sup>2</sup> factorial design and the desirability function. *Journal of Power Sources*. Vol. 169, pp. 131-139.

- Chen C.C., Lin C.Y. and Chang J.S. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as limiting substrate. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 57, pp. 56-64.
- Chen W.-M., Tseng Z.-J., Lee K.-S. and Chang J.-S. (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 30, pp. 1063-1070. .
- Chen X., Sun Y., Xiu Z. Li X. and Zhang D. (2006). Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp.539-549.
- Cheong D.-Y. and Hansen C.L. (2006). Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 72, pp. 635-643.
- Dabrock B., Bahl H. and Gottschalk G. (1992). Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 58, pp. 1233-1239.
- Das D. and Veziroglu T.N. (2001). Hydrogen production by biological process: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 26, pp. 13-28.
- De Vrije T. and Claassen P.A.M. (2003). Dark hydrogen fermentations. In: *Bio-methane and Bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production*. Ed: Reith J.H., Wiffels R.H. and Barten H. Dutch Biological Hydrogen Foundation. The Netherlands.
- Dong L., Zhenhonga Y., Yongminga S., Xiaoyinga K. and Yua Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 812-820.
- Dumitriu S. (2005). *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. Second Edition. Marcel Dekker. New York.
- Fang H., Li C.H. and Zhang T. (2006). Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 683-692.
- Fang H.H.P. and Liu H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*. Vol. 82, pp. 87-93.
- Fang H.H.P., Liu H. and Zhang T. (2002). Characterization of a Hydrogen-Producing Granular sludge. *Biotechnology Bioengineering*. Vol. 78, pp. 44-52.
- Fan Y.T, Zhang Y.H., Zhang S.F., Hou H.-W. and Ren B.-Z. (2006). Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology*. Vol. 97, pp. 500-505.

- Fermor T.R. (1993). Applied aspects of composting and bioconversion of lignocellulosic materials: an overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*. Vol. 31, pp. 87-106.
- Fountoulakis M.S. and Manios T. (2009). Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Bioresource Technology*. Vol. 100, pp. 3043-3047.
- Gómez X., Morán A, Cuetos M.J. and Sánchez M.E. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: a two phase process. *Journal of Power Sources*. Vol. 157, pp. 727-732.
- Hallenbeck P.C. (2005). Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Science and Technology*. Vol. 52, pp. 21-29.
- Hallenbeck P.C. and Benemann J.R. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 27, pp.1185-1193.
- Hanaki K., Matsuo T. and Nagase M. (1981). Mechanism of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 23, pp. 1591-1610.
- Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L. and Hussy I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 27, pp. 1339-1347.
- Hawkes F.R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R. and Hawkes D.L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 32, pp. 172-184.
- Heyndrickx M., Vos P.D., Vancanneyt M. and Ley J.D. (1991). The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 34, pp. 637-647.
- Hwu C.-S., Donlon B. and Lettinga G.(1997). Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 21, pp. 297-301.
- Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matsui T. and Nishio N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 100, pp. 260-265.
- Iyer P., Bruns M.A., Zhang H., Ginkel S.V. and Logan B.E. (2004). H<sub>2</sub>-producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 66, pp. 166-173.

- Jiménez S., Cartagena M.C. and Arce A. (1990). Influence of lignin on the methanization of lignocellulosic wastes. *Biomass*. Vol. 21, pp. 43-54.
- Kadar Z., de Vrije T., Budde M.A.W., Szengyel Z., Reczey K. and Claassen P.A.M. (2003). Hydrogen production from paper sludge hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 105-108, pp. 557-566.
- Kalogo Y. and Bagley D.M. (2008). Fermentative hydrogen gas production using biosolids pellets as the inoculum source. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 540-546.
- Kapdan I. and Kargi F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 38, pp. 569-582.
- Khanal S.K., Chen W.H., Li L. and Sung A. (2004). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 1123-1131.
- Kim D.-H., Kim S.-H. and Shin H.-S. (2009). Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme and Microbial Technology*. Technol. Vol. 45, pp. 181-187.
- Kim S.-H., Han S.-K. and Shin H.-S. (2004). Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 1607-1616.
- Kim S.-H., Han S.-K. and Shin H.-S. (2006). Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 199-207.
- Koster I.W. (1989). Toxicity in anaerobic digestion with emphasis on the effect of ammonia, sulphide and long-chain fatty acids on methanogenesis. PhD thesis, Wageningen Agricultural University.
- Kovács K.L., Maróti G. and Rákhely G. (2006). A novel approach for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 1460-1468.
- Kraemer T. and Bagley D. (2005). Continuous fermentative hydrogen production using a two-phase reactor system with recycle. *Environmental Science and Technology*. Vol. 39, pp. 3819-3825.
- Lay J.J., Fan K.S., Chang J.L. and Ku C.H. (2003). Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 28, pp. 1361-1367.
- Lee D.-Y., Ebie Y., Xu K.-Q., Li Y.-Y. and Inamori Y. (2010). Continuous H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation

- process with the recirculation of digester sludge. *Bioresource Technology*. Vol. 101, pp.42–47
- Levin B.D., Pitt L. and Love M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical applications. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 173-85.
- Levin D.B., Islam R., Cicek N. and Sparling R. (2006). Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 1496-1503.
- Lin C.H.-Y. and Cheng C.H.-H. (2006). Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 832-840.
- Lin C.H.-Y., Lee C.H.-Y., Tseng I. and Shiao I. (2006). Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 915-919.
- Lin C.Y. and Lay C.H. (2005). A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 30, pp. 285-292.
- Madigan M.T., Martinko J.M. and Parker J. (2000). *Brock Biology of microorganisms*. Octave Edition. Prentice Hall. New Jersey, USA.
- McCarty P.L., Young L.Y., Gossett J.M., Stuckey D.C. and Healy Jr, J.B. (1981). Heat treatment for increasing yields from organic materials. Ed.: Schleger H.G. and Barnene J. *Microbial Energy Conversion*. Göttingen.
- Melis A. (2002). Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 27, pp. 1217-1228.
- Morimoto M., Atsuko M., Atif A.A.Y., Ngan M.A., Fakhrul-razi A.F., Iyuke S.E. and Bakir A.M. (2004). Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 709-713.
- Najafpour G., Younesi H. and Mohamed A.R. (2004). Effect of organic substrate on hydrogen production from synthesis gas using *Rhodospirillum rubrum*, in batch culture. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 21, pp. 123-130.
- Oh S.E., Van Ginkel S. and Logan B.E. (2003). The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental Science & Technology*. Vol. 37, pp. 5186-5190.
- Okamoto M., Miyahara T., Mizuno O. and Noike T. (2000). Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes. *Water Science Technology*. Vol. 41, pp. 25-32.

- Parés R. and Juárez A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Primera Edición. Reverté S.A. Barcelona.
- Pavlostathis S.G. and Giraldo-Gomez E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Vol. 21, pp. 411-90.
- Prescott L.M., Harley J. P. and Klein D.A. (2002). *Microbiology*. Fifth Edition. McGraw Hill.
- Rodríguez F.C. y Roldán M.D. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Primera Edición. Tébar S.L. Madrid.
- Romero L.I., de la Rubia M.A., Pérez M. y Sales, D. (2002). Digestión anaerobia termofílica de lodos de EDAR. *Retema*. Vol. 90, pp. 8-22.
- Salminen E. and Rintala J. (2002). Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste-a review. *Bioresource Technology*. Vol. 83, pp. 13-26.
- Shin H.S., Youn J.H. and Kim, S.H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 1355-1363.
- Stainer R.Y., Ingraham J.L., Wheelis M.L. and Painter P.R. (1992). *Microbiología*. Reverté S.A. Barcelona.
- Turcot J., Bisailon A. and Hallenbeck P.C. (2008). Hydrogen production by continuous cultures of *Escherichia coli* under different nutrient regimes. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp.1465-1470.
- Ueno Y., Haruta S., Ishii M. and Igarashi Y. (2001). Characterization of microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 92, pp. 397-400.
- Van Ginkel S.W. and Logan B. (2005). Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*. Vol. 39, pp. 3819-3826.
- Van Ginkel S.W., Oh S.E. and Logan B.E. (2005). Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 30, pp. 1535-1542.
- Van Lier, J.B. (1993). Temperature optima of thermophilic methanogenic sludge: implications for reactor start-up and operation, en thermophilic anaerobic wastewater treatment; temperature aspects and process stability. Tesis doctoral. Universidad de Wageningen.
- Vavilin V.A., Rytov S.V., Lokshina L.Y., Rintala J.A. and Liveratos G. (2001). Simplified hydrolysis models for the optimal design of two-stage anaerobic digestion. *Water Research*. Vol. 35, pp. 4247-51.

- Veeken A. and Hamelers B. (1999). Effect of temperature on hydrolysis rates of selectes biowaste components. *Bioresource technology*. Vol. 29, pag. 249-254.
- Venkata M.S., Lalit B.V. and Sarma P.N. (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*. Vol 99, pp. 59-67
- Venkata M.S, Mohanakrishna G., Goud R.K. and Sarma P.N. (2009) Acidogenic fermentation of vegetable based market waste to harness biohydrogen with simultaneous stabilization. *Bioresource Technology*. Vol. 100, pp. 3061-3068.
- Vignais P.M., Mgnin J-P and Willisin J.C. (2006). Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 1478-1483.
- Vijayaraghavan K. and Soom M. (2006). Trends in bio-hydrogen generation. A review. *Environmental Sciences*. Vol. 3, pp. 255-271.
- Wang C.C., Chang C.W., Chu C.P., Lee D.J., Chang B.V. and Liao C.S. (2003). Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Journal of Biotechnology*. Vol. 102, pp. 83-92.
- Wang J. and Wan W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp.799-811.
- Wang X. and Zhao Y.-C. (2009). A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 245-254.
- Yokoi H., Saitou A., Uchida H., Hirose J., Hayashi S. and Takasaki Y. (2001). Microbial Hydrogen Production from Sweet Potato Starch Residue. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol.91, pp.58-63.
- Yokoy H., Mori M., Hirose J., Hayashi S. and Takasaki Y. (1998). Hydrogen production from starch by mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sp. M 19*. *Biotechnology Letters*. Vol. 20, pp. 895-899.
- Zhang M.-L., Fan Y.-T., Xing Y., Pan C.-M., Zhang G.-S. and Lay J.-J. (2007). Enhanced biohydrogen production from cornstalkwastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 31, pp. 250-254.
- Zhu H., Parker W., Basnar R., Proracki A., Falletta P., Béland M. and Seto P. (2008). Biohydrogen production by anaerobic co-digestion of municipal food waste and sewage sludges. *International Journal of Hydrogen*. Vol. 33, pp. 3651-3659.
- Zinder S.H. (1984). Microbiology of anaerobic conversion of organic wastes to methane: recent developments. *ASM News*. Vol. 50, pp. 294-8.

*3. MATERIALES EMPLEADOS Y  
MÉTODOS ANALÍTICOS*

---



En este capítulo están recogidas las descripciones de los residuos empleados en los procesos de producción de hidrógeno por fermentación oscura, así como la metodología general empleada para la cuantificación de los parámetros analizados en los capítulos 4, 5, 6 y 7 de esta tesis. Los detalles de la metodología específica utilizada en cada capítulo están descritos en el apartado de material y métodos correspondiente a cada uno de ellos.

### **3.1. MATERIALES UTILIZADOS.**

#### ***3.1.1. Características de los inóculos empleados.***

Han sido utilizados dos tipos de inóculo para obtener microflora productora de hidrógeno: lodo digerido anaeróbicamente y pellets de biosólido (Kalogo y Bagley, 2008), ambos procedentes de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) de la ciudad de León. La caracterización del lodo digerido está recogida en la tabla 3.1.

El **lodo digerido** utilizado como inóculo procede de la EDAR de la ciudad de León (con capacidad para 150.000 habitantes equivalentes), donde la digestión anaerobia es realiza en digestores primarios de 4.000 m<sup>3</sup> de volumen unitario a una temperatura de 35 °C. Este lodo presenta una concentración promedio del 3-5% de sólidos totales (ST) y un porcentaje de sólidos volátiles (SV) en torno al 70% respecto a los sólidos totales. La cantidad de metales pesados y micro-elementos del lodo está dentro de los rangos recogidos en la Legislación Española (R.D. 1310/90).

**Tabla 3.1. Características químicas del lodo digerido utilizado como inóculo.**

<i>Parámetros</i>	<b>Lodo</b>
<b>Carbono orgánico (% bs)</b>	18,2
<b>Materia orgánica (% bs)</b>	31,3
<b>Nitrógeno total (% bs)</b>	4,2
<b>Relación C/N</b>	4,4
<b>Fósforo total (% bs)</b>	1,8
<b>Calcio (% bs)</b>	3,3
<b>Magnesio (% bs)</b>	0,5
<b>Potasio (% bs)</b>	0,8
<b>Sodio (mg/kg bs)</b>	856,0
<b>Hierro (mg/kg bs)</b>	22,1
<b>Manganeso (mg/kg bs)</b>	381,0
<b>Zinc (mg/kg bs)</b>	895,0
<b>Cobre (mg/kg bs)</b>	181,0
<b>Boro (mg/kg bs)</b>	75,0
<b>Mercurio (mg/kg bs)</b>	1,5
<b>Plomo (mg/kg bs)</b>	81,0
<b>Níquel (mg/kg bs)</b>	30,0
<b>Cadmio (mg/kg bs)</b>	0,9
<b>Cromo (mg/kg bs)</b>	91,0

bs: base seca.

También han sido utilizados como inóculo **pellets de biosólido** procedentes de la EDAR de la ciudad de León que cuenta con un sistema de secado térmico para la eliminación de humedad del lodo digerido. Dichos pellets tienen un tamaño de partícula entre 2 y 5 mm, y son obtenidos tras someter los lodos digeridos en una EDAR y previamente deshidratados (con un porcentaje de sólidos totales entre el 20 y el 40%), a un proceso de secado térmico a 110-115 °C durante al menos 75 minutos, incrementándose la concentración de sólidos en torno al 90% de sólidos totales.

### ***3.1.2. Características de los residuos de comida utilizados.***

En este trabajo fueron utilizados dos tipos de mezclas consistentes en residuos de comida. En los ensayos a escala de laboratorio la alimentación fue elaborada con los residuos generados en una frutería y consiste en una mezcla que contiene únicamente frutas y verduras (A1). En cambio en los estudios en planta piloto fue necesario un volumen importante de alimentación y por ello fue utilizada una mezcla con una composición fija elaborada a partir de alimentos frescos (A2), de este modo fueron eliminadas las interferencias que podría provocar la falta de homogeneidad en las sucesivas preparaciones de la alimentación de los reactores. Esta alimentación contiene además de frutas y verduras, pan, carne y pescado de forma que cada componente tiene una contribución fija en el contenido en sólidos totales (ST) de la mezcla. Así, la pera constituye un 10% del contenido en sólidos totales de la mezcla, la manzana un 10%, el plátano un 9%, el Kiwi un 6%, la cebolla un 5%, la zanahoria un 5%, la lechuga un 5%, la berza un 10%, la patata un 15%, el pan un 10%, la carne un 10% y el pescado un 5%. Esta composición está basada en los constituyentes que habitualmente son usados para elaborar los residuos de alimentos empleados como sustratos en los diferentes estudios realizados sobre el proceso de fermentación oscura (Tenca et al., 2011; Gómez et al., 2006). La carne y el pescado fueron añadidos con el fin de alcanzar un contenido similar de nitrógeno a los reportados para las composiciones de residuos de alimentos (Shin et al., 2004). En su conjunto los componentes utilizados representan los carbohidratos,

la celulosa, las proteínas, los lípidos y los materiales lignocelulósicos presentes habitualmente en la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) (Dong et al., 2009).

Las mezclas fueron trituradas usando una picadora profesional Sammic SK-3 para conseguir un tamaño de partícula alrededor de 3 mm, y homogeneizadas con el fin de preparar la alimentación para los sistemas de fermentación. Posteriormente, fueron conservadas a -18 °C hasta ser utilizadas. Antes de ser utilizadas en los ensayos, las alimentaciones fueron descongeladas durante toda una noche bajo condiciones ambientales (25 °C). Posteriormente las mezclas fueron diluidas con agua desionizada hasta la concentración de ST deseada. El sustrato así preparado fue almacenado a 4 °C.

Las principales características de las alimentaciones elaboradas están recogidas en la tabla 3.2 y la figura 3.1 muestra las fotografías de los dos inóculos utilizados y de los residuos de comida A1.

**Tabla 3.2. Analítica general de las mezclas de comida utilizadas como alimentación.**

<i>Parámetro</i>	<b>A1</b>	<b>A2</b>
<b>Carbono orgánico (% bs)</b>	32,8	39,5
<b>Materia orgánica (% bs)</b>	73,4	88,3
<b>Nitrógeno total (Kjeldahl) (% bs)</b>	1,3	2,7
<b>Relación C/N</b>	32,1	18,9
<b>Contenido en lípidos (% bs)</b>	1,0	4,9
<b>Contenido en proteínas (% bs)</b>	9,7	16,9
<b>Contenido en carbohidratos(% bs)</b>	70,1	78,2
<b>pH</b>	4,6	5,0
<b>ST (g/L)</b>	60,0	28,2
<b>SV (g/L)</b>	55,2	25,9
<b>DQO (g/L)</b>	50,0	31,5
<b>Amonio (mg/L)</b>	126,5	12,1

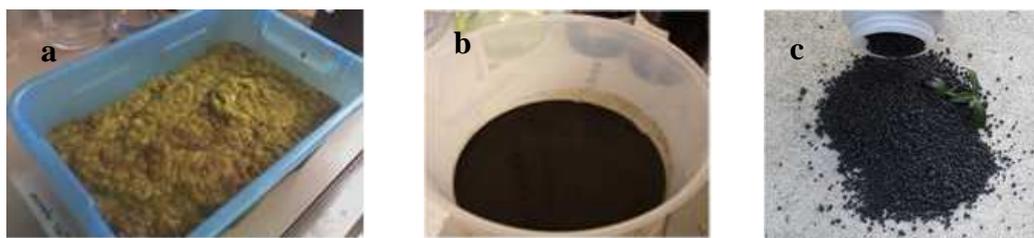
bs: base seca

### 3.1.3. Características del lactosuero.

El sustrato utilizado para los ensayos fue proporcionado por el Grupo SETA. Consiste en un permeado obtenido tras someter a un proceso de ultrafiltración tangencial el lactosuero generado durante el proceso de elaboración de quesos y que posteriormente es concentrado mediante un proceso de ósmosis inversa. Dicho sustrato fue almacenado a 4 °C hasta su utilización y en la tabla 3.3 están recogidas sus características. Para preparar las alimentaciones el permeado de lactosuero fue diluido con agua desionizada hasta la concentración de DQO deseada en cada caso.

**Tabla 3.3. Características del lactosuero (LS) utilizado.**

Parámetro	LS
pH	6,5
ST (g/l)	166
SV (g/l)	152
DQO (g/L)	170
Alcalinidad (mg/l)	1260
Amonio (mg/l)	57,9
Lactosa (g/L)	102
Ácido láctico (g/L)	0,12
Cl <sup>-</sup> (mg/l)	2486
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/l)	562
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	< 50
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/l)	2761
Na <sup>+</sup> (mg/l)	3191
K <sup>+</sup> (mg/l)	833
Ca <sup>++</sup> (mg/l)	820
Nitrógeno total (Kjeldahl) (mg/L)	613



**Figura 3.1.** Fotografías de los residuos de comida A1 (a) y los inóculos utilizados (b) lodo digerido, (c) pellets de biosólido.

#### ***3.1.4. Descripción de la planta piloto utilizada para la producción de hidrógeno y metano en dos etapas.***

La planta piloto descrita a continuación fue diseñada para la producción de biogás mediante digestión anaerobia en fase oscura y en doble etapa, a partir de residuos orgánicos. Dicha planta consta de tres reactores de acero tipo 316 L:

- ❖ *Reactor 1* → es utilizado para almacenar la alimentación y consiste en un tanque agitado y encamisado de 20 litros. Un circuito externo de refrigeración tipo HIROSS ICE-005 STD de 2,98 kW (10730 kJ/h) permite mantenerlo a baja temperatura (en torno a 7 °C) para reducir la velocidad de degradación biológica del residuo almacenado.
- ❖ *Reactor 2* → consiste en un reactor de mezcla completa de 5 litros con agitación mecánica y termostatzado, donde tiene lugar la primera etapa de fermentación. Un circuito externo de calefacción/enfriamiento permite regular la temperatura de operación del reactor. El control de temperatura está gestionado por un controlador digital instalado en el cuadro de control (EUROTHERM 3208) que permite la entrada de agua fría de red o la entrada de agua caliente (procedente de un calentador SIEMENS) al circuito de recirculación de agua de la camisa del reactor. Los gases generados en esta primera etapa de fermentación son medidos mediante un caudalímetro de impulsos. El control del pH consta de un electrodo con membrana de vidrio y gel resistente a altas temperaturas (JUMO tecLine for HT). El control de pH está gestionado por un controlador digital

instalado en el cuadro de control (JUMO dTrans pH01) que acciona una bomba peristáltica (WATSONMARLOW 101U/R) para la dosificación de solución ácida/alcalina.

- ❖ *Reactor 3* → consiste en un reactor de mezcla completa de 30 litros con agitación mecánica y termostatzado, donde tiene lugar la segunda etapa de digestión. Un circuito externo de calefacción/enfriamiento, independiente pero análogo al del reactor 2, permite regular la temperatura de operación del reactor. Los gases generados en esta etapa son también medidos mediante un segundo caudalímetro de impulsos.

La temperatura interna de los tres reactores es medida mediante una termoresistencia tipo Pt-100. La agitación es controlada mediante un variador de frecuencia instalado en el cuadro de control.

Los tres reactores están instalados en serie. El trasvase de fluido de un reactor al siguiente es realizado mediante un sistema de inyección neumático que consta de una válvula neumática de 3 vías, una jeringa de acero inoxidable de volumen variable (volumen máximo 7,5 ml), una rótula de interconexión entre el vástago de la jeringa y el cilindro y un cilindro neumático para el accionamiento del vástago de la jeringa. Existen tres sistemas de inyección diferentes:

- ❖ *Inyector 1* → aspira fluido del reactor 1 y lo descarga en el reactor 2.
- ❖ *Inyector 2* → aspira fluido del reactor 2 y lo descarga en el reactor 3.
- ❖ *Inyector 3* → aspira fluido del reactor 3 y lo descarga al exterior.

Un cuadro eléctrico de control y un ordenador personal donde está instalado un software específico (Labview), permiten el control y la adquisición de datos del proceso.

Las figuras 3.2 y 3.3 recogen la fotografía y el esquema de componentes de la planta piloto descrita, respectivamente.



Figura 3.2. Fotografía de la planta piloto para la producción de hidrógeno y metano.

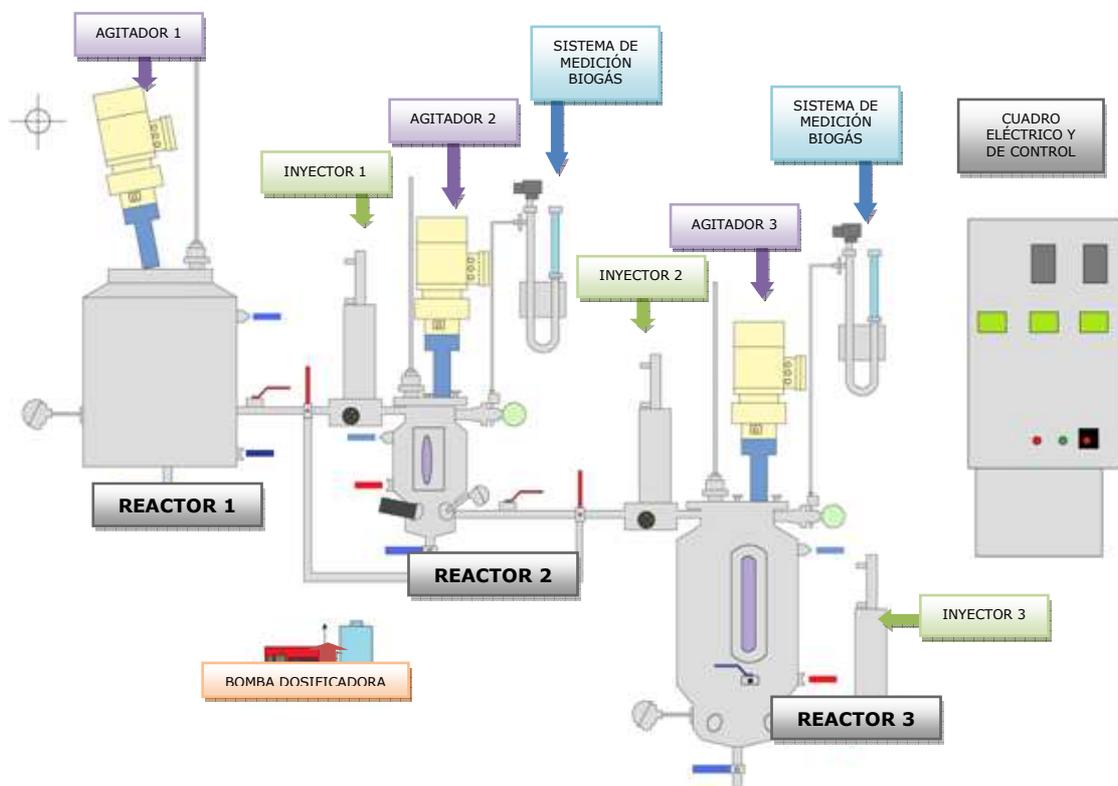


Figura 3.3. Esquema de los componentes de la planta piloto.

## **3.2. ANÁLISIS RUTINARIOS.**

Durante el proceso de producción de hidrógeno fueron llevados a cabo una serie de análisis de modo periódico para el control del proceso: pH, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), demanda química de oxígeno (DQO), alcalinidad, producción y composición del biogás y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV). Todos ellos fueron medidos de modo general dos veces por semana, a excepción de la producción de gas que fue medida diariamente.

En los ensayos con lactosuero fueron medidos el ácido láctico y la lactosa dos veces por semana. El amonio fue medido dos veces por semana en los ensayos en los que fueron utilizadas alimentaciones con un contenido proteico importante (alimentación A2 y LS).

La medida de pH, de los sólidos totales y volátiles, de la demanda química de oxígeno, de la alcalinidad y del amonio fue llevada a cabo según los Métodos estandarizados (APHA, 1998).

### ***3.2.1. Medida de pH.***

Las medidas de pH fueron llevadas a cabo directamente mediante un pHmetro CRISON modelo GLP22.

### ***3.2.2. Sólidos totales y volátiles.***

Los sólidos totales (ST) están definidos como el contenido en materia seca en la muestra después de 48 horas a 105 °C (o peso constante). Los ST proporcionan una estimación del contenido de materia orgánica e inorgánica en la muestra. Los sólidos volátiles (SV) son la fracción de materia sólida que puede ser oxidada y llevada a gas a 550 °C durante 24 horas (o peso constante), es decir, una aproximación de la fracción orgánica de la materia seca determinada a 105 °C. La diferencia entre los ST y los SV es la fracción inerte (mineral), principalmente asociada a la materia inorgánica.

Para determinar los sólidos totales fueron tomados 10 mL de muestra homogeneizada y dispuestos en un crisol tarado previamente ( $P_0$ ), a continuación fueron llevados a una estufa Memmert a 105 °C hasta evaporación total durante 24 horas. Después de enfriar la muestra en el desecador fue pesada hasta peso constante, obteniendo el valor  $P_1$  en gramos. Para determinar la cantidad de sólidos totales, con los valores  $P_0$  y  $P_1$  fue utilizada la siguiente expresión:

$$ST = \frac{P_1 - P_0}{V} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde  $ST$  son los sólidos totales (g/L),  $P_0$  y  $P_1$  son la tara y el peso seco (g), respectivamente, y  $V$  es el volumen de la muestra (L).

Para determinar la cantidad sólidos totales volátiles, los crisoles fueron colocados en una mufla Hobersal 12 PR/300 8B para calcinación de las muestras durante 60 minutos a 550 °C, dejándolos enfriar posteriormente en el desecador hasta temperatura ambiente. Ya fríos fueron pesados obteniendo los valores  $P_2$  en gramos para determinar los sólidos totales volátiles, aplicando la expresión:

$$SV = \frac{P_1 - P_2}{V} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

donde  $SV$  son los sólidos volátiles (g/L),  $P_1$  y  $P_2$  son el peso seco y el peso calcinado (g), respectivamente, y  $V$  es el volumen de la muestra (L).

### **3.2.3. Demanda química de oxígeno.**

La demanda química de oxígeno (DQO) es un parámetro que mide la cantidad de sustancias, orgánicas e inorgánicas, susceptibles de ser oxidadas por medios químicos que hay disueltas o en suspensión en una muestra líquida. Está expresada en miligramos de oxígeno diatómico por litro ( $\text{mgO}_2/\text{l}$ ). Esta medida pretende determinar principalmente la concentración de materia orgánica pero sufre interferencias por la presencia de sustancias inorgánicas susceptibles de ser oxidadas (sulfuros, sulfitos, yoduros, etc.).

La DQO fue determinada por el método titulométrico tras una digestión ácida de la muestra en presencia de dicromato a 150 °C durante 2 horas en un reactor Hanna C9800. Las soluciones de digestión fueron preparadas con dicromato 0,25N, ácido sulfúrico concentrado y sulfato de plata como catalizador, posteriormente fue añadido el volumen de muestra correspondiente en cada caso. Después de la digestión, y tras dejar enfriar la solución a temperatura ambiente, fue realizada la valoración del dicromato que no fue reducido utilizando sulfato ferroso amónico 0,125N (sal de Mohr:  $(\text{SO}_4)_2\text{Fe}(\text{NH}_4)_2$ ) como valorante y ferroína como indicador. La ferroína reacciona con el exceso de  $\text{Fe}^{2+}$  que a su vez no ha reaccionado con el dicromato, dando lugar a un complejo de color marrón/rojizo que indica el punto final de la valoración. Esto permite determinar la cantidad de dicromato consumido en la reacción y calcular la materia orgánica oxidable en términos de equivalentes de oxígeno. De la misma forma fueron sometidos a digestión y posteriormente titulados dos blancos preparados con los reactivos mencionados y un volumen de agua destilada igual al de la muestra. También fue realizada la estandarización del valorante a diario frente a la solución de digestión utilizando dicromato 0,125N. La normalidad del valorante fue determinada a través de la expresión 3.3:

$$N = \frac{V_{\text{dicromato}} \cdot 0,125}{V_{\text{salMohr}}} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

donde  $V_{\text{dicromato}}$  es el volumen de dicromato utilizado en la estandarización del valorante (mL) y  $V_{\text{salMohr}}$  es el volumen de Sal de Mohr gastado en su titulación (mL).

La DQO de la muestra fue calculada según la expresión 3.4:

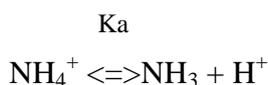
$$DQO(\text{mgO}_2/\text{l}) = \frac{(A - B) \cdot N \cdot 8000 \cdot F}{V_{\text{muestra}}} \quad (\text{Ec. 3.4})$$

donde  $A$  es el volumen de valorante gastado en la titulación del blanco (mL),  $B$  es el volumen de valorante gastado en la titulación de la muestra (mL),  $N$  es la normalidad del valorante,  $F$  el factor de dilución de la muestra y  $V_{\text{muestra}}$  es el volumen de muestra utilizado (mL).

Fue analizada la DQO soluble (DQO<sub>s</sub>) tras centrifugar la muestra a 7800 rpm durante 6 min y someter el sobrenadante obtenido a filtración utilizando un filtro de celulosa de 0,45 micrómetros. Cuando fue inevitable el retraso antes del análisis, las muestras fueron conservadas a 4 °C previa acidificación a un pH inferior o igual a 2 unidades utilizando ácido sulfúrico concentrado.

### 3.2.4. Amonio.

El amonio fue medido mediante el método de electrodo selectivo, con un pHionómetro 692 de METROHM S.A., empleando un electrodo selectivo para el ión amonio (No 133/1e) y una sonda de temperatura. Las muestras fueron previamente centrifugadas durante 5 minutos a 5100 rpm. La concentración de amoniaco fue calculada a partir del equilibrio amonio-amoniaco:



En este trabajo fue considerado como amoniaco total la suma de las especies  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NH}_3$  medidas, y fue calculada la concentración de amoniaco libre ( $\text{NH}_3$ ) según las expresiones 3.5 y 3.6 (Hansen et al., 1998; Calli et al., 2005).

$$A_{\text{libre}} = \frac{A_{\text{total}}}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad (\text{Ec. 3.5})$$

donde  $A_{\text{libre}}$  es el amoniaco libre (mg/L),  $A_{\text{total}}$  es el amoniaco total (mg/L),  $pK_a$  es la constante de disociación para el ión amonio y  $pH$  el valor de las unidades de pH.

$$pK_a = 0,09018 + \frac{2729,92}{T + 273,15} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde  $pK_a$  es la constante de disociación para el ión amonio ( $pK_a$  tiene un valor de 8,95 a 35 °C) y  $T$  la temperatura (°C).

### 3.2.5. Alcalinidad.

La alcalinidad de un líquido es su capacidad para neutralizar ácidos y constituye la suma de todas sus bases titulables. Para calcular la alcalinidad fueron tomados 5 mL de la muestra homogeneizada, previamente centrifugada 5 minutos a 5100 rpm, y posteriormente fue diluida a 50 mL con agua destilada. La muestra así preparada fue valorada con HCl 0,2N hasta pH 4,3. La alcalinidad total fue obtenida a partir de la siguiente expresión:

$$Alc = \frac{A.N.50000}{V} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

donde *Alc* es la alcalinidad (mg CaCO<sub>3</sub>/L), *A* es el volumen de ácido estándar utilizado (mL), *N* es la normalidad del ácido estándar, y *V* es el volumen de la muestra (mL).

### 3.2.6. Cromatografía de gases.

La composición del biogás producido y la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y de etanol en el medio de reacción fueron analizadas por cromatografía de gases (GC, gas chromatography analysis).

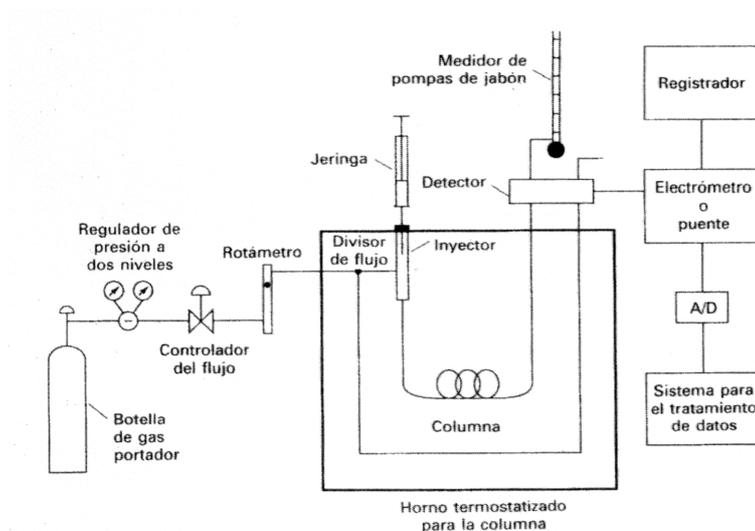
La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra es disuelta en una fase móvil, que pasa a través de una fase estacionaria inmisible, la cual está fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las dos fases son elegidas de tal forma que los componentes de la muestra son distribuidos de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria presentan un movimiento lento con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que son unidos débilmente a la fase estacionaria presentan un movimiento rápido. La cromatografía puede ser empleada para la

identificación cualitativa y para la determinación cuantitativa de las especies separadas.

La cromatografía de gases abarca todos los métodos cromatográficos en los que la fase móvil es un gas. En la cromatografía gaseosa (gas-líquido), la muestra es vaporizada en un puerto de inyección en la cabeza de la columna de cromatografía. La muestra es transportada a través de la columna por un gas inerte (fase móvil). La columna en sí misma contiene un líquido como fase estacionaria, el cual está adsorbido sobre la superficie de un sólido inerte.

Los componentes básicos de un instrumento para la cromatografía de gases se muestran en la figura 3.4:

- ❖ *Gas portador* → son utilizados gases inertes como helio, argón, nitrógeno, hidrógeno, etc. Su única función es transportar el analito.
- ❖ *Sistema de inyección de muestra* → son utilizados microjeringas o válvulas de inyección para introducir la muestra en el sistema cromatográfico.
- ❖ *Columnas* → existen dos tipos de columnas, empaquetadas y capilares, que presentan diferencias fundamentalmente en su longitud y diámetro.
- ❖ *Horno* → las columnas deben estar dentro de un horno termostático, ya que la temperatura de la columna es un parámetro muy importante.
- ❖ *Detectores* → existen diferentes tipos de detectores, los más extendidos y utilizados son el detector de ionización de llama (FID, flame ionization detector) y el detector de conductividad térmica (TCD, thermal conductivity detector), aunque también son empleados otros (detector termoiónico, de captura de electrones, de emisión atómica, de fotoionización, etc.).



**Figura 3.4.** Esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo de gases.

### 3.2.6.1. Composición del biogás.

La composición del gas ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  y  $\text{O}_2$ ) obtenido de los reactores fue medida mediante cromatografía gaseosa con un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 GC, equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). La columna utilizada fue HayeSep Q 80/100 de 4 m de longitud seguida de una columna de tamiz molecular de 1 m de longitud Molecular Sieve 13 x 80/100 Mesh (1,0 m x 1/8" x 2,0 m). Las columnas separan metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ). El gas portador utilizado fue helio y las columnas operaron a 331 kPa y una temperatura de 50 °C.

### 3.2.6.2. Sulfuro de hidrógeno.

La concentración de sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) en el gas fue medida con un cromatógrafo de gases Varian CP-3800 GC equipado con un detector fotométrico de llama pulsada (PFPD, pulsed flame photometric detector). La columna utilizada fue una columna capilar de 60 m de longitud FA-II Fused silica de Varian. El gas portador fue helio y las temperaturas del inyector y del detector fueron de 220 y 300 °C, respectivamente.

### **3.2.6.3. Ácidos grasos volátiles.**

Los ácidos grasos volátiles (AGV) fueron determinados en un cromatógrafo Varian CP-3800 GC, con un detector de ionización de llama (FID) equipado con una columna capilar Nukol (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) de Supelco. El gas portador empleado fue helio. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220 y 250 °C, respectivamente. La temperatura del horno fue mantenida a 150 °C durante 3 min y después fue incrementada a 180 °C. El sistema fue calibrado con una mezcla de ácidos volátiles estándar de Supelco (para análisis de los ácidos grasos C2-C7). Las muestras previamente fueron centrifugadas (10 min, 3500 rpm) y el sobrenadante filtrado con filtros de celulosa de 0,45  $\mu$ m.

### **3.2.6.4. Etanol.**

El etanol fue determinado en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL equipado con un automuestreador, con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de sílica fundida de pared recubierta (WCOT, Wall Coated Open Tubular) suministrada por Varian, de 50 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno con recubrimiento CP-WAX 57CB DF=0,2. El gas portador empleado fue helio a un flujo de 1 mL/min que corresponde a presión de 27 psi. La temperatura del inyector y del detector fue en ambos casos 250 °C. La temperatura del horno fue mantenida a 60 °C durante 2 min y después fue incrementada, a razón de 5° por minuto, hasta 180 °C durante 8 minutos. El Split utilizado fue 35 mL/min y el volumen de inyección fue 2  $\mu$ L. El sistema fue calibrado mediante el método del patrón interno utilizando ciclohexanona como patrón interno en una concentración 10mM. El disolvente empleado para la preparación de los estándares fue agua. Las muestras previamente fueron centrifugadas (10 min, 3500 rpm) y el sobrenadante filtrado con filtros de celulosa de 0,45  $\mu$ m.

### 3.2.7. Cromatografía líquida de alta resolución.

La lactosa y el ácido láctico fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, high-performance liquid chromatography).

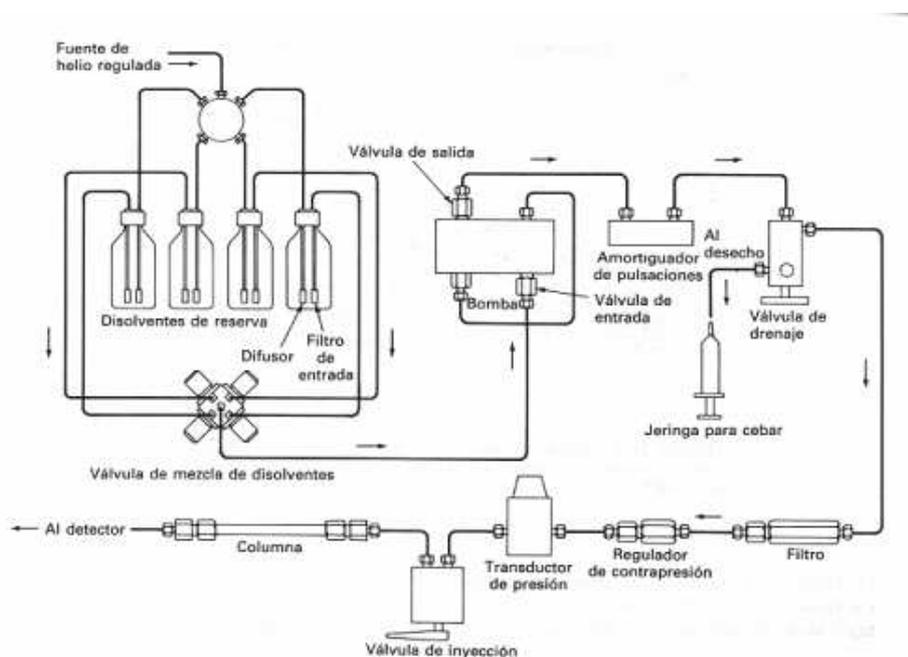
La cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas de separación más ampliamente utilizada debido a su versatilidad y a su amplio campo de aplicación. Los componentes de la muestra, previamente disueltos en un disolvente adecuado (fase móvil), son forzados a atravesar la columna cromatográfica gracias a la aplicación de altas presiones. El material interno de la columna (fase estacionaria) está constituido por un relleno capaz de retener de forma selectiva los componentes de la mezcla. La resolución de esta separación depende de la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil, pudiendo ser manipulada a través de la elección de diferentes mezclas disolventes y distintos tipo de relleno. Como resultado final los componentes de la mezcla salen de la columna separados en función de sus tiempos de retención en lo que constituye el cromatograma. A través del cromatograma puede ser realizada la identificación cualitativa y cuantitativa de las especies separadas.

Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida de alta resolución puede ser:

- ❖ *Cromatografía de adsorción* → la fase estacionaria es un sólido, es utilizada casi exclusivamente sílica y en mucha menor medida alúmina.
- ❖ *Cromatografía de reparto* → en casi todos los casos, como fase estacionaria son utilizados compuestos unidos químicamente a un soporte sólido de sílica. Puede ser subdividida en cromatografía en fase normal y fase reversa. En la cromatografía en fase normal, la fase fija es polar (como por ejemplo agua o trietilenglicol) y los compuestos menos polares eluyen primero. En la cromatografía en fase reversa, el compuesto unido químicamente es un hidrocarburo alifático y son empleadas fases móviles polares. En este caso, las sustancias más polares eluyen primero.

- ❖ *Cromatografía iónica* → utiliza columnas rellenas con resinas de intercambio iónico para separar y determinar iones.
- ❖ *Cromatografía de exclusión por tamaño* → la fase fija está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros y llevan a cabo un fraccionamiento relacionado con el tamaño molecular. Las moléculas de tamaño mayor son excluidas y eluyen primero, mientras que las más pequeñas que penetran en los poros son retenidas más tiempo.

La figura 3.5 muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.



**Figura 3.5. Esquema de los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.**

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución consta de uno o más recipientes para la fase móvil. Además, existe un desgasificador para eliminar los gases disueltos en los solventes ya que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección. La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando consiste en una mezcla, un sistema de bombas es programado

para tomar solventes de diferentes botellas en una proporción determinada y realizar la mezcla en una cámara de mezclado.

El sistema de bombas envía el solvente hacia la válvula inyectora que permite introducir en el flujo de solvente la muestra contenida en un aro o loop de volumen calibrado. El sistema de inyección introduce la muestra en la columna. En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica, es colocada delante una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. Además, la precolumna sirve para saturar la fase móvil con la fase estacionaria y así minimizar las pérdidas de ésta en la columna analítica. La composición del relleno de la precolumna debe ser semejante al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partícula es por lo común mayor para minimizar la caída de presión. Por otro lado, la mayoría de los equipos llevan hornos para las columnas que permiten trabajar a temperatura superior a la ambiente. Después de la separación en la columna analítica, los componentes de la mezcla pasan por el detector. Este produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia y esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo (cromatograma).

Los detectores en cromatografía de líquidos son de dos tipos básicos. Los detectores basados en una propiedad de la disolución responden a una propiedad de la fase móvil, tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que es modificada por la presencia de los analitos. Por contraste, los detectores basados en una propiedad del soluto responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia ultravioleta, fluorescencia, o intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil. En concreto los detectores de índice de refracción miden la diferencia de índice de refracción, entre el disolvente que en su camino hacia la columna pasa a través de una mitad de la cubeta y el efluente de la columna que pasa por la otra mitad. Los dos compartimentos están separados por una placa de vidrio montada a un ángulo de modo que si las dos disoluciones difieren en el índice de refracción es producida la desviación de un haz de luz incidente. El desplazamiento del haz con respecto a la superficie fotosensible del detector provoca una variación de la señal de salida, la cual, una vez amplificada y registrada, proporciona el cromatograma. Los

detectores de índice de refracción tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos. Es decir, son detectores universales análogos a los detectores de llama en cromatografía de gases. Además, son fiables y no dependen del caudal. Sin embargo, son muy sensibles a los cambios de temperatura, y han de ser mantenidos a una temperatura constante.

### **3.2.7.1. Ácido láctico y lactosa.**

La lactosa y el ácido láctico fueron determinados mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Alliance 2690 de Waters equipado con un sistema de inyección de muestra y de impulsión de la fase móvil y con un detector de índice de refracción 2414 de Waters. La columna utilizada fue PL Hi-Plex H 8 $\mu$ m, suministrada por Varian, de 300 mm de longitud y 7,7 mm de diámetro. También fue utilizada una precolumna PL Hi-Plex H Guard, suministrado por Varian, de 50 mm de longitud y 7,7 mm de diámetro. Ambas formadas a base de resina monodispersa para análisis de carbohidratos (relleno monodisperso de estireno sulfonado y copolímero divinilbenzeno de tamaño de partícula 8  $\mu$ m). La fase móvil consistió en una mezcla formada por 50% de fase A y 50% de fase B, siendo la fase A H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en agua en concentración 0,01M, y la fase B agua. El flujo de la fase móvil fue 0,4 mL/min. La columna fue termostaticada a 60 °C y el carro con las muestras a 4 °C. El detector fue utilizado en el modo 410 con un valor de sensibilidad de 4 a una temperatura de 40 °C. El volumen de inyección fue 10  $\mu$ L. Las muestras previamente fueron centrifugadas (20 min, 7800 rpm) y el sobrenadante filtrado con filtros de celulosa de 0,2  $\mu$ m. El sistema fue calibrado mediante el método del patrón externo construyendo una curva de calibrado para cada uno de los compuestos analizados, inyectando distintas disoluciones de concentración conocida. El disolvente empleado para la preparación de los estándares fue agua.

### 3.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

El análisis de la comunidad bacteriana implicada en la producción de hidrógeno por fermentación oscura fue realizado utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polimerase Chain Reaction) acoplada a la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

El método requiere la extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) de la muestra ambiental para obtener una mezcla que contenga el ADN de todas las especies bacterianas presentes. Este ADN es utilizado como molde en una PCR con cebadores específicos (primers) para amplificar un fragmento concreto de una región variable de interés taxonómico. Así es obtenida una mezcla de fragmentos de ADN representativos de todas las especies presentes en la muestra ambiental. Todos estos fragmentos tienen el mismo tamaño, aunque diferente secuencia de nucleótidos por lo que quedan separados en una DGEE originando un patrón de bandas característico de la muestra ambiental. Primero, los fragmentos de ADN sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida bajo condiciones de desnaturización progresiva (con concentraciones crecientes de formamida y urea) migran como moléculas de cadena doble. Más adelante, y a causa de la composición cambiante del gel, las moléculas son desnaturizadas en pequeños segmentos denominados dominios de desnaturización o fusión. A medida que la molécula de ADN es desnaturizada, la doble hélice es abierta y pasan a ser cadenas simples formando una estructura ramificada. Esta estructura, así modificada, reduce la capacidad de las moléculas para moverse a través del gel. El punto en que el ADN es desnaturizado depende de la secuencia de los nucleótidos en la región afectada. Por consiguiente, la ubicación final de las moléculas en el gel depende de la secuencia nucleótidos de los fragmentos.

Una condición indispensable para someter una molécula de ADN a una DGGE es que tenga una cola rica en las bases nitrogenadas guanina y citosina (G y C) en uno de sus extremos. Para ello dicha cola es añadida en el extremo 5' de uno de los cebadores utilizados durante la PCR. La unión entre este tipo de bases nitrogenadas es a través de puentes de hidrógeno, por lo que es necesario un

ambiente desnaturizante alto para separar la doble hélice. De este modo, la cola de guanina y citosina evita la desnaturización del ADN por ambos extremos, lo cual provocaría la formación de moléculas difíciles de separar en el gel, y evita la desnaturización completa de la doble hélice de ADN, que supondría que la separación de los fragmentos no sería función de la secuencia de nucleótidos.

Los perfiles obtenidos en la DGGE están caracterizados por el número, posición e intensidad relativa de las bandas, donde cada banda representa una especie diferente. Las bandas individuales representan aquellos ADNs que han frenado su migración por el gel al ser desnaturizados por completo (excepto la cola de GC). Para conseguir una visión completa de la composición y diversidad de la comunidad microbiana, las bandas aisladas pueden ser recortadas, reamplificadas y secuenciadas. También puede ser realizado un estudio estadístico de la estructura de la comunidad según la posición e intensidad de las bandas. Además, una vez establecido la relación de un cierto organismo con una banda en particular, puede ser realizado un buen seguimiento de las fluctuaciones existentes en una población microbiana. Sin embargo, la DGGE también tiene limitaciones intrínsecas a las técnicas moleculares, incluso en condiciones de gradiente optimizado pueden aparecer bandas únicas que representen a varios organismos diferentes. Asimismo, existen microorganismos que generan más de una banda debido a la existencia de copias diferentes de genes de ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) en el mismo organismo.

### ***3.3.1. Extracción, purificación y cuantificación del ADN.***

La extracción y purificación de ADN fue realizada utilizando el kit comercial Powersoil<sup>TM</sup> DNA Isolation Kit Sample (MO BIO Laboratories), específico para la extracción de ADN de Bacterias y Arqueas a partir de muestras de suelo, y procediendo tal y como indica el fabricante. Posteriormente, fue realizada la comprobación de la extracción de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% respecto a un marcador de 1Kb. Las muestras fueron almacenadas hasta su análisis a -18 °C.

### 3.3.2. Amplificación de ADN mediante PCR.

La PCR es una técnica que permite amplificar un fragmento de ADN de interés, es decir, obtener *in vitro* un gran número de copias de dicho fragmento. Para ello son necesarios unos primers o cebadores (secuencias de unos 20 nucleótidos complementarios a los extremos del fragmento de ADN que hay que amplificar), deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), un buffer adecuado, una enzima de polimerización de ADN (Taq Polimerasa) y un cofactor de la enzima ( $MgCl_2$ ). Dicha enzima sintetiza una nueva hebra de ADN a partir de los primers y usando como molde el ADN de interés o template. El fundamento de la PCR consiste básicamente en la repetición cíclica de tres pasos:

- ❖ Desnaturalización → consiste en la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que hay que amplificar.
- ❖ Hibridación o annealing → consiste en la unión de los primers a su secuencia complementaria en el molde de ADN.
- ❖ Extensión → la enzima polimerasa usando el ADN en forma de cadena sencilla puede empezar a incorporar dNTPs en el extremo 3' del cebador y sintetizar así una nueva cadena de ADN.

Cada uno de estos tres pasos está definido para un periodo de tiempo determinado y en su conjunto forman un ciclo. La repetición sucesiva de estos ciclos permite obtener un gran número de copias del fragmento de ADN. La figura 3.6 recoge un esquema del proceso:

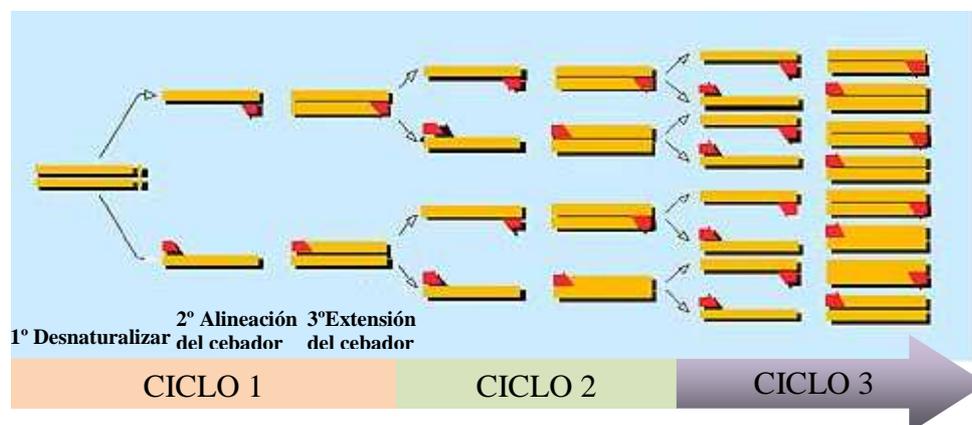


Figura 3.6. Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

En este trabajo la población bacteriana fue estudiada amplificando por PCR la región variable 3 (V3) del gen 16S ARNr (correspondiente a las posiciones 357-518, según la numeración del gen 16S ARNr en *Escherichia coli*). Los primers utilizados fueron el F357-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'), el cual contiene una cola de guanina y citosina, y el R518 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'), ambos son primers universales para el dominio Bacteria, (Muyzer et al., 1993; Van Hannen et al., 1999) y permiten la amplificación de un fragmento de 161 pares de bases del gen 16S ARNr.

La PCR fue realizada en un termociclador Perkin-Elmer 9700 y los reactivos utilizados y sus concentraciones están detallados en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4. Reactivos utilizados en la PCR (volumen final 50 µL).**

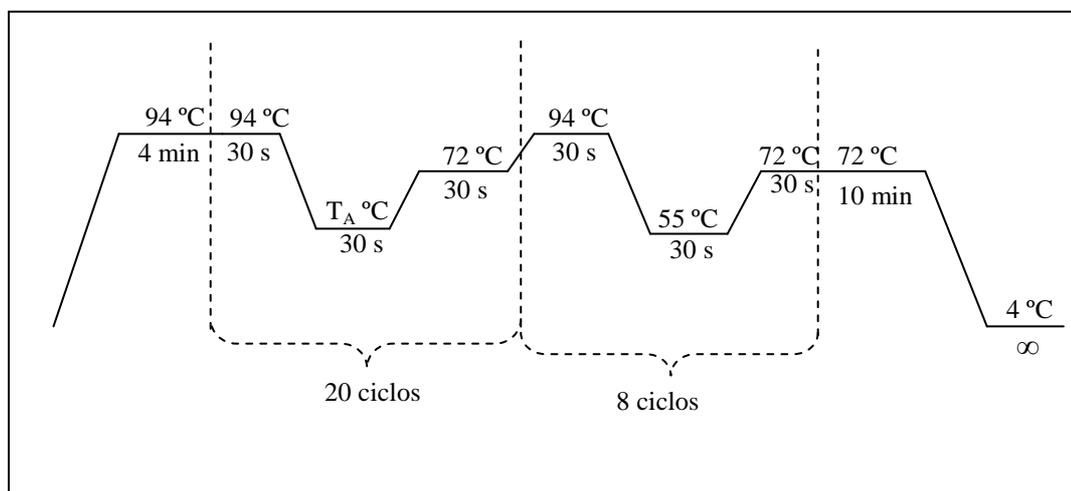
<i>Reactivos</i>	<b>Concentración o cantidad</b>
<b>PCR-Buffer 10X (sin MgCl<sub>2</sub>)<sup>1</sup></b>	1x
<b>Solución MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1,5mM
<b>dNTPs 10mM (2,5mM de cada uno)</b>	200 µM de cada uno
<b>Cebador R518 (85 µM)</b>	2 µM
<b>Cebador F357-GC (10 µM)</b>	2 µM
<b>Taq ADN Polimerasa (Eppendorf®)</b>	2 U
<b>ADN molde</b>	100 ng
<b>Agua Milli-Q</b>	Hasta los 50 µL

<sup>1</sup> 100mM Tris-HCl, pH 8.3 at 25 °C; 500mM KCl

El programa de PCR utilizado fue un programa de amplificación con rampa decreciente de temperaturas denominado “Touch down”. Está basado en comenzar la reacción de PCR a temperaturas altas, evitando así amplificaciones inespecíficas, para ir bajando progresivamente la temperatura de hibridación una vez copiadas las primeras secuencias. Un esquema del programa está representado en la figura 3.7. El programa consta de un ciclo de pre-incubación a 94 °C durante 4 minutos, después son realizados 28 ciclos comenzando a 94 °C durante 30

segundos (desnaturalización), después mantiene la temperatura de hibridación ( $T_A$ ) durante 30 segundos (hibridación) y finaliza a 72 °C durante 30 segundos (extensión). En los primeros 20 ciclos la temperatura de hibridación disminuye a razón de 1 °C cada dos ciclos, desde 65 °C en el primer ciclo hasta 56 °C en el ciclo veinte. En los últimos ocho ciclos la temperatura de hibridación fue 55 °C. El programa termina con una incubación durante 10 minutos a 72 °C.

El producto de la PCR fue examinado mediante electroforesis convencional en gel de agarosa al 1% (p/v) y tinción con bromuro de etidio para ser visualizados en una lámpara de luz ultravioleta.



**Figura 3.7.** Esquema del programa PCR utilizado ( $T_A$  es la temperatura de hibridación que disminuye 1 °C cada dos ciclos).

### 3.3.3. Separación de los productos de PCR mediante DGGE.

El DGGE es una técnica electroforética en geles de poliacrilamida que permite separar moléculas diferentes de ADN, de hasta 700 pares de bases, según su secuencia y no solamente según el tamaño molecular, pudiéndose separar moléculas con tan sólo una base de diferencia en condiciones de gradiente de concentración optimizado de formamida-urea (Muyzer et al., 1993). La separación de las moléculas de ADN es debida a su migración por el gel de poliacrilamida con concentraciones crecientes de los agentes desnaturalizantes formamida y urea,

lo que genera diferentes horquillas de desnaturalización, según la secuencia de las moléculas de ADN, traducándose en una reducción de la velocidad de migración y una separación en diferentes bandas de migración electroforética.

En este trabajo los productos de PCR fueron analizados por DGGE en su variante paralela, es decir, aquélla en la que la migración electroforética y el gradiente desnaturalizante siguen la misma dirección. El aparato utilizado fue el DCode™ Universal Mutation Detection System (Biorad®) y fue utilizado un separador de 1 mm de espesor para hacer el gel.

Fueron utilizados geles de poliacrilamida al 8% (ratio de acrilamida a bis-acrilamida 37,5:1) y un gradiente de formamida-urea en un rango del 40% (parte superior del gel) al 60% (parte inferior del gel). El 100% de formamida-urea está definido en una concentración de urea 7M y una concentración de formamida desionizada del 40% p/v. Para ello fue necesario disponer de dos soluciones stock al 8% (p/v) de acrilamida con 1X TAE (Tris base 40mM, acetato sódico 20mM y EDTA 1mM equilibrado a pH 7,4), uno de las cuales presenta un 0% de contenido desnaturalizante y la otra presenta un 80% de contenido desnaturalizante. Un 0% de agente desnaturalizante representa acrilamida al 8% (p/v) en TAE x1 sin urea ni formamida. La composición de ambas soluciones está recogida en la tabla 3.5. y fueron conservadas a 4 °C hasta su utilización en frascos de vidrio envueltos en papel de aluminio.

Una vez preparadas las soluciones stock del 0% y del 80% en sustancias desnaturalizantes, fueron preparadas las soluciones al 40% y al 60% para generar un gradiente desnaturalizante comprendido entre estos valores. La composición de ambas soluciones está recogida en la tabla 3.6. Ambas soluciones contienen TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina) y APS (persulfato de amonio) que son compuestos que facilitan la polimerización de la acrilamida, por lo que no son adicionados hasta el momento de preparar el gel. La solución de APS fue preparada al 10% (p/v) en agua milli-Q y almacenada en alícuotas independientes de un solo uso a -18 °C hasta su utilización. El TEMED fue conservado a 4 °C. Ambas soluciones fueron cargadas al sistema formador de gradientes para formar el gel entre los cristales siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo,

finalmente fue introducido suavemente el peine formador de los pocillos (figura 3.8). El gel así elaborado polimerizó durante al menos 2 horas en posición vertical, estático a temperatura de laboratorio (25 °C). Durante este tiempo fue calentada la cubeta de electroforesis rellena con 7,5 litros de tampón TAE 1X hasta alcanzar los 60 °C.

**Tabla 3.5. Composición de las soluciones *stock* de acrilamida al 8% necesarias para preparar los geles desnaturizantes.**

<b>Stock 0%</b> (8% acrilamida en TAE 1X con 0% agentes desnaturizantes)	
<b>40% Acrylamide (37,5: 1 acrylamide:bis-acrylamide)</b>	20 mL
<b>TAE 50X<sup>1</sup></b>	2 mL
<b>Agua Milli-Q</b>	Hasta 100 mL
<b>Stock 80%</b> (8% acrilamida en TAE 1X con 80% agentes desnaturizantes)	
<b>40% Acrylamide (37,5: 1 acrylamide:bis-acrylamide)</b>	20 mL
<b>TAE 50X<sup>1</sup></b>	2 mL
<b>Urea (7M)</b>	33,6 g
<b>Formamida desionizada (40% p/v)</b>	32 mL
<b>Agua Milli-Q</b>	Hasta 100 mL

<sup>1</sup>242g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial; 100 ml de EDTA 0,5M (pH 8) y hasta 1000 ml de agua milli-Q.

**Tabla 3.6. Composición de las soluciones al 40% y al 60% de sustancias desnaturizantes.**

<i>Reactivos</i>	<b>60 %</b>	<b>40 %</b>
<b>Stock 80%</b>	6,6 ml	4,4 ml
<b>Stock 0%</b>	2,2 ml	4,4 ml
<b>TEMED</b>	8 µl	8 µl
<b>APS (10% p/v)</b>	45 µl	45 µl



**Figura 3.8. Fotografía en el momento en que el peine es colocado en el gel.**

Después del gelificado el peine fue extraído y los pocillos fueron lavados con el buffer TAE 1X. El sistema formador de gel fue colocado sobre la pieza de sujeción e introducido el conjunto en la cubeta de electroforesis que contiene 7,5 litros de buffer TAE 1X a 60 °C (figura 3.9). A continuación, las muestras (producto de PCR) fueron cargadas en los pocillos del gel, el volumen de muestra cargado fue 20  $\mu$ l que contiene 4  $\mu$ l de tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilen-cianol 0,25% (p/v); glicerol 30% (p/v)). El gel fue corrido con las siguientes condiciones electroforéticas: 100 V durante 16-18 horas (toda la noche) a 60 °C.



**Figura 3.9. Fotografía del equipo DCode™ Universal Mutation Detection System (Biorad®) durante la electroforesis.**

Una vez finalizada la electroforesis los geles son teñidos con bromuro de etidio durante 20 minutos y después lavados con TAE 1X y finalmente con agua milli-Q. Las bandas de ADN fueron visualizadas con un transiluminador UV (302 nm) y fueron fotografiadas con una cámara fotográfica a la que está acoplado un filtro naranja especial para fotografiar geles teñidos con bromuro de etidio.

### ***3.3.4. Análisis de las bandas de DGGE: reamplificación y secuenciación.***

Las bandas de DGGE más predominantes fueron recortadas para su posterior estudio e incubadas durante 24 horas a 4 °C en 40 µl de agua milli-Q. De este modo, el ADN del gel difundió al agua. Posteriormente fueron utilizadas alícuotas de 2µl del sobrenadante como ADN molde para una reamplificación por PCR. Los cebadores utilizados fueron el R518 y el F357 (sin cola de guanina y citosina), el programa y las condiciones de PCR coinciden con las antes utilizadas (descritas en el punto 3.3.2.). El ADN producto de la PCR fue purificado antes de la secuenciación para eliminar las interferencias que los cebadores y los nucleótidos incorporados durante la PCR pueden originar en la reacción de secuenciación. Para ello fue utilizado el Kit ExoSAP-IT (Amersham Biosciences). El ADN amplificado y purificado fue examinado por electroforesis convencional en geles de agarosa.

El siguiente paso realizado fue la secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados. Los métodos de secuenciación permiten “leer” el código genético de un microorganismo, es decir, determinar la secuencia de bases de un determinado fragmento de ADN previamente amplificado por PCR. Posteriormente, la secuencia de ADN obtenida fue comparada con bases de datos para averiguar la identidad de dicho microorganismo. En este trabajo la secuenciación fue realizada por el servicio de secuenciación del Instituto de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. El aparato utilizado fue el Secuenciador MEGABACE 500 (Amersham Biosciences actualmente GE Healthcare) utilizando el protocolo de secuenciación con oligonucleótidos marcados “Dyenamic et dye terminator kit” (Amersham Biosciences actualmente GE Healthcare).

Una vez recibidas las secuencias fueron alineadas y preparadas utilizando el software MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versión 3.1). Posteriormente, para la identificación de las especies, fueron buscadas similitudes con otras secuencias disponibles en la base de datos de ADN microbiano GenBank (del NCBI, National Center for Biotechnology Information) mediante el programa NeucleotidoBLASTsearch.

### 3.4. BIBLIOGRAFÍA.

- A.P.H.A. (1998), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20<sup>th</sup> ed., American Public Health Association, Washington, DC, USA, 1998.
- B.O.E. (1990). Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de lodos de depuración del sector agrario. *Boletín Oficial del Estado*, 1 de noviembre de 1990, 262, pp. 32339-40.
- Calli B., Mertoglu B., Inanc B. and Yigun O. (2005). Effects of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. *Process Biochemistry*. Vol. 40, pp. 1285-92.
- Dong L., Zhenhong Y., Yongming S., Xiaoying K. and Yu Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 812-820.
- Gómez X., Morán A., Cuetos M.J. and Sánchez M.E. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: a two phase process. *Journal of Power Sources*. Vol. 157, pp. 727-732.
- Hansen K.H., Angelidaki I. and Ahring B.K. (1998). Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research*. Vol. 38, pp. 5-12.
- Kalogo Y. and Bagley D.M. (2008). Fermentative hydrogen gas production using biosolids pellets as the inoculum source. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 540-546.
- Muyzer G., Dewaal E.C. and Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59, pp. 695-700.
- Shin H.S., Youn J.H. and Kim S.H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 1355-1363.
- Tenca A., Schievano A., Perazzolo F., Adani F. and Oberti R. (2011). Biohydrogen from thermophilic co-fermentation of swine manure with fruit and vegetable waste: maximizing stable production without pH control. *Bioresource Technology*. Vol. 102, pp. 8582-8588
- Van Hannen E.J., Mooij W., van Agterveld M.P., Gons H.J. and Laanbroek H.J. (1999). Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental

system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65, pp. 2478-2484.



*4. PRODUCCIÓN DE  
HIDRÓGENO UTILIZANDO PELLETS  
DE BIOSÓLIDO COMO FUENTE DE  
INÓCULO*

---



## **4.1. INTRODUCCIÓN.**

### ***4.1.1. Producción de hidrógeno con residuos de comida.***

Los residuos de comida son residuos alimenticios y de cocina procedentes de hogares, restaurantes, servicios de restauración colectiva y establecimientos de consumo al por menor, y residuos comparables procedentes de plantas de transformación de alimentos. Representan uno de los residuos orgánicos más importantes generados por nuestra sociedad, y contienen altos niveles de carbohidratos, además de proteínas y lípidos. Dichos constituyentes orgánicos, especialmente los carbohidratos, constituyen un potencial sustrato para la producción fermentativa de hidrógeno (Chong et al., 2009; Dong et al., 2009).

Dong et al. (2009) estudiaron la producción de hidrógeno a partir de compuestos individuales que habitualmente están presentes en la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU), mediante experimentos en discontinuo a 37 °C y utilizando un inóculo mixto. Para ello seleccionaron siete materiales orgánicos (arroz, patata, lechuga, carne, aceite, grasa y hojas de platanero) y estudiaron su producción de hidrógeno. La mayor producción de hidrógeno fue observada con los sustratos basados en carbohidratos, arroz, patata y lechuga (134 mL/g SV, 106 mL/g SV y 50 mL/g SV, respectivamente). El menor rendimiento obtenido con los carbohidratos celulósicos (lechuga) respecto a los carbohidratos amiláceos (arroz, patata) fue atribuido a que la producción de hidrógeno a partir de los primeros necesita de una etapa de hidrólisis que requiere tiempo. En el caso de los sustratos basados en proteínas (carne) no fue detectado hidrógeno y la producción de hidrógeno obtenida a partir de los sustratos lipídicos (aceite y grasas) y lignocelulósicos (hojas de platanero) fue mucho menor que con los sustratos basados en carbohidratos (6,25 mL/g SV con aceite; nada de hidrógeno fue producido a partir de la grasa y 1,75 mL/g SV con hojas de platanero). Del mismo modo, Lay et al. (2003) observaron que el potencial de producción de hidrógeno de residuos orgánicos ricos en carbohidratos fue aproximadamente 20 veces superior al de residuos ricos en lípidos y proteínas (huevo y carne). A su vez, Li et al. (2009) no observó producción de hidrógeno cuando utilizó carne como sustrato para la producción de hidrógeno por fermentación. En su conjunto los resultados de estos estudios indican que los carbohidratos constituyen un sustrato óptimo para la producción de hidrógeno, comparados con proteínas, lípidos y lignocelulosas.

Respecto al rendimiento máximo del proceso de producción de hidrógeno por fermentación oscura, solamente el 33% de la demanda química de oxígeno (DQO) contenida en los residuos (considerando glucosa) puede ser transformada en hidrógeno (considerando que cada mol de glucosa es fermentada a dos moles de acetato, dos moles de dióxido de carbono y cuatro moles de hidrógeno) (Kalogo y Bagley, 2008). El resto es transformada principalmente en ácidos grasos volátiles (AGV – ácido acético y ácido butírico-) (Bartacek et al., 2007). Por lo general, la demanda química de oxígeno (DQO) transformada en hidrógeno

está por debajo del 20% que corresponde a una media de 2,5 mol hidrógeno/mol de glucosa (Antonopoulou et al., 2008).

#### ***4.1.2. Obtención de microorganismos productores de hidrógeno.***

Uno de los principales inconvenientes del proceso de fermentación oscura para producir hidrógeno está relacionado con el coste asociado a las etapas necesarias para la obtención de microorganismos productores de hidrógeno. La aplicación de la microflora anaeróbica sin pre-tratamientos en sistemas de fermentación es una alternativa que está cobrando especial interés al considerar su aplicación en plantas de gran escala, al igual que el uso de residuos como sustrato. La ventaja de utilizar microflora anaeróbica reside en la disponibilidad del inóculo cuando el proceso de producción de hidrógeno va a ser acoplado a un proceso de digestión en dos etapas. Experiencias que no contemplan un tratamiento previo del inóculo han sido reportadas como exitosas (Gómez et al., 2006; Liu et al., 2006; Cuetos et al., 2007). Gómez et al. (2009) estudiaron el rendimiento de dos microfloras productoras de hidrógeno obtenidas de diferentes cultivos anaerobios. Uno de los inóculos utilizados fue obtenido de un digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas (EDAR), el otro inóculo procedía de un digestor a escala de laboratorio que trataba residuos de matadero. El inóculo aclimatado a los residuos de matadero proporcionó los mejores resultados en términos de estabilidad. Cuando fue utilizado el inóculo procedente de la EDAR, el rendimiento (en términos de estabilidad) del sistema de fermentación pudo ser mejorado reduciendo la carga orgánica y por medio de la agitación. En este sentido, los autores observaron que, en las condiciones evaluadas, la agitación favoreció la estabilidad concluyendo que cuando este inóculo es utilizado para arrancar un reactor a gran escala, la agitación es un importante factor a tener en consideración en el diseño del sistema para mejorar el rendimiento.

Otra opción para reducir costes durante el arranque de un sistema de producción de hidrógeno consiste en utilizar pellets de biosólido, obtenidos a partir de lodo digerido de una EDAR, como fuente de inóculo. Kalogo y Bagley

(2008) estudiaron el uso de dichos pellets como inóculo en los sistemas de producción de hidrógeno en discontinuo, obteniendo resultados similares al inocular con pellets de biosólidos y con inóculo anaerobio pre-tratado térmicamente.

#### ***4.1.3. Efecto de la temperatura en la producción de hidrógeno.***

El incremento de la temperatura en los sistemas biológicos suele estar asociada con mayores rendimientos. En el caso de la digestión anaerobia, los sistemas termofílicos presentan una mayor producción específica de metano y son capaces de digerir una mayor carga de residuos en un tiempo menor, en comparación con los sistemas mesofílicos. Estas ventajas redundan en una reducción en el volumen del reactor y, por lo tanto, en el coste de la inversión. En cuanto a la producción de hidrógeno también cabe esperar incrementos en el volumen de gas generado asociado con la mayor velocidad de producción de los microorganismos termofílicos y adicionalmente, también cabe esperar una menor inhibición por producto ya que la solubilidad del hidrógeno en el agua disminuye al aumentar la temperatura.

La producción de hidrógeno bajo régimen termofílico ha sido estudiada por diversos autores, utilizando sustratos simples como glucosa (Cheong y Hansen, 2007) y xilosa (Lin et al., 2007) o residuos (Valdez-Vazquez et al., 2005; O-Thong et al., 2007; Lee et al., 2010). Dado que la tasa de hidrólisis también aumenta con la temperatura (Veeken y Hamelers, 1999), el régimen termofílico tiene gran interés al tratar residuos en los que la hidrólisis es la etapa limitante, como los residuos con alto contenido en componentes lignocelulósicos. De este modo, O-Thong et al. (2007) estudiaron la producción de hidrógeno a partir de residuos de aceite de palma en régimen termofílico utilizando un inóculo mixto, dicho sustrato es difícil de degradar bajo condiciones mesofílicas debido a su contenido en componentes lignocelulósicos. Valdez-Vazquez et al. (2005) evaluaron la influencia de la temperatura de operación (condiciones mesofílicas frente a condiciones termofílicas) en la producción de hidrógeno utilizando la

fracción orgánica de residuos sólidos urbanos (FORSU) como sustrato. El porcentaje de hidrógeno más alto fue alcanzado en régimen termofílico (58% frente a 42% en régimen mesofílico).

Lee et al. (2010) estudiaron la producción de hidrógeno en régimen termofílico a partir de residuos vegetales de cocina y analizaron la comunidad microbiana implicada en el proceso. En este estudio especies de los géneros *Clostridium* y *Thermoanaerobacterium* fueron relacionadas con la producción de hidrógeno. Aunque algunas especies de *Clostridium* son termofílicas hay estudios que indican que el género *Thermoanaerobacterium* puede ser más efectivo que el género *Clostridium* en condiciones termofílicas para la producción de hidrógeno. O-Thong et al. (2008) aislaron *Thermoanaerobacterium thermosaccharoliticum* y estudiaron su producción de hidrógeno observando un rendimiento de hidrógeno más alto (2,53 mol de H<sub>2</sub> / mol de glucosa) que cuando fue utilizado *Clostridium thermocellum* a 60 °C (1,95 mol de H<sub>2</sub> / mol de glucosa) (Levin et al., 2006). A su vez, Shin et al. (2004) también detectaron la predominancia de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolytium* y *Desulfotomaculum geothermicum* en cultivos termofílicos acidógenos.

#### **4.1.4. Producción de hidrógeno en biorreactores de membrana (MBR).**

Convencionalmente, la producción de hidrógeno por fermentación oscura ha sido llevada a cabo en reactores continuos de tanque agitado (CSTR). En estos sistemas las velocidades de utilización del sustrato y de producción de hidrógeno están limitadas por la cantidad de biomasa retenida en el sistema ya que el tiempo de retención de sólidos (TRS) es igual al tiempo de retención hidráulico (TRH). Esto lleva asociado un problema operativo basado en la escasa retención de biomasa cuando es operado en condiciones de alta velocidad de dilución (por ejemplo, con bajos TRH), resultando en el lavado de células del sistema que origina una baja producción de hidrógeno y una deficiente conversión del sustrato. De este modo, la retención de células en el reactor es un método prometedor para mejorar la producción de hidrógeno ya que permite mantener un TRS alto con un

TRH bajo. Un sistema de células inmovilizadas ofrece consumos de sustratos altos, conduciendo a altas producciones volumétricas de hidrógeno con TRH bajos (Chang y Lin, 2004; Lee et al., 2004, 2006b).

La retención de biomasa mediante filtración con membranas constituye uno de los procesos más importantes en la gestión de aguas residuales orgánicas. La combinación de un reactor biológico con una membrana (biorreactor de membrana, MBR) ha sido utilizada en el tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales, y ofrece ventajas entre las que están una alta calidad del efluente, la retención de la biomasa y la eliminación de sólidos y materia orgánica (Keith y Tom, 1995). Estudios previos han demostrado que la retención de células suspendidas en el reactor usando la tecnología de membranas proporciona una mejora significativa de la producción volumétrica de hidrógeno en comparación con un reactor CSTR (Oh et al., 2004; Lee et al., 2007). Lee et al. (2009) también comprobaron que la producción de hidrógeno en un MBR fue aproximadamente 2,6 veces más alta que la observada en un CSTR a un TRS extremadamente pequeño. Sin embargo, un obstáculo importante en el uso de MBR para la producción de hidrógeno por fermentación oscura es el crecimiento de bacterias consumidoras de hidrógeno o no productoras de hidrógeno, incluyendo bacterias metanógenicas y acidogénicas, durante TRS altos (Hawkes et al., 2007; Kim et al., 2008).

## **4.2. OBJETIVOS.**

El objetivo general de este capítulo es el estudio del potencial de utilización de los pellets de biosólido como fuente de inóculo en los sistemas de producción de hidrógeno por fermentación oscura a escala de laboratorio, en régimen mesofílico y en régimen termófilo y utilizando como sustrato residuos vegetales de comida.

Entre los objetivos específicos están los siguientes:

- ❖ Evaluación mediante ensayos en discontinuo del efecto de la cantidad de inóculo añadida al sistema, del pH inicial y de la temperatura sobre la producción de hidrógeno y ácidos grasos volátiles (AGV) asociada a la población microbiana generada a partir de pellets de biosólido.
- ❖ Evaluación del efecto de la temperatura sobre la producción de etanol asociada a la población microbiana generada a partir de pellets de biosólido.
- ❖ Estudio mediante la técnica PCR-DGGE de la población microbiana generada a partir de pellets de biosólido e involucrada en la producción de hidrógeno en régimen mesofílico y termofílico utilizando como sustrato residuos vegetales de comida.
- ❖ Determinación de la producción de hidrógeno y de AGV asociada a la población microbiana generada a partir de pellets de biosólido en un biorreactor de membrana (MBR) operando en régimen mesofílico y en régimen termofílico y utilizando como sustrato residuos vegetales de comida.

### **4.3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### ***4.3.1. Metodología experimental.***

Este capítulo contempla tres grupos de ensayos para la producción de hidrógeno por fermentación oscura a escala de laboratorio. Los dos primeros fueron realizados en discontinuo y en ellos fue evaluada la capacidad de los pellets de biosólido para actuar como fuente de inóculo bajo diferentes condiciones operacionales en relación a la cantidad de inóculo añadida al sistema y las condiciones de pH y temperatura. En el tercer ensayo fue evaluada la

producción continua de hidrógeno utilizando pellets de biosólido como inóculo en un bioreactor de membrana (MBR).

La alimentación utilizada en todos los casos consistió en residuo de comida de origen vegetal procedente de una frutería (A1), sus características y el modo de preparación están descritos en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. Posteriormente, la mezcla de residuos fue diluida con agua desionizada hasta la concentración en sólidos totales (ST) deseada en cada caso. Una analítica general de la alimentación final utilizada en los distintos ensayos está recogida en la tabla 4.2. El inóculo utilizado también fue descrito en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos.

#### **4.3.1.1. Ensayo en discontinuo variando la cantidad de inóculo añadida y el pH inicial.**

En este ensayo fueron evaluados ocho sistemas variando la cantidad de inóculo añadida y el pH. Para ello fueron utilizados como reactores erlenmeyers de 250 mL con tapones de caucho que disponían de una salida para el gas. La medición del volumen de biogás fue realizada mediante medidores de desplazamiento de agua. La figura 4.1 muestra un esquema de los dispositivos utilizados.

Los reactores fueron cargados inicialmente con cantidades variables de inóculo y con 75 mL de alimentación con un 3% de sólidos totales (ST) (alimentación A1a). Este porcentaje de ST fue fijado en base a estudios previos (Gómez et al., 2009). Posteriormente el volumen final del reactor fue ajustado con agua hasta 200 mL. El estudio fue llevado a cabo en un baño termostatzado a  $34\pm 2$  °C en condiciones estáticas.

Los sistemas fueron evaluados a pH 5,0 y a pH 7,0 y las masas de inóculo empleadas fueron 4, 8 y 12 gramos (los reactores fueron designados según indica la tabla 4.1). Cada sistema fue montado por duplicado. A su vez, fueron preparados dos blancos uno a pH 5,0 y otro a pH 7,0, ambos cargados con 12 gramos de inóculo (estos sistemas fueron denominados B1 y B2,

respectivamente). Para ajustar el pH a los valores deseados fueron utilizadas dos soluciones: una solución básica preparada con una mezcla de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{KOH}$  en concentraciones 40 g/l, 40 g/L y 60 g/L, respectivamente; y una solución ácida de  $\text{HCl}$  1N. Los sistemas fueron mantenidos durante 6 días y el volumen de gas generado y su composición fue determinada a diario. Al final del ensayo la fase líquida fue analizada mediante los análisis rutinarios expuestos en la metodología analítica.

**Tabla 4.1. Denominación de los sistemas en el ensayo en discontinuo.**

Inóculo (g) \ pH	4	8	12
5,0	B3	B5	B7
7,0	B4	B6	B8

#### 4.3.1.2. Ensayo en discontinuo variando la temperatura.

En este ensayo fue evaluada la capacidad de los pellets de biosólido para actuar como fuente de inóculo en función de la temperatura. Para ello fueron evaluados dos sistemas, uno en régimen mesofílico (a 35 °C) y otro en régimen termofílico (a 55 °C).

Los reactores utilizados consistieron en erlenmeyers de 500 mL similares a los utilizados en el montaje anterior. Dichos reactores fueron cargados inicialmente con la masa de inóculo que resultó óptima en el primer montaje y con 250 mL de alimentación con un porcentaje de sólidos totales (ST) del 3% (alimentación A1a) para el sistema evaluado en régimen mesofílico y del 0,5% ST (alimentación A1b) para el sistema evaluado en régimen termofílico. Posteriormente el volumen final del reactor fue ajustado con agua hasta 500 mL. El porcentaje de ST de la alimentación fue fijado tras comprobar que los reactores termofílicos no iniciaban la producción de hidrógeno cuando eran arrancados con alimentaciones con un porcentaje del 3% de ST.

El ensayo fue llevado a cabo en un baño termostatzado a  $34\pm 2$  °C y a  $54\pm 2$  °C con agitación magnética, para los estudios en régimen mesofílico y termofílico, respectivamente. El pH inicial no fue ajustado. Los reactores fueron mantenidos en funcionamiento hasta que no fue detectada producción de gas.

Para evaluar cada sistema fueron preparadas cuatro réplicas que fueron denominados M1, M2, M3 y M4 (réplicas del sistema a 35 °C) y T1, T2, T3 y T4 (réplicas del sistema a 55 °C). Las réplicas M1, M2, T1 y T2 fueron utilizadas para determinar a diario el volumen de gas generado y su composición. Los restantes sistemas fueron utilizados para tomar muestra de la fase líquida que fue analizada mediante los análisis rutinarios expuestos en la metodología analítica.

#### **4.3.1.3. Ensayo en continuo: producción de hidrógeno en un biorreactor de membrana (MBR).**

En este ensayo un sistema de filtración con membrana fue acoplado a un reactor de mezcla completa (CSTR) para crear un biorreactor de membrana (MBR) para la producción de hidrógeno por fermentación oscura. En dicho estudio fueron evaluados dos sistemas de producción continua de hidrógeno a diferente temperatura, uno en régimen mesófilo (a 35 °C, sistema Rm) y otro en régimen termófilo (a 55 °C, sistema Rt), utilizando pellets de biosólido como fuente de inóculo.

Los reactores consistieron en erlenmeyers de 500 mL similares a los utilizados en los montajes anteriores. Dichos reactores fueron cargados inicialmente con la masa de inóculo que resultó óptima en el primer montaje y con 200 mL de alimentación con un porcentaje de ST del 0,5% (alimentación A1b). Posteriormente el volumen final del reactor fue ajustado con agua hasta 500 mL. El pH inicial no fue ajustado. El estudio fue llevado a cabo en un baño termostatzado a  $34\pm 2$  °C y a  $54\pm 2$  °C con agitación magnética, para los estudios en régimen mesofílico y termofílico, respectivamente. Los reactores trabajaron de modo semi-continuo durante 31 días siendo alimentados 1 vez al día con 200 mL de mezcla (equivalente a un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 2,5 días).

Una vez que los sistemas son arrancados comienzan a funcionar con retención de biomasa utilizando un sistema de filtración con membrana. Para ello la agitación de los sistemas fue detenida antes de cada ciclo de alimentación dejando tiempo suficiente para que la biomasa sedimentara por gravedad, esto permitió extraer de cada sistema 300 mL de sobrenadante que fue llevado a una unidad de membrana para obtener 200 mL de permeado. El retenido y el sobrenadante no utilizado fueron devueltos al reactor mezclados con los 200 mL de alimentación.

El pH de los sistemas fue controlado de modo manual cada vez que los reactores fueron alimentados, manteniéndolo entre 5,0 y 6,0 unidades mediante la adición de una solución alcalina. Esta solución consistió en una mezcla de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{KOH}$  en concentraciones 40 g/l, 40 g/L y 60 g/L, respectivamente.

Cada 5 días el sistema fue purgado con un flujo de 200 mL. La purga fue realizada antes alimentar el sistema. Para ello fue detenida la agitación de los reactores dejando tiempo suficiente para que la biomasa sedimentara por gravedad y obteniendo, de este modo, un líquido clarificado (sobrenadante) y un lodo concentrado. Esto permitió extraer una purga que consistió en retirar 1/2 del volumen total de los lodos concentrados obtenidos en cada sistema y el restante volumen hasta 200 mL fue tomado del líquido sobrenadante obtenido. Teniendo en cuenta que el tiempo de retención de sólidos (TRS) es definido como el tiempo medio de permanencia de los sólidos en el sistema y considerando que la concentración de sólidos en el reactor es igual a la concentración de sólidos en la purga (Lee et al., 2009), dicho parámetro puede ser calculado mediante la ecuación 4.1. En consecuencia el TRS utilizado fue de 12,5 días.

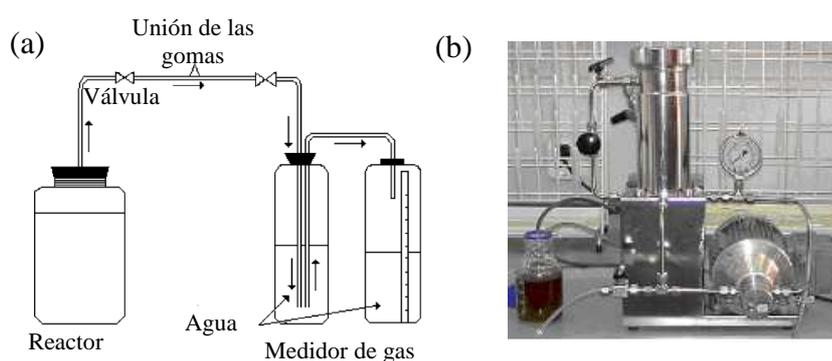
$$TRS = \frac{V_{reactor} \cdot S_{reactor}}{Q_{purga} \cdot S_{purga}} = \frac{V_{reactor}}{Q_{purga}} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde  $TRS$  es el tiempo de retención de sólidos (días),  $V_{reactor}$  es el volumen del reactor (L),  $S_{reactor}$  es la concentración de sólidos en el reactor (mg/L),  $Q_{purga}$  es el flujo de purga (L/d) y  $S_{purga}$  es la concentración de sólidos en la purga (mg/L).

El volumen de gas generado y su composición fueron determinadas a diario. A su vez, fueron tomadas muestras de los permeados obtenidos y de cada purga, dichas muestras fueron analizadas mediante los análisis rutinarios expuestos en la metodología analítica.

Para obtener los permeados fue utilizado un sistema de membrana plana (modelo LABCELL-F-1 de Koch Membrane Systems). Dicho sistema consiste en un tanque de alimentación/recirculación (con un volumen de trabajo de 500 mL), una bomba de alimentación/recirculación, un medidor de presión y válvulas de seguridad, regulación y drenaje. La superficie efectiva de filtración de la membrana es de 28 cm<sup>2</sup>. La membrana utilizada fue HFK-180 (Koch Membrane) con un tamaño de corte 100.000 Daltons, un rango de pH 2-10, y una temperatura máxima de 55 °C. El sobrenadante fue bombeado a través de la membrana a una presión de 2-3 bar, así el permeado pasó a través de la membrana y el concentrado fue devuelto al tanque de alimentación/recirculación.

La figura 4.1 muestra un esquema de los reactores utilizados en los ensayos y una fotografía de la unidad de membrana KOCH LABCELL-CF1. La tabla 4.2. recoge la analítica general de las alimentaciones empleadas en los ensayos anteriores (A1a y A1b).



**Figura 4.1. Esquema de los reactores utilizados en los ensayos (a) y fotografía de la unidad de membrana KOCH LABCELL-CF1 (b).**

**Tabla 4.2. Analítica general de las alimentaciones utilizadas: A1a (con un contenido aproximado de 3% ST) y A1b (con un contenido aproximado de 0,5% ST).**

Parámetros	A1a	A1b
pH	4,6	5,8
ST (g/L)	28,3	5,1
SV (g/L)	26,8	4,7
DQO <sub>s</sub> (mg/L)	18788	4091
DQO (mg/L)	31515	7121
Amonio (mg/L)	75	----

#### **4.3.2. Metodología analítica.**

Los análisis rutinarios para el control del proceso de fermentación oscura fueron: pH, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), demanda química de oxígeno (DQO), y concentración de ácidos grasos volátiles (AGV). A su vez, fue medido en el segundo montaje del ensayo discontinuo el contenido en etanol y fue realizado un análisis microbiológico de la comunidad bacteriana implicada en la producción de hidrógeno. Estos análisis fueron llevados a cabo conforme a los procedimientos descritos en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos.

El volumen de gas diario fue medido utilizando medidores de desplazamiento de agua, y la composición del biogás producido fue analizada tal y como está descrito en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. Todos los datos de producción de gas fueron normalizados a temperatura y presión estándar (0 °C y 760 mm Hg).

### 4.3.3. Tratamiento estadístico y representación de datos.

Los datos fueron analizados usando el programa estadístico Origin 6.1, llevando a cabo un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) que permitió determinar si el efecto que tiene la cantidad de pellet utilizada como fuente de inóculo y el pH inicial del sistema de fermentación oscura sobre la producción acumulativa de gas e hidrógeno es significativo a un nivel de significación del 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

Con el fin de comparar las curvas de producción de hidrógeno obtenidas para diferentes condiciones experimentales fue seleccionado un modelo simple capaz de simular la producción acumulativa de hidrógeno en discontinuo. En concreto, fue utilizado el modelo de Romero (Romero, 1991) que parte de la base de que un proceso fermentativo puede ser representado mediante el esquema correspondiente a una reacción autocatalítica, en la que los microorganismos son los que confieren dicho carácter autocatalítico debido a su capacidad reproductiva. Para procesos en discontinuo este modelo contempla la ecuación 4.2 que expresa la producción acumulativa de hidrógeno en función del tiempo considerando una cinética de primer orden (que han sido ampliamente utilizadas en procesos fermentativos).

$$P_{(t)} = P_{\max} \cdot (1 - e^{-\mu_{\max} \cdot t}) \quad (\text{Ec. 4.2})$$

donde  $P_{(t)}$  es la producción acumulativa de hidrógeno (mL) en función del tiempo;  $P_{\max}$  es la máxima producción de hidrógeno (generada si todo el sustrato biodegradable es convertido en hidrógeno) (mL),  $\mu_{\max}$  es la máxima velocidad de crecimiento de los microorganismos en unas condiciones determinadas ( $\text{h}^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo (h).

Las gráficas de la producción acumulativa de hidrógeno para los diferentes sistemas fueron generadas con Origin 6.1.

## 4.4. RESULTADOS.

### 4.4.1. Ensayo en discontinuo variando la cantidad de inóculo añadida y el pH inicial.

#### 4.4.1.1. Producción de hidrógeno.

La figura 4.2 muestra el volumen de gas acumulado al cabo de 6 días de funcionamiento en los diferentes sistemas utilizados. La aplicación de un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) a los datos obtenidos para los sistemas que trabajaron con diferentes masas de inóculo a un mismo pH reveló que las producciones acumulativas de gas no son significativamente diferentes a un nivel de confianza del 95% (en la tabla A.1 del Anexo A.I están recogidos los resultados del análisis estadístico). Por lo tanto, la cantidad de pellet utilizada no presenta un efecto significativo sobre la producción acumulativa de gas a pH 5,0 y a pH 7,0. Los sistemas B1 y B2 (blancos) no presentaron producción de gas.

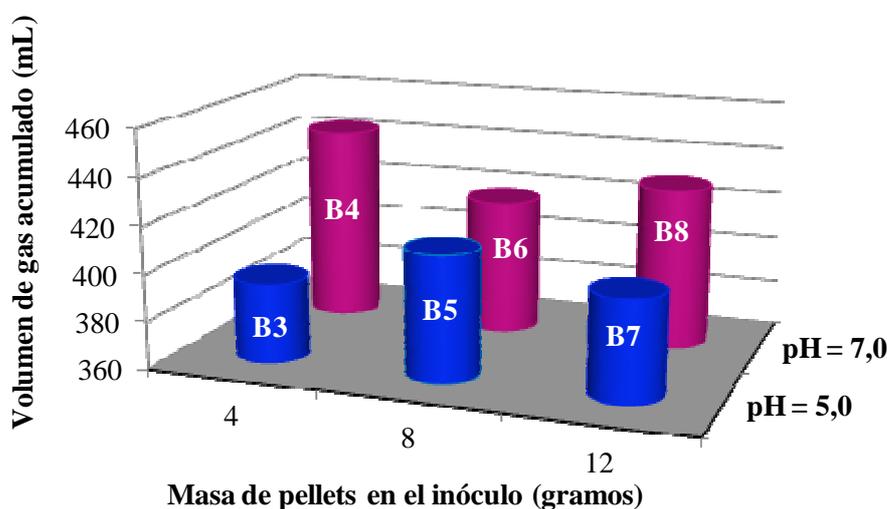
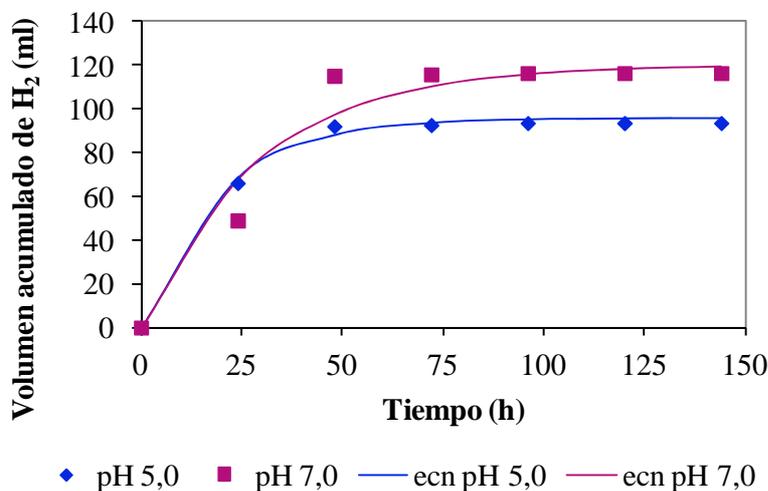


Figura 4.2. Volumen de gas acumulado en los sistemas de producción de hidrógeno en discontinuo evaluados a pH 5,0 y 7,0.

En base a estos resultados han sido consideradas como réplicas los sistemas evaluados al mismo pH con diferente masa de inóculo. Bajo esta

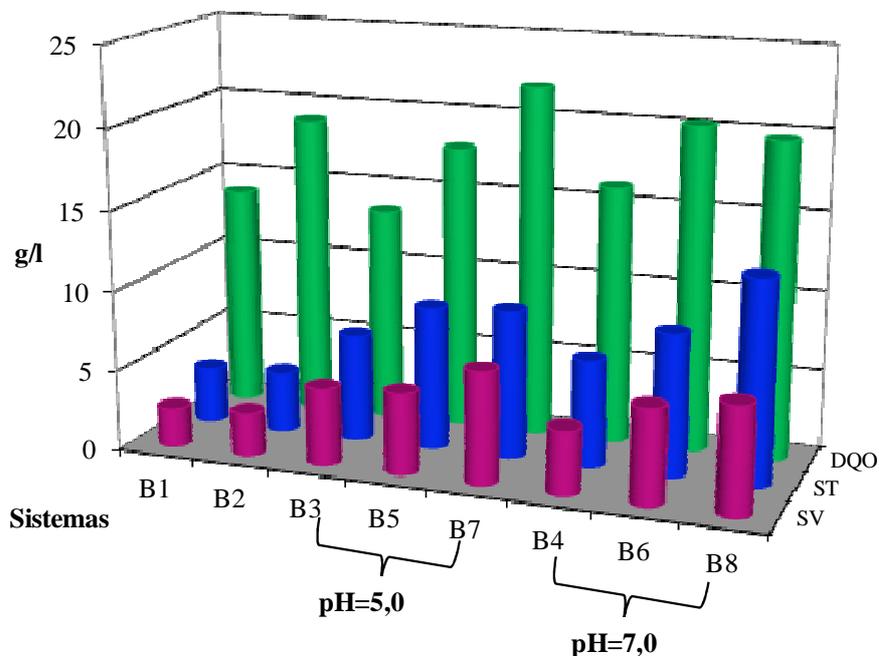
consideración en la figura 4.3 está representada la producción acumulativa de hidrógeno frente al tiempo para los sistemas evaluados a pH 5,0 y 7,0.



**Figura 4.3. Evolución de la producción acumulativa de hidrógeno y su ajuste al modelo de Romero para los sistemas evaluados a pH 5,0 y 7,0.**

Con el fin de comparar los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de Romero (4.2) siendo representados en la figura 4.3 las curvas de ajuste a dicha ecuación. Los valores obtenidos para el parámetro  $P_{max}$  fueron 95,6 y 120,6 ml hidrógeno, y para el parámetro  $\mu_{max}$  fueron 0,052 y 0,035  $h^{-1}$  para los sistemas a pH 5,0 y 7,0 respectivamente. Los coeficientes de determinación obtenidos fueron 0,996 y 0,944 para los sistemas a pH 5,0 y 7,0 respectivamente (en la tabla A.2 del Anexo A.I están recogidos los resultados del ajuste). Esto indica que existe una adecuada correlación de la producción acumulativa de hidrógeno al modelo de Romero para los datos experimentales obtenidos en los sistemas evaluados ( $R^2 > 0,944$ ). A su vez, la producción de hidrógeno para los sistemas evaluados a pH 7,0 fue ligeramente superior a la producción de los sistemas evaluados a pH 5,0. Sin embargo, un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) indica que las diferencias encontradas no son significativas a un nivel de confianza del 95% (en la tabla A.3 del Anexo A.I están recogidos los resultados del análisis estadístico). Por lo tanto, en las condiciones experimentales evaluadas el pH utilizado no presentó un efecto significativo sobre la producción acumulativa de hidrógeno.

En la figura 4.4 está representado el contenido en sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) y la demanda química de oxígeno (DQO) de los diferentes sistemas evaluados.



**Figura 4.4. Resultados de ST, SV y DQO para los sistemas de producción de hidrógeno en discontinuo, evaluados a pH 5,0 y 7,0.**

Con respecto al contenido en sólidos de los sistemas al final del experimento, no fueron observadas diferencias asociadas al pH al que fue llevado a cabo la fermentación. Los sistemas con diferente pH y una misma cantidad de inóculo presentan un contenido similar de ST y de SV. Con respecto a la DQO, en los blancos permaneció en un rango de valores similares a los obtenidos por los sistemas de fermentación. Esto fue debido a que la inmersión de los pellets en agua generó la solubilización y la acidificación de la materia orgánica presente en el lodo seco (Kalogo y Bagley, 2008). Es de destacar que la materia orgánica contenida en el lodo, aunque generó un valor alto de DQO soluble, por sí misma no presentó producción de hidrógeno. El diferente valor de DQO obtenido para los fermentadores guardó relación con el contenido inicial de inóculo adicionado y con la acidificación del sustrato adicionado. Por ello, los sistemas con mayor contenido en pellets de biosólido presentaron una DQO mayor.

#### 4.4.1.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV).

En la figura 4.5 están representados los contenidos en ácidos grasos volátiles (AGV) de cada sistema evaluado.

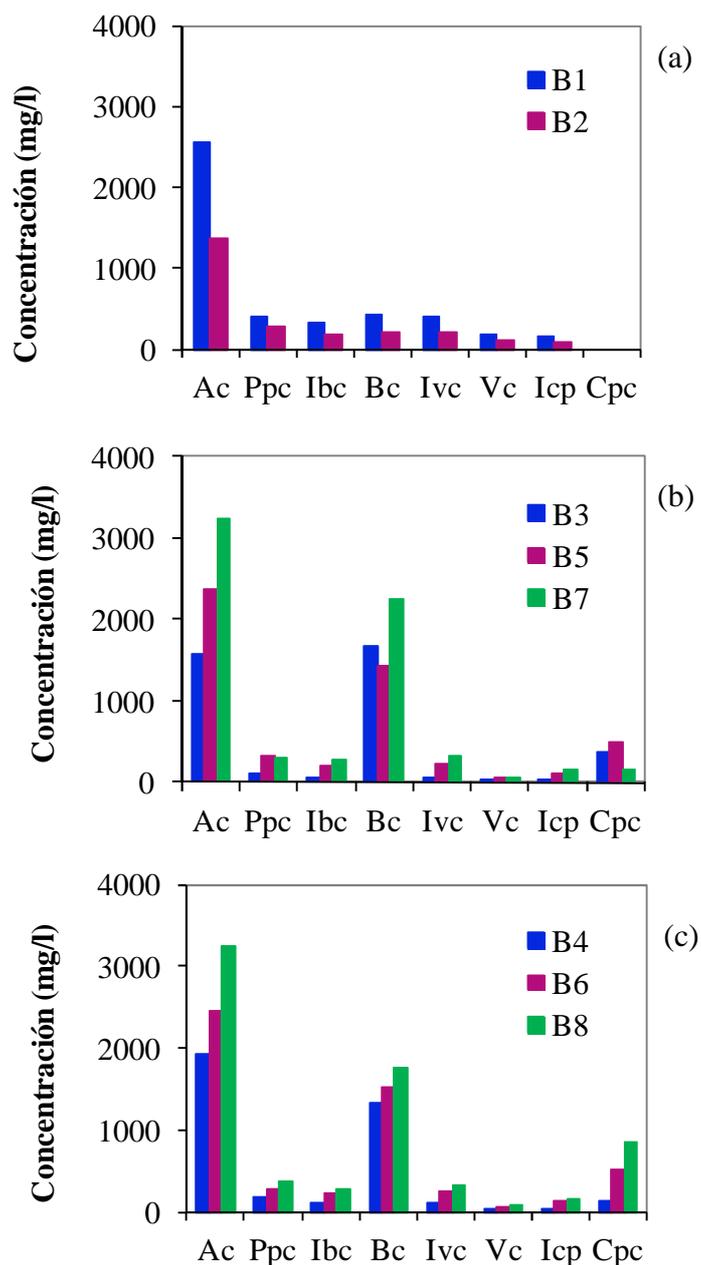


Figura 4.5. Concentración final de AGV en los blancos (gráfica a), sistemas a pH 5,0 (gráfica b) y sistemas a pH 7,0 (gráfica c); Acético (Ac); Propiónico (Ppc); Isobutírico (Ibc); Butírico (Bc); Isovalérico (Ivc); Valérico (Vc); Isocaproico (Icp); Caproico (Cpc).

Si son comparados los contenidos en AGV de los blancos puede observarse como la acidificación del lodo seco a pH 5,0 generó un mayor contenido de AGV, en particular de ácido acético. En el caso de los fermentadores evaluados a pH 5,0 y pH 7,0, la cantidad de ácido acético al final del experimento fue mayor cuanto mayor fue la masa de pellets adicionado al sistema, dado que el contenido en ácido acético final comprende la generación desde la misma materia orgánica contenida en el lodo seco junto con el proveniente de la acidificación del sustrato adicionado. Con el resto de los ácidos el comportamiento fue similar. Es de destacar que la presencia de ácido caproico fue detectada en los fermentadores, pero no en los blancos. La generación de ácido caproico no implica un mayor rendimiento de hidrógeno ya que su formación ha sido explicada mediante una fermentación secundaria a partir de dos sustratos, etanol y ácido acético o bien etanol y ácido butírico. Así, la aparición de ácido caproico entre los productos finales es una indicación de que una solventogénesis significativa ha tenido lugar, y por lo tanto el rendimiento de la producción fermentativa hidrógeno es bajo (Ding et al., 2010).

En base a los resultados de este ensayo los reactores utilizados en los posteriores estudios fueron cargados con 4 gramos de lodo seco (menor cantidad de inóculo evaluada) por cada 250 mL de volumen de reactor y no fue realizado un ajuste del pH inicial.

#### ***4.4.2. Ensayo en discontinuo variando la temperatura.***

##### **4.4.2.1. Producción de hidrógeno.**

Los sistemas evaluados a 35 °C iniciaron la producción de gas de forma inmediata y la cesaron transcurridas 72 horas desde su montaje. Dichos sistemas presentaron un contenido medio de hidrógeno en el gas de  $21,8 \pm 0,9\%$  y un contenido máximo de  $27,7 \pm 0,7\%$ . Sin embargo, los sistemas evaluados a 55 °C iniciaron la producción de gas transcurridas 48 horas desde su montaje y la cesaron tras 120 horas de funcionamiento. En este caso el contenido medio de

hidrógeno en el gas fue de  $53,8\pm 1,0\%$  y el contenido máximo de  $65,6\pm 1,1\%$ . Ninguno de los sistemas evaluados presentó metano en el gas generado indicando la ausencia de actividad metanogénica. Cheong y Hansen (2007) obtuvieron resultados similares cuando estudiaron la aplicación como inóculo de lodo biológico, obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales animales, en un sistema de producción de hidrógeno por fermentación oscura a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En dicho estudio fueron alcanzados contenidos de hidrógeno en el gas generado de hasta el  $64\%$ . A su vez, los porcentajes de hidrógeno en el gas generado en los sistemas evaluados a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  están dentro del rango observado por otros autores comprendido entre el  $14\%$  y el  $31,5\%$  (Gomez et al., 2009). Respecto a la duración de la fase lag, Shin et al. (2004) obtuvieron resultados similares a los presentados en este trabajo. Los autores estudiaron mediante ensayos en discontinuo la producción de hidrógeno a partir de residuos de comida utilizando un inóculo mixto, en régimen mesofílico y termofílico. Ellos observaron que la fase lag de los sistemas termofílicos fue mayor que la de los sistemas mesofílicos situándose en el rango de  $23-11,7\text{ h}$  y  $3,6-0,1\text{ h}$ , respectivamente. Este mayor tiempo de adaptación es consecuencia de la necesidad de las bacterias de modificar su estado fisiológico al nuevo entorno. La tabla 4.3 recoge los valores de los parámetros de rendimiento de los dos sistemas estudiados.

**Tabla 4.3. Parámetros de rendimiento de los sistemas evaluados en régimen mesofílico (M) y en régimen termofílico (T).**

Parámetros	M	T
% $\text{H}_2$ en el gas	$21,8\pm 0,9$	$53,8\pm 1,0$
% $\text{H}_2$ máx. en el gas	$27,7\pm 0,7$	$65,6\pm 1,1$
Producción acumulativa específica de gas ( $\text{mL gas/g SV}_{\text{alimentado}}$ )	$83,0\pm 2,5$	$117,4\pm 3,2$
Producción acumulativa específica de $\text{H}_2$ ( $\text{mL H}_2/\text{g SV}_{\text{alimentado}}$ )	$19,2\pm 1,1$	$61,9\pm 2,1$
$\text{ST}_{\text{finales}}$ (g/L)	$18,2\pm 0,7$	$3,7\pm 0,2$
$\text{SV}_{\text{finales}}$ (g/L)	$15,8\pm 0,5$	$2,9\pm 0,2$
% Destrucción SV	$41,00\pm 0,04$	$38,00\pm 0,05$
% Eliminación $\text{DQO}_s$ (mg/L)	$17,00\pm 0,03$	$20,00\pm 0,04$

±: desviación durante la fase estable o steady state

Los resultados de producción de hidrógeno muestran que los sistemas termofílicos son más eficientes que los sistemas mesofílicos. Los sistemas evaluados a 55 °C alcanzaron valores más elevados de producción específica de gas (PEG) acumulada al final del ensayo respecto a los sistemas evaluados a 35 °C, situándose las producciones en  $117,4 \pm 3,2$  mL gas/g  $SV_{\text{alimentado}}$  y  $83,0 \pm 2,5$  mL gas/g  $SV_{\text{alimentado}}$ , respectivamente. De este modo, la producción específica de hidrógeno acumulada fue 3,3 veces mayor en los sistemas termofílicos ( $61,9 \pm 2,1$  mL  $H_2$  gas/g  $SV_{\text{alimentado}}$ ) que en los sistemas mesofílicos ( $19,2 \pm 1,1$  mL  $H_2$ /g  $SV_{\text{alimentado}}$ ). Estos resultados concuerdan con los observados por Shin et al. (2004) al evaluar la producción de hidrógeno en régimen termofílico variando la concentración de SV de la alimentación (que consistió en residuo de comida). Para una concentración de 3 g/L de SV la producción específica de hidrógeno observada fue 46,1 mL  $H_2$ /g  $SV_{\text{alimentado}}$  y para una concentración de 6 g/L de SV la producción específica de hidrógeno fue 91,5 mL  $H_2$ /g  $SV_{\text{alimentado}}$ . A su vez, Gómez et al. (2009) estudiaron la producción de hidrógeno en régimen mesofílico a partir de residuos de comida con un 3% de ST y utilizando un inóculo mixto. Ellos observaron una producción específica de hidrógeno en el rango de 19-26 mL  $H_2$ /g  $SV_{\text{alimentado}}$ .

Respecto al resto de los parámetros medidos en este ensayo son realizadas las siguientes consideraciones. La concentración de ST disminuyó en el sistema evaluado a 35 °C de  $20,2 \pm 0,9$  a  $18,2 \pm 0,7$  g/L y la de SV de  $17,9 \pm 0,6$  a  $15,8 \pm 0,5$  g/L. En el sistema evaluado a 55 °C la concentración de ST disminuyó de  $4,3 \pm 0,3$  a  $3,7 \pm 0,2$  g/L y la de SV de  $3,8 \pm 0,3$  a  $2,9 \pm 0,2$  g/L. El porcentaje de destrucción de SV fue del  $41,00 \pm 0,04\%$  en el sistema evaluado a 35 °C y del  $38,00 \pm 0,05\%$  en el sistema evaluado a 55 °C. Estos porcentajes concuerdan con los valores obtenidos por otros autores (Pan et al., 2008; Gómez et al., 2009). Asimismo, el porcentaje medio de eliminación de DQO soluble fue del  $17,00 \pm 0,03\%$  en el sistema mesofílico y del  $20,00 \pm 0,04\%$  en el sistema termofílico. Estos valores de eliminación de DQO soluble (próximos al 18%) coinciden con los observados por diversos autores (Cheong y Hansen, 2007; Kalogo y Bagley, 2008).

#### 4.4.2.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y etanol.

Durante el proceso de fermentación la formación de hidrógeno está acompañada de la producción de AGV y de solventes (por ejemplo, el etanol). Ambos son productos microbianos solubles. Las concentraciones de estos productos líquidos son un reflejo del metabolismo de los microorganismos productores de hidrógeno. De este modo, la distribución de AGV y solventes en la fase líquida son buenos indicadores de la evolución de la producción de hidrógeno.

La figura 4.6 representa la evolución de los AGV en los sistemas estudiados.

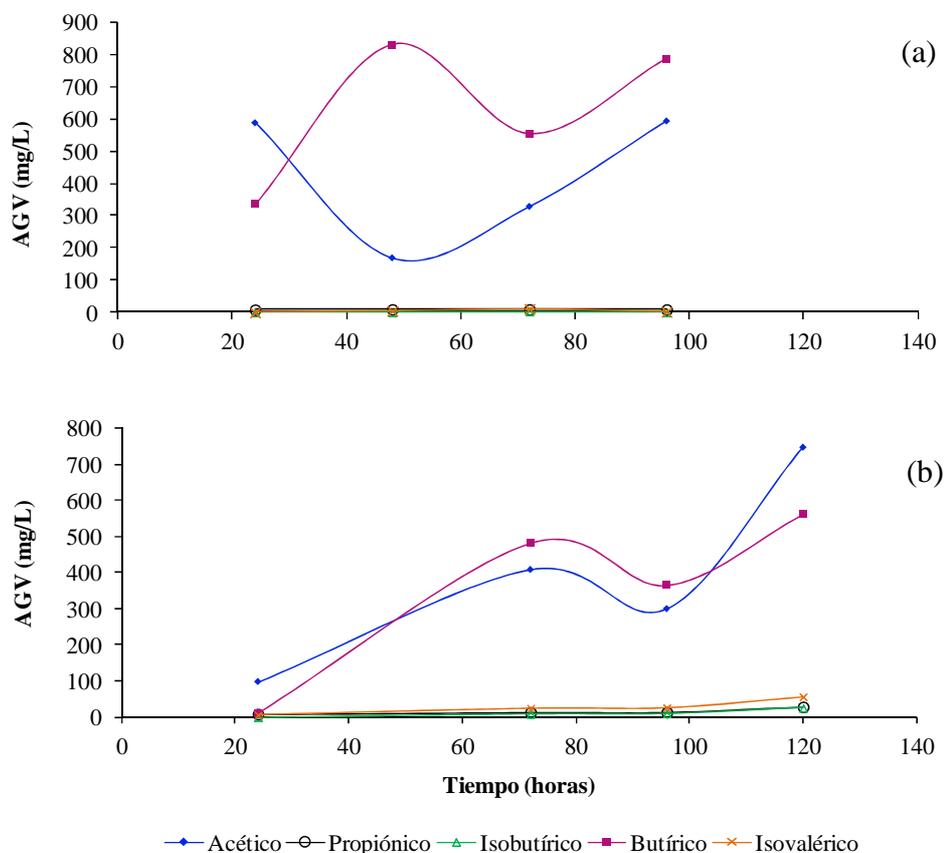
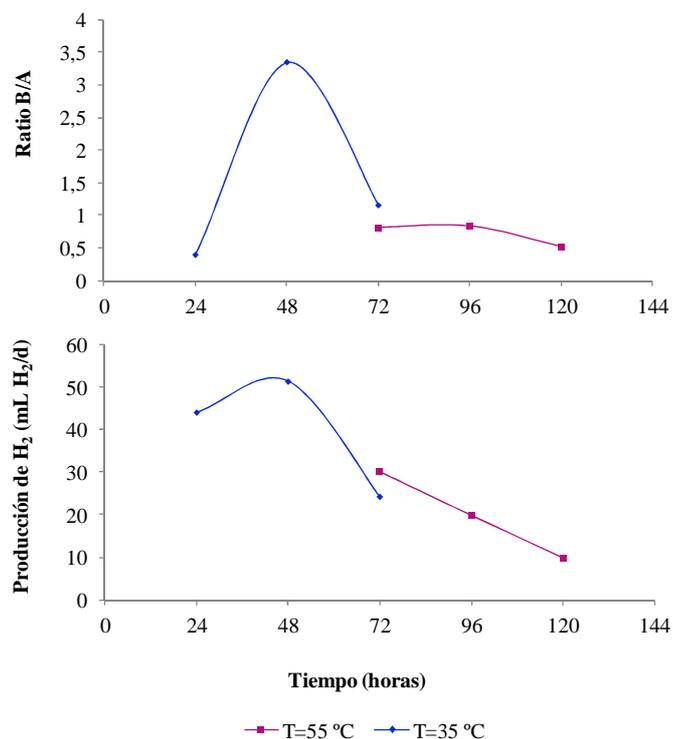


Figura 4.6. Evolución de la concentración de AGV en los sistemas evaluados a 35 °C (gráfica a) y a 55 °C (gráfica b).

El ácido butírico y el ácido acético fueron los ácidos mayoritarios en ambos sistemas. En el sistema mesofílico existió una rápida acumulación de ambos ácidos desde las primeras horas de funcionamiento manteniéndose la concentración de ácido butírico por encima de la concentración de ácido acético. En dicho sistema las concentraciones medias de ácido butírico y de ácido acético fueron  $626 \pm 32$  mg/L (7,1mM) y  $419 \pm 26$  mg/L (7,0mM), respectivamente. Sin embargo, en el sistema termofílico dicha acumulación tuvo lugar tras 48 horas coincidiendo con el inicio de la producción de gas. En este caso, una vez iniciada la producción de gas la concentración de ácido butírico fue ligeramente superior a la concentración de ácido acético, excepto al final del ensayo donde la concentración de ácido acético experimentó un aumento. En dicho sistema las concentraciones medias de ácido butírico y de ácido acético fueron  $354 \pm 23$  mg/L (4,0mM) y  $388 \pm 30$  mg/L (6,5mM), respectivamente.

El ratio ácido butírico/ácido acético (B/A) en base molar puede variar con las condiciones de crecimiento microbiano durante el proceso de fermentación (tales como concentración de sustrato, pH y temperatura) y ha sido utilizado por diversos autores para indicar el progreso de la producción de hidrógeno (Chen et al., 2001; Kim et al., 2006a, 2006b). En este trabajo los valores de los ratios B/A de ambos sistemas no son comparables ya que no sólo están afectados por variaciones de temperatura sino también por variaciones en la concentración de sustrato. Sin embargo, la tendencia del ratio B/A frente a la producción de hidrógeno puede ser estudiada en cada sistema.

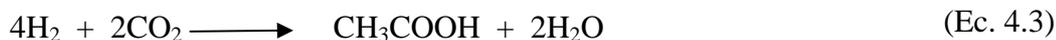
La figura 4.7 muestra la evolución seguida por el ratio B/A y la producción diaria de hidrógeno para los dos sistemas estudiados.



**Figura 4.7. Evolución del ratio B/A y la producción diaria de hidrógeno en los sistemas evaluados a 35 °C y a 55 °C.**

La gráfica anterior indica que ambos parámetros, el ratio B/A y la producción diaria de hidrógeno, siguieron la misma tendencia sugiriendo que la formación de ácido butírico favorece la producción de hidrógeno. Resultados similares fueron observados por otros autores (Chen et al., 2001; Kim et al. 2006a, 2006b; Lin et al., 2006). Sin embargo, en el sistema termofílico el suave descenso que experimentó el ratio B/A en el intervalo de tiempo 96-120 horas estuvo asociado a un descenso pronunciado en la producción de hidrógeno. El aumento de la concentración de ácido acético asociado a la disminución de la producción de hidrógeno (y sin producción significativa de metano y ácido propiónico) pudo ser debido a la actividad de bacterias homoacetogénicas termofílicas. A temperaturas termofílicas, bacterias homoacetogénicas formadoras de esporas (por ejemplo, *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium thermoautotrophicum*) pueden producir ácido acético desde hidrógeno y dióxido de carbono en base a la ecuación (4.3) (Collet et al., 2003; Cheong y Hansen, 2007). Esta hipótesis no

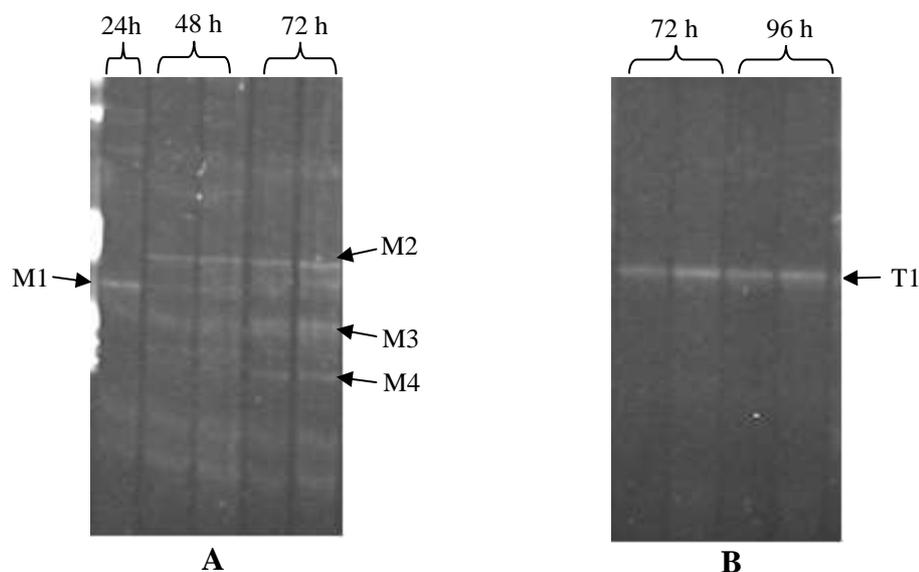
pudo ser confirmada ya que no fue realizado un análisis de la población microbiana del reactor termofílico al final del ensayo (tras 120 horas de funcionamiento).



Por otro lado, la concentración de etanol en el sistema termofílico fue nula mientras que en el sistema mesofílico fue observada una concentración media de  $30 \pm 7$  mM. La producción de solventes tiene un efecto negativo en la producción de hidrógeno (Yan et al., 1988). Esta observación concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo donde la formación de etanol contribuyó a disminuir la producción específica de hidrógeno en el sistema mesofílico respecto al sistema termofílico. Lay y Noike (1999) observaron que el incremento del pH conducía a un cambio metabólico desde la producción de AGV a la producción de alcoholes, ocasionando un descenso de los rendimientos de hidrógeno. Gómez et al. (2009) detectaron etanol durante la producción de hidrógeno a partir de residuos de comida operando a  $35^\circ\text{C}$  y en un rango de pH entre 5,0 y 6,0. En este estudio, bajo condiciones de agitación y utilizando un residuo de comida con un 3% ST y un inóculo mixto sin pretratamiento, la concentración media de etanol fue 22 mM.

#### 4.4.2.3. Análisis microbiológico.

La comunidad microbiana en los sistemas termofílico y mesofílico fue analizada mediante la técnica PCR-DGGE. Los patrones de bandas obtenidos están recogidos en la figura 4.8. Para el sistema mesofílico fueron analizadas muestras tomadas tras 24, 48 y 72 horas de funcionamiento. Para el sistema termofílico fueron analizadas muestras tomadas tras 72 y 96 horas de funcionamiento. Las bandas más importantes observadas en los geles fueron cortadas y posteriormente analizada su secuencia. Estos resultados están recogidos en la tabla 4.4.



**Figura 4.8.** Perfiles de bandas obtenidos mediante PCR-DGGE correspondientes a las muestras extraídas de los sistemas mesofílico (A) y termofílico (B).

**Tabla 4.4.** Resultados de la secuenciación correspondiente a las bandas extraídas.

Nº de banda	Correspondencia	Similitud (%)
<b>M1</b>	<i>Clostridium butyricum</i>	95
<b>M2</b>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	96
<b>M3</b>	<i>Lactobacillus oris</i>	97
<b>M4</b>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	94
<b>T1</b>	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	93

El patrón de bandas obtenido en cada sistema fue diferente indicando diferencias en la comunidad microbiana establecida en cada reactor. Así, el número de bandas detectado en el sistema mesofílico fue mayor que el detectado en el sistema termofílico. Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores (Lapara et al., 2002; Shin et al., 2004) quienes sugirieron que temperaturas elevadas pueden reducir la diversidad de especies.

En el sistema termofílico fue observada una banda predominante (T1) que fue asociada a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *T. thermosaccharolyticum* es un microorganismo termofílico que produce grandes cantidades de hidrógeno desde carbohidratos (Skerman et al., 1980). Ueno et al. (2001a) estudiaron la producción termofílica de hidrógeno utilizando un inóculo mixto y un medio de cultivo sintético rico en celulosa. Ellos sugirieron que *T. thermosaccharolyticum* estaba implicado en la fermentación acetato/butirato que condujo a la producción de hidrógeno. De acuerdo con las características del estudio Ueno et al. (2001b), *T. thermosaccharolyticum* presentó un crecimiento óptimo a un pH entre 5-6 y a una temperatura de 60 °C. El rendimiento de producción de hidrógeno obtenido fue de 2,4 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa, una capacidad de producción de hidrógeno equivalente a la de *Clostridium butyricum*.

*Clostridium butyricum* es una bacteria estrictamente anaerobia que fermenta carbohidratos a ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno (Chen et al., 2006). Según los resultados obtenidos en este trabajo *Clostridium butyricum* está presente en el sistema mesofílico (banda M1) siendo responsable de la producción de hidrógeno en este sistema. Sin embargo, este microorganismo no fue detectado en el reactor termofílico. Este resultado concuerda con los obtenidos en otros estudios llevados a cabo en régimen termofílico donde bacterias del género *Clostridium* no fueron observadas (Shin et al., 2004; Ahn et al., 2005).

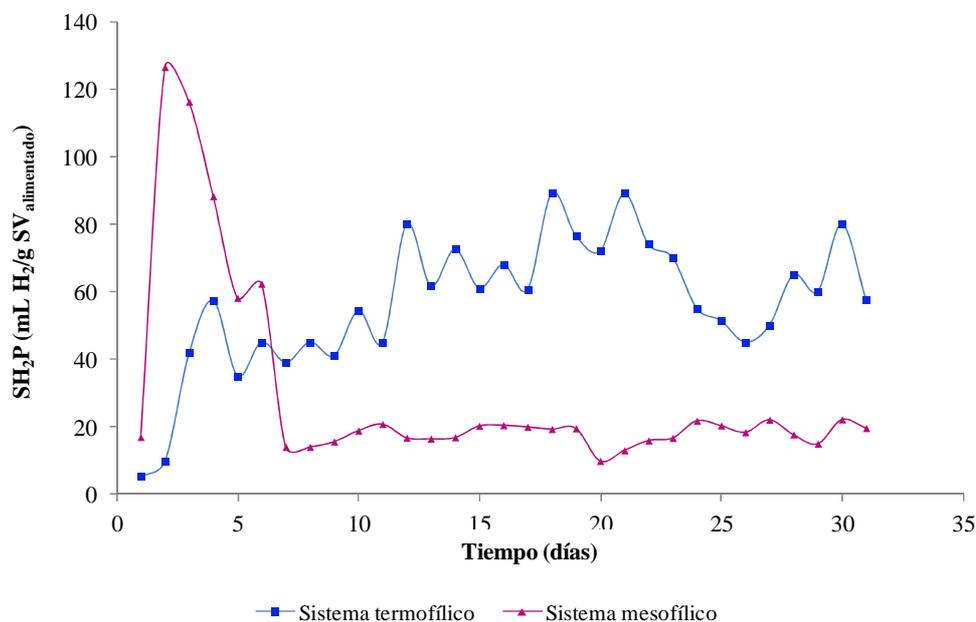
A su vez, en el sistema mesofílico fueron observadas tres bandas (M2, M3 y M4) las cuales fueron estrechamente relacionadas con las especies *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus rhamnosus*, respectivamente. Todas ellas son bacterias anaerobias facultativas que producen ácido láctico como producto final mayoritario en la fermentación de carbohidratos (Kim y Chun, 2005; Lee et al., 2006a). Las bacterias ácido lácticas pueden clasificarse en dos categorías: bacterias homofermentativas y bacterias heterofermentativas. La homofermentación produce únicamente ácido láctico como producto final del metabolismo de la glucosa. Sin embargo, las bacterias ácido lácticas heterofermentativas fermentan 1 mol de glucosa a 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de dióxido de carbono. De este modo, los cambios en la

comunidad microbiana del reactor mesofílico, desde un consorcio que contiene principalmente bacterias productoras de hidrógeno (*Clostridium spp.*) a otro que contiene principalmente bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus spp.*), coinciden con una menor producción de hidrógeno y un aumento en la concentración de etanol, respecto al sistema termofílico.

#### 4.4.3. Ensayo en continuo: producción de hidrógeno en un biorreactor de membrana (MBR).

##### 4.4.3.1. Producción de hidrógeno.

La figura 4.9 presenta la evolución de la producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ) en los dos sistemas estudiados. Este parámetro fue calculado en base al volumen de hidrógeno producido por SV alimentado al reactor.



**Figura 4.9.** Evolución de la producción específica de hidrógeno en los sistemas con retención de biomasa en régimen termofílico (55 °C) y mesofílico (35 °C).

El sistema mesofílico comenzó a producir hidrógeno de forma inmediata tras su montaje. Por ello en este sistema fue iniciada la retención de biomasa mediante filtración con membrana el día 2. El reactor alcanzó una producción estable de hidrógeno a partir del día 7 de funcionamiento en el rango de 9,8-22,1 mL H<sub>2</sub>/g SV<sub>alimentado</sub>. Sin embargo, el sistema termofílico presentó una fase lag más larga (tal y como ocurrió en el ensayo en discontinuo) y la retención de biomasa no pudo ser iniciada hasta el día 5. A partir de este momento mantuvo una producción específica de hidrógeno en el rango 39-72,0 mL H<sub>2</sub>/g SV<sub>alimentado</sub>.

Ambos sistemas estuvieron caracterizados por una producción de biogás estable con un contenido medio de hidrógeno del 23,4±1,7% para el sistema mesofílico y del 48,2±2,5% para el sistema termofílico. Nada de metano fue detectado en el biogás generado en los reactores. Esto indica que las bacterias metanogénicas fueron completamente eliminadas o suprimidas de los reactores MBR donde fue utilizado un tiempo de retención de sólidos (TRS) de 12,5 días. Lee et al. (2009) tampoco detectaron metano en el biogás generado en un reactor MBR operando con un elevado TRS (90 días), 35 °C y a pH 5,5. Sin embargo en este estudio el inóculo, procedente de un digestor de lodo de una planta de tratamiento de aguas residuales, fue sometido a un pretratamiento térmico. Del mismo modo, Oh et al. (2004) evaluaron la producción de hidrógeno en un MBR operando a 35 °C y a pH 5,5 con un TRH en el rango de 3,3 a 5,0 horas y con un TRS en el rango de 3,3 a 4,8 horas. Para ello sometieron un inóculo mixto a un pretratamiento térmico para eliminar las bacterias metanogénicas no formadoras de esporas. Bajo estas condiciones la metanogénesis fue completamente suprimida y nada de metano fue detectado en el biogás. De estos resultados, puede concluirse que un factor importante que limitó el crecimiento de bacterias metanogénicas en los reactores MBR fue el pretratamiento térmico del inóculo y el continuo control del pH (a 5,5) (Fang y Liu, 2002). En el presente trabajo el empleo de pellets de biosólido y el control del pH dentro del rango 5,0-6,0 también permitió suprimir la metanogénesis en reactores MBR operando en régimen termofílico y mesofílico y no fue necesario un pretratamiento adicional del inóculo.

La tabla 4.5 recoge los valores medios de los parámetros de rendimiento de los dos sistemas evaluados.

**Tabla 4.5. Parámetros medios de rendimiento de los reactores con acumulación de biomasa evaluados a 35 °C (Rm) y a 55 °C (Rt).**

Parámetros <sup>1</sup>	Rm	Rt
Producción diaria de gas (mL/d)	72,7±3,1	115,7±4,2
% H <sub>2</sub> en el gas	23,4±1,7	48,2±2,5
Producción de hidrógeno (mL H <sub>2</sub> /L <sub>reactor</sub> *d)	33,6±2,8	108,4±3,7
Producción específica de hidrógeno, SH <sub>2</sub> P (mL H <sub>2</sub> /g SV <sub>alimentado</sub> )	17,9±1,2	57,6±2,3
ST <sub>purga</sub> (g/L)	13,3±0,9	9,5±0,3
SV <sub>purga</sub> (g/L)	10,0±0,7	8,4±0,3
DQO <sub>permeado</sub> (g/L)	1,8±0,2	1,3±0,2

<sup>1</sup>: los valores medios corresponden al periodo comprendido entre el día 7 y el día 31.

La producción de hidrógeno en el reactor MBR termofílico (108,4±3,7 mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>\*d) fue 3,2 veces más alta que en el reactor MBR mesofílico (33,6±2,8mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>\*d), reflejando una productividad de hidrógeno más alta en el régimen termofílico. Un resultado similar fue obtenido en el ensayo en discontinuo donde la producción de hidrógeno fue 3,3 veces mayor en el sistema termofílico que en el sistema mesofílico.

Para comparar el rendimiento del reactor MBR mesofílico con un reactor CSTR utilizamos los resultados obtenidos por Gómez et al. (2009). Ellos estudiaron la producción de hidrógeno en régimen mesofílico a partir de residuos de comida similares a los utilizados en este trabajo con un contenido en ST del 3% (superior al utilizado en este estudio situado en 0,5% de ST). El reactor operó con un TRH de 3 días, el pH fue mantenido en el rango 5,0-6,0 y el inóculo utilizado fue lodo digerido procedente de la estación depuradora de aguas residuales de la ciudad de León. En condiciones de agitación observaron una producción específica de hidrógeno de 19,3 mL H<sub>2</sub>/g SV<sub>alimentado</sub>, un valor similar

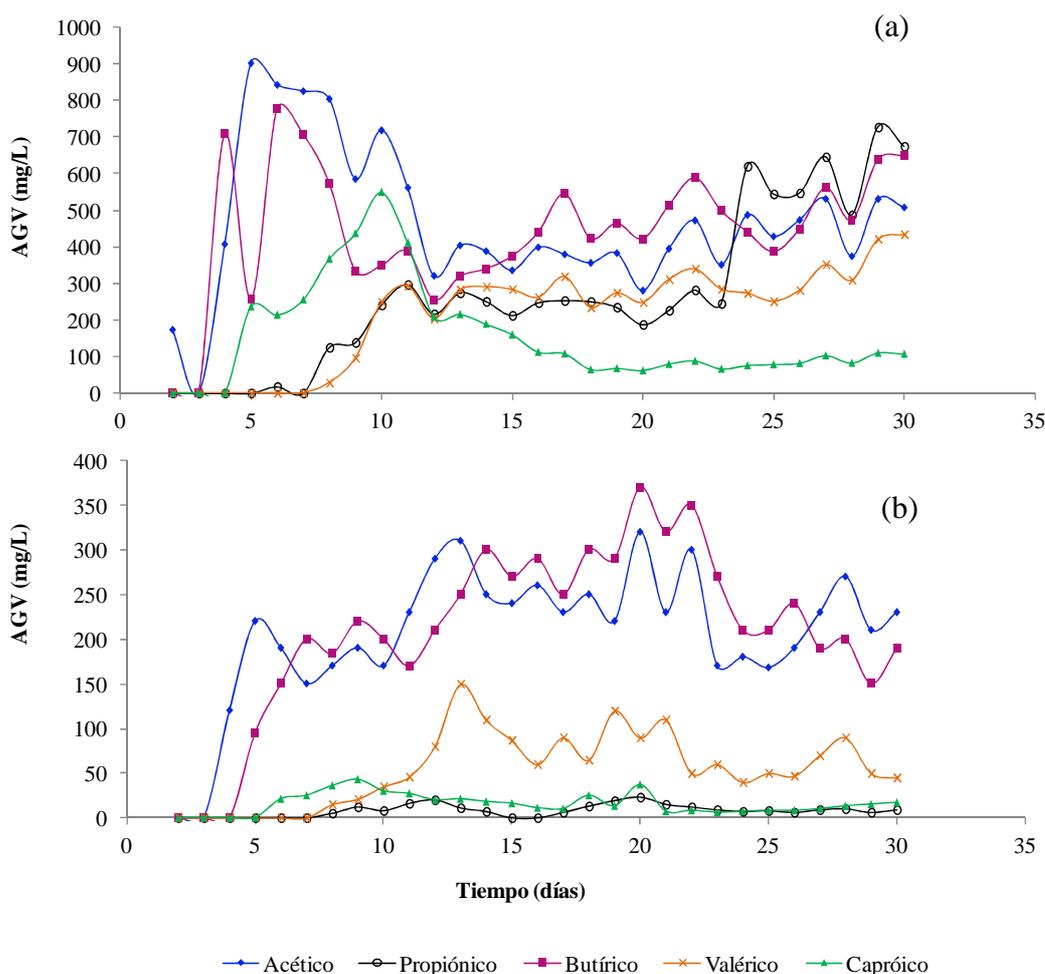
al obtenido en este estudio ( $17,9 \pm 1,2$  mL H<sub>2</sub>/g SV<sub>alimentado</sub>). Sin embargo, otros autores han observado una velocidad de producción de hidrógeno más elevada en reactores MBR respecto a reactores CSTR operando en las mismas condiciones. Lee et al. (2009) estudiaron las características de la producción de hidrógeno en reactores MBR a partir de glucosa y compararon los rendimientos con los obtenidos en reactores CSTR bajo las mismas condiciones de operación (TRH 9 días, 35 °C y pH 5,5). En estos experimentos obtuvieron una producción de hidrógeno en un reactor MBR con un TRS de 90 días ( $2,43$ - $2,56$  L H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>\*d) aproximadamente 2,6 veces mayor que la obtenida en un CSTR ( $0,95$ - $0,97$  L H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>\*d).

Respecto al contenido de sólidos de la purga, el sistema termofílico presentó un contenido medio inferior al del sistema mesofílico (tabla 4.5). De este modo, la destrucción de SV en el reactor mesofílico fue inferior a la del reactor termofílico. Del mismo modo, el valor medio de la DQO del permeado fue ligeramente inferior en el sistema termofílico. El valor del ratio SV/ST del reactor MBR mesofílico (0,75) fue similar al observado en el reactor CSTR evaluado por Gómez et al. (2009) (0,71).

#### 4.4.3.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV).

La figura 4.10 representa la evolución de los AGV analizados en el permeado obtenido en los sistemas estudiados. La concentración de AGV más alta correspondió en ambos sistemas al ácido butírico ( $469 \pm 34$  mg/L a 35 °C y  $243 \pm 25$  mg/L a 55 °C) seguido del ácido acético ( $463 \pm 31$  mg/L a 35 °C y  $227 \pm 23$  a 55 °C). El ratio molar medio B/A en el sistema mesofílico fue 0,69 y en el sistema termofílico fue 0,73. Estos valores son relativamente más bajos que los observados en otros trabajos (Lin et al., 2008; Xie et al., 2008) y no guardan la misma relación que han encontrado otros autores al comparar los ratios B/A en régimen termofílico y mesofílico. Lin et al. (2008) estudiaron la producción de hidrógeno desde xilosa y observaron que bajo condiciones termofílicas los ratios B/A fueron dos veces más altos que en condiciones mesofílicas. Esto indica que

los valores medios de los ratios B/A para la producción de hidrógeno varían con el tipo de sustrato y cultivo. Bajo las condiciones de este estudio un ratio B/A inferior a la unidad fue favorable para la producción de hidrógeno y un aumento de la temperatura incrementó la producción de hidrógeno vía fermentación butírica y acética.



**Figura 4.10. Evolución de la concentración de AGV en los sistemas evaluados a 35 °C (gráfica a) y a 55 °C (gráfica b).**

Un incremento en la concentración de ácido propiónico fue observada en el régimen mesofílico ( $330 \pm 21$  mg/L) respecto al régimen termofílico ( $10 \pm 3$  mg/L). Resultados similares fueron observados por Lee et al. (2009) que también detectaron una concentración significativa de ácido propiónico (106-840 mg/L)

durante la producción de hidrógeno a partir glucosa en un MBR a 35 °C. Los autores reflejaron el hecho de que el cambio en el ratio Alimentación/Microorganismos (F/M) que tiene lugar durante la producción continua de hidrógeno en un MBR puede afectar al tipo de fermentación anaerobia favoreciendo la producción de ácido propiónico. En el presente trabajo este efecto no fue observado a 55 °C. En general, la producción de ácido acético y ácido butírico favorece la producción de hidrógeno (dos moles de hidrógeno son producidos con la producción de un mol de ácido butírico o de ácido acético) mientras que la producción de un mol de ácido propiónico consume 1 mol de hidrógeno (Antonopoulou et al., 2008). De esta manera, la baja producción de hidrógeno en el régimen mesofílico pudo ser ocasionada por una producción más alta de ácido propiónico que consume hidrógeno. Li et al. (2009) asociaron la fermentación propiónica a bajos rendimientos de hidrógeno utilizando como sustrato melaza en un proceso en continuo en un reactor CSTR.

Ambos sistemas estuvieron caracterizados por la presencia de ácido caproico (170±14 mg/L y 18±6 mg/L en los sistemas a 35 °C y 55 °C, respectivamente). En el sistema mesofílico la concentración de ácido caproico aumentó y después descendió, estabilizándose a partir del día 18 en 81±17 mg/L. La aparición de ácido caproico entre los productos finales es una indicación de que una solventogénesis significativa ha tenido lugar (tal y como fue explicado en el apartado 4.4.1.2) ocasionando una disminución en el rendimiento de la producción fermentativa hidrógeno (Ding et al., 2010).

## **4.5. CONCLUSIONES.**

### ***4.5.1. Respecto a la producción de hidrógeno en discontinuo variando la cantidad de inóculo añadida al sistema y el pH inicial.***

- Los pellets de biosólido fueron una fuente de inóculo adecuada para los sistemas de producción de hidrógeno por fermentación oscura utilizando como sustrato residuos vegetales de comida. La cantidad de pellets de biosólido añadida a los sistemas discontinuos de producción de hidrógeno no afectó de forma significativa a la producción de gas generada. A su vez, el ajuste del pH inicial a valores de 5,0 y 7,0 no ejerció un efecto significativo sobre la producción acumulativa de hidrógeno.
- La inmersión de los pellets de biosólido en agua generó la solubilización y la acidificación de la materia orgánica presente en el lodo seco. Dicha materia orgánica contribuyó a aumentar la DQO soluble y la concentración de AGV (estos últimos especialmente a pH 5,0), pero no presentó por sí misma producción de hidrógeno.

### ***4.5.2. Respecto a la producción de hidrógeno en discontinuo variando la temperatura.***

- Los pellets de biosólido son una fuente de inóculo adecuada para la producción de hidrógeno en régimen mesofílico y termofílico. El sistema termofílico presentó una fase lag mayor que el sistema mesofílico como consecuencia de la necesidad de las bacterias a modificar su estado fisiológico al nuevo entorno.
- Los sistemas termofílicos no iniciaron la producción de hidrógeno cuando fueron arrancados con alimentaciones con un porcentaje del 3% de ST, fue necesario reducir este porcentaje hasta 0,5%. El contenido de hidrógeno en el gas en el sistema termofílico fue superior al del sistema mesofílico. A su

vez, el sistema termofílico presentó una producción específica de hidrógeno 3,3 veces mayor que la del sistema mesofílico.

- El etanol no fue generado en condiciones termofílicas pero sí en condiciones mesofílicas contribuyendo a disminuir la producción de hidrógeno.
- El patrón de bandas obtenido mediante la técnica PCR-DGGE durante el análisis de la población microbiana presente en el sistema mesofílico y termofílico, sugiere que un aumento de la temperatura redujo la diversidad de especies.
- En el sistema termofílico la producción de hidrógeno fue asociada a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* y en el sistema mesofílico fue asociada a *Clostridium butyricum*. Según otros estudios ambos microorganismos presentan una capacidad similar de producción de hidrógeno (2,4 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa).
- La presencia de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus spp.*) en el sistema mesofílico contribuyó a disminuir la producción de hidrógeno y aumentar la concentración de etanol, respecto al sistema termofílico.

#### **4.5.3. Respecto a la producción de hidrógeno en continuo en un biorreactor de membrana (MBR).**

- Las condiciones de operación fueron adecuadas para eliminar o suprimir las bacterias metanogénicas de los reactores MBR donde fue utilizado un tiempo de retención de sólidos (TRS) de 12,5 días, de este modo, no fue detectado metano en el gas generado tanto en régimen mesofílico como en régimen termofílico.
- El contenido de hidrógeno en el sistema termofílico fue superior al del sistema mesofílico y la producción de hidrógeno en el reactor MBR termofílico fue 3,2 veces más alta que en el reactor MBR mesofílico. De

este modo, un aumento de la temperatura incrementó la producción de hidrógeno vía fermentación butírica y acética, aumentando el ratio B/A

- La baja producción de hidrógeno en el régimen mesofílico pudo ser ocasionada por una producción más alta de ácido propiónico que consume hidrógeno y de ácido caproico asociado a solventogénesis significativas.

#### **4.6. BIBLIOGRAFÍA.**

Ahn Y., Park Y.-J., Oh Y.-K., Park S., Webster G. and Weightman AJ. (2005). Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 249, pp. 31-38.

Antonopoulou G., Gavala H.N., Loannis V., Skiadas K., Angelopoulos C. and Lyberatos G. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 110-119.

Bartacek J., Zabranska J. and Lens P.N.L. (2007). Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. Vol. 1, pp. 201-214.

Collet C., Schwitzguebel J.-P. and Peringer P. (2003). Improvement of acetate production from lactose by growing *Clostridium thermolacticum* in mixed culture. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 95, pp. 824-831.

Cuetos M.J., Gómez X., Escapa A. and Morán A. (2007). Evaluation and simultaneous optimization of bio-hydrogen production using 32 factorial design and the desirability function. *Journal of Power Sources*. Vol. 169, pp.131-139.

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

Chen C.C., Lin C.Y. and Chang J.S. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 57, pp. 56-64.

Chen X.,Sun Y.,Xiu Z., Li X. and Zhang D. (2006).Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 539-549.

- Cheong D.-Y. and Hansen C. (2007). Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. *Bioresource Technology*. Vol. 98, pp. 2229-2239.
- Chong M.-L., Sabaratnamb V., Shiraic Y. and Hassana M.A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 3277-3287.
- Ding H.-B., Tan G.-Y.A. and Wang J.-Y. (2010). Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*. Vol. 101, pp. 9550-9559.
- Dong L., Zhenhong Y., Yongming S., Xiaoying K. and Yu Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 812-820.
- Fang H.H.P. and Liu H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*. Vol. 82, pp. 87-93.
- Gómez X., Morán A., Cuetos M.J. and Sánchez M.E. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: a twophase process. *Journal of Power Sources*. Vol. 157, pp. 727-732.
- Gómez X., Cuetos M.J., Prieto J.I. and Morán A. (2009). Bio-hydrogen production from waste fermentation: Mixing and static conditions. *Renewable Energy*. Vol. 34, pp. 970-975.
- Hawkes F.R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R. and Hawkes D.L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and process. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 32, pp. 172-184.
- Kalogo Y. and Bagley M.D. (2008). Fermentative hydrogen gas production using biosolids pellets as the inoculum source. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 540-546.
- Keith B. and Tom S. (1995). The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 49, pp. 601-610.
- Kim M. and Chun J. (2005). Bacterial community structure in Kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 103, pp. 91-96.
- Kim S.-H., Han S.-K. and Shin H.-S. (2006a). Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 199-207.

- Kim D.-H., Han S.-K., Kim S.-H. and Shin H.-S.(2006b). Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 2158-2169.
- Kim S.-H., Han S.-K. and Shin H.-S. (2008). Optimization of continuous hydrogen fermentation of food waste as a function of solids retention time independent of hydraulic retention time. *Process Biochemistry*. Vol. 43, pp. 213-218.
- Lapara T., Nakatsu C.H., Pantea L. and Alleman J.E. (2002). Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 66, pp. 3951-3659.
- Lay J.J. and Noike T. (1999). Hydrogen production and conversion of cellulose by anaerobic digested sludge. *Journal of Environmental Systems Engineering*. Vol. 636/VII-13, pp. 97-104.
- Lay J.J., Fan K.S., Chang J.I. and Ku C.H. (2003). Influence of chemical nature of organic waste on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *International Journal Hydrogen Energy*. Vol. 28, pp. 1361-1367.
- Lee K.-S., Lo Y.-S., Lo Y.-C. and Lin P.-J. (2004). Operational strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor. *Enzyme Microbial Technology*. Vol. 35, pp. 605-612.
- Lee J.Y., Kim C.J. and Kunz B. (2006a). Identification of lactic acid bacteria isolated from Kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Science*. Vol. 72, pp. 437-445.
- Lee K.-S., Lo Y.-C., Lin P.-J. and Chang J.-S. (2006b). Improving biohydrogen production in a carrier-induced granular sludge bed by altering physical configuration and agitation pattern of the bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 1648-1657.
- Lee K.-S., Lin P.-J., Fangchiang K. and Chang, J.-S. (2007). Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 32, pp. 950-957.
- Lee D.-Y., Li Y.-Y. and Noike T. (2009). Continuous H<sub>2</sub> production by anaerobic mixed microflora in membrane bioreactor. *Bioresource Technology*. Vol. 100, pp. 690-695.
- Lee Z.-K., Li S.-L., Kuo P.-C., Chen I.-C., Tien Y.-M., Huang Y.-J., Chuang C.-P., Wong S.-C. and Cheng, S.-S. (2010). Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, pp. 13458-13466.

- Levin D.B., Islam R., Cicek N. and Sparling R. (2006). Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 1496-503.
- Li D., Yuan Z., Sun Z., Sun Y., Kong X. and Zhang Y. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation, *International Journal Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 812-820.
- Lin C.-Y., Hung C.-H., Chen C.-H., Chung W.-T. and Cheng L.-H. (2006). Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 1383-1390.
- Lin C.-H., Wu C.-C. and Hung C.-H. (2007). Temperature effects of fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 43-50.
- Lin C.-Y., Wu C.-C., Wu J.-H. and Chang F.-Y. (2008). Effect of cultivation temperature on fermentative hydrogen production from xylose by a mixed culture. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 32, pp. 1109-1115.
- Liu D., Zeng R.J. and Angelikadi I. (2006). Hydrogen methane production from household solid waste in two-stage fermentation process. *Water Research*. Vol. 40, pp. 2230-2236.
- Oh S.-E., Lyer P., Bruns M.A. and Logan B.E. (2004). Biological hydrogen production using a membrane bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 87, pp. 119-127.
- O-Thong S., Prasertsan P., Intrasungka N., Dhamwichukorn S. and Birkeland N.-K. (2007). Improvement of biohydrogen production and treatment efficiency on palm oil mill effluent with nutrient supplementation at thermophilic condition using an anaerobic sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 41, pp. 583-590.
- O-Thong S., Prasertsan P., Karakashev D. and Angelidaki I. (2008). Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 1204-1214.
- Pan J., Zhang R., El-Mashad H.M., Sun H. and Ying Y. (2008). Effect of food to microorganism ratio on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 6968-6975.
- Romero G. L.I. (1991). Desarrollo de un modelo matemático general para los procesos fermentativos: cinética de la degradación anaerobia. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz. ISBN, 84-7786-109-9.

- Shin H.S., Youn J.H. and Kim S.H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 1355-1363.
- Skerman V.B.D., McGowan V. and Sneath P.H.A. (1980). Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. 30, pp. 225-420.
- Ueno Y., Haruta S., Ishii M. and Igarashi Y. (2001a). Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microNora enriched from sludge compost. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 57, pp. 555-562.
- Ueno Y., Haruta S., Ishii M. and Igarashi Y. (2001b). Characterization of a microorganism isolated from the eXuent of hydrogen fermentation by microNora. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 92, pp. 397-400.
- Valdez-Vazquez I., Ríos-Leal E., Esparza-García F., Cecchi F. and Poggi-Varaldo H.M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organicwaste: Mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 30, pp. 1383-1391.
- Veeken A. and Hamelers B. (1999). Effect of temperature on hydrolysis rates of selectes biowaste components. *Bioresource technology*. Vol. 29, pag. 249-254.
- Xie B.F., Cheng J., Zhou J.H., Song W.L., Liu J.Z. and Cen K.F. (2008). Production of hydrogen and methane from potatoes by two-phase anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 5942-5946.
- Yan R.T., Zhu C.X., Golemboski C. and Chen J.S. (1988). Expression of solvent-forming enzymes and onset of solvent production in batch culture of *Clostridium butyricum*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 54, pp. 642-648.

*5. PRODUCCIÓN CONTINUA DE  
HIDRÓGENO CON ADICIÓN DE  
SOBRENADANTE DIGERIDO*

---



## **5.1. INTRODUCCIÓN.**

### ***5.1.1. Proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas.***

El rendimiento del proceso de producción de hidrógeno por fermentación oscura está limitado por una transformación máxima en hidrógeno del 33% de la DQO contenida en los residuos (considerando glucosa). Esto significa que al menos un 66% de la DQO de los residuos permanece en el efluente del sistema cuyos componentes principales son ácidos grasos volátiles (AGV) (Bartacek et al., 2007). Por ello el proceso de tratamiento de residuos por fermentación oscura requiere una segunda etapa cuyos objetivos son aumentar el rendimiento energético del proceso y lograr un producto final estable reduciendo el potencial de la materia orgánica a pudrirse. Para ello Wang et al. (2003) propusieron un proceso en dos etapas que consiste en acoplar un reactor metanogénico en serie a continuación del reactor de producción de hidrógeno para producir hidrógeno y

metano en etapas separadas. El tratamiento metanogénico del efluente del sistema de fermentación oscura permite la conversión de los AGV en metano incrementando así la cantidad de DQO utilizada para obtener energía, y a su vez actúa como una etapa de estabilización final del residuo. Este proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas es similar al proceso de digestión anaerobia en dos etapas donde microorganismos acidogénicos y microorganismos metanogénicos están físicamente separados (Demirel y Yenigün, 2002).

El proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas ha sido estudiado por numerosos autores (Gómez et al., 2006; Antonopoulou et al., 2008; Zhu et al., 2008; Venetsaneas et al., 2009) y los resultados obtenidos muestran procesos estables durante largos periodos de tiempo (meses). Dichos estudios han sido realizados en su mayoría a escala de laboratorio o escala semi-piloto. Un estudio del proceso a escala piloto fue realizado por Wang y Zhao (2009). Los autores evaluaron la producción de hidrógeno por fermentación oscura utilizando un reactor de tambor giratorio seguido de un reactor metanogénico (con un volumen de trabajo de 200 L y 800 L, respectivamente). El proceso fue estudiado bajo condiciones mesofílicas y utilizando como inóculo el cultivo mixto contenido en el residuo de comida utilizado como sustrato. Otro estudio a escala piloto fue realizado por Lee y Chung (2010) utilizando como sustrato residuo de comida, los autores realizaron una evaluación económica según la cual el proceso de producción de hidrógeno y metano tiene un mayor potencial para recuperar energía que el proceso de producción de metano.

### ***5.1.2. Recirculación de lodo digerido a la etapa de producción de hidrógeno.***

Un beneficio asociado al proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas consiste en la posibilidad de reducir los requerimientos de alcalinidad externa para la regulación del pH en el reactor de hidrógeno. Esto es debido a que en el proceso en dos etapas hay un incremento en la alcalinidad durante la fase

metanogénica ya que los AGV presentes en el efluente del reactor de hidrógeno son eliminados en el reactor de metano, recuperando de este modo la alcalinidad externa añadida. Por lo tanto, una estrategia para reducir la cantidad de alcalinidad externa que es necesario añadir al reactor de hidrógeno para el control del pH consiste en la recirculación del efluente, o de una fracción del mismo, desde la fase de producción de metano a la fase de producción de hidrógeno. Esta estrategia permite reducir los costes de operación asociados al consumo de agentes químicos necesarios para la regulación del pH y a su vez evita generar efluentes con alta conductividad derivada de los cationes añadidos como álcali y que inhiben la producción de biogás en el reactor metanogénico (Kyazze et al., 2007).

Kraemer y Bagley (2005) propusieron la recirculación de una fracción del efluente metanogénico a los sistemas de fermentación oscura y observaron una reducción de la cantidad de alcalinidad necesaria para el control del pH acompañada de una disminución en los rendimientos de hidrógeno. Los bajos rendimientos de hidrógeno observados durante la recirculación fueron asociados con la introducción de microorganismos metanogénicos y de microorganismos que generan productos reducidos (por ejemplo, ácido propiónico y etanol). Por ello los autores sugieren la necesidad de una etapa de pre-tratamiento mediante filtración con membrana para el líquido recirculado que permita la eliminación de dicha microflora.

Sin embargo, esta estrategia basada en la recirculación fue evaluada con resultados satisfactorios por otros autores sin la necesidad de una etapa de pre-tratamiento para el efluente recirculado. Este fue el caso de Lee et al. (2010) que evaluaron la recirculación de lodo precipitado desde un reactor de metano de 40 L a un reactor de hidrógeno de 10 L. Dicha operación fue estable durante un periodo de 150 días con un rendimiento de hidrógeno de 205 mL H<sub>2</sub>/g SV añadido. En este estudio el pH del reactor de hidrógeno fue mantenido en el rango 5,4-5,7 mediante la recirculación del lodo digerido, el cual presentó una alta alcalinidad, de modo que no fue necesario añadir reactivos para ajustar el pH.

## 5.2. OBJETIVOS.

El objetivo general de este capítulo es el estudio del proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas con y sin adición de sobrenadante digerido en la etapa de producción de hidrógeno, para determinar si dicha estrategia permite reducir los requerimientos de alcalinidad para la regulación del pH en el reactor de hidrógeno, así como para identificar otros efectos adicionales causados por la adición del sobrenadante digerido.

Entre los objetivos específicos están los siguientes:

- ❖ Evaluación a escala de laboratorio del efecto, en la producción de hidrógeno y en el consumo de alcalinidad, de la adición al sistema de fermentación oscura de sobrenadante digerido con y sin previo tratamiento en un sistema de filtración con membranas de ultrafiltración y nanofiltración.
- ❖ Evaluación del rendimiento de hidrógeno en un reactor de mezcla completa con un volumen de trabajo de 25 L en régimen mesofílico y utilizando como sustrato residuos de comida con fracción proteica:
  - Estudio del efecto de la adición de sobrenadante digerido sin pre-tratar sobre el rendimiento de hidrógeno y el consumo de alcalinidad.
  - Evaluación de la etapa de metanización posterior, en un reactor de mezcla completa en régimen mesofílico.

## 5.3. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 5.3.1. Metodología experimental.

Este estudio comenzó con un ensayo a escala de laboratorio para comparar el rendimiento de sistemas de fermentación oscura cuando son recirculados efluentes de sobrenadante digerido sin pre-tratar y pre-tratados en una unidad de filtración con membranas planas de diferentes tamaños de poro. Posteriormente fue evaluado un proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas a escala piloto con y sin recirculación de sobrenadante digerido.

#### 5.3.1.1. Adición de sobrenadante digerido (con y sin pre-tratamiento de filtración) en un sistema de fermentación oscura a escala de laboratorio.

En este ensayo el sustrato utilizado consistió en un residuo de comida generado en una frutería (A1). Dicha mezcla contenía únicamente frutas y verduras y fue descrita en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. El inóculo utilizado fue lodo digerido con una concentración de sólidos totales (ST) y de sólidos volátiles (SV) de 22,1 g/L y 12,0 g/L, respectivamente, y fue descrito en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. No fue aplicado ningún pre-tratamiento al inóculo ya que no fue considerada una estrategia práctica para futuras aplicaciones a gran escala.

Los reactores utilizados fueron erlenmeyers de 250 mL similares a los utilizados en el Capítulo 4 (figura 4.1). La medición del volumen de gas fue realizada mediante medidores de desplazamiento de agua. Los reactores fueron sumergidos en un baño termostatzado a  $34\pm 2$  °C y provistos de agitación magnética.

La denominación de los reactores fue basada en las condiciones de operación. Así, el reactor WR operó sin recirculación de sobrenadante digerido, el

reactor MR trabajó con recirculación de sobrenadante digerido sin pre-tratar mediante filtración, y los sistemas MR-1, MR-2 y MR-3 operaron con recirculación de permeados obtenidos al someter el sobrenadante digerido a un pre-tratamiento de filtración con membrana. Dichos permeados fueron obtenidos utilizando el sistema de membrana plana (modelo LABCELL-F-1 de Koch Membrane Systems) descrito en el Capítulo 4 (figura 4.1). Tres membranas con tamaños de poro de 100.000, 10.000 y 250 Daltons fueron utilizadas para obtener los permeados que posteriormente fueron alimentados a los sistemas denominados MR-1, MR-2 y MR-3, respectivamente. Las principales características de las membranas están recogidas en la tabla 5.1. La membrana SelROTM MPF-44 operó bajo una presión de 8-10 bars alcanzada por presurización con nitrógeno. Las membranas HFK-131 y HFM-180 operaron bajo una presión de 2-3 bars alcanzada mediante la válvula de regulación de presión.

**Tabla 5.1. Características de las membranas utilizadas.**

<i>Membrana KOCH</i>	<b>Características de retención</b>	<b>Descripción</b>	<b>pH rango</b>	<b>Max. Temp. (°C)</b>
<b>SelROTMMPF-44</b>	250 Daltons	Composite, Nanofiltración	2 -10	40
<b>HFK-131</b>	10.000 Daltons	PES <sup>1</sup> Ultrafiltración	2 -10	55
<b>HFM-180</b>	100.000 Daltons	PVDF <sup>2</sup> Ultrafiltración	2 -10	55

<sup>1</sup> PES polietersulfona

<sup>2</sup> PVDF Polivinilideno fluorado

El sobrenadante digerido fue obtenido tras someter el lodo digerido utilizado como inóculo a sedimentación por gravedad. Las principales características del sobrenadante digerido y los permeados alimentados a los reactores están recogidas en la tabla 5.2.

**Tabla 5.2. Principales características del sobrenadante digerido y de los permeados.**

<i>Parámetro</i>	<b>Sobrenadante digerido</b>	<b>Permeado-SelRO™MPF-44</b>	<b>Permeado-HFK-131</b>	<b>Permeado-HFM-180</b>	
<b>pH</b>	8,5	7,5	8,0	8,0	
<b>ST (g/L)</b>	1,85	0,66	0,76	0,81	
<b>SV (g/L)</b>	1,29	0,16	0,20	0,25	
<b>DQO (mg/L)</b>	1667	238	476	476	
<b>Alcalinidad (mg/L)</b>	2000	1000	1600	1600	
<b>Amonio (mg/L)</b>	650	629	460	352	
<b>Conductividad (µs/cm)</b>	958	325	745	873	
<b>AGV (g/L)</b>	<b>Acético</b>	30	--	--	24
	<b>Propiónico</b>	72	--	44	78
	<b>Valérico</b>	15	--	--	--
	<b>Caproico</b>	20	--	--	--

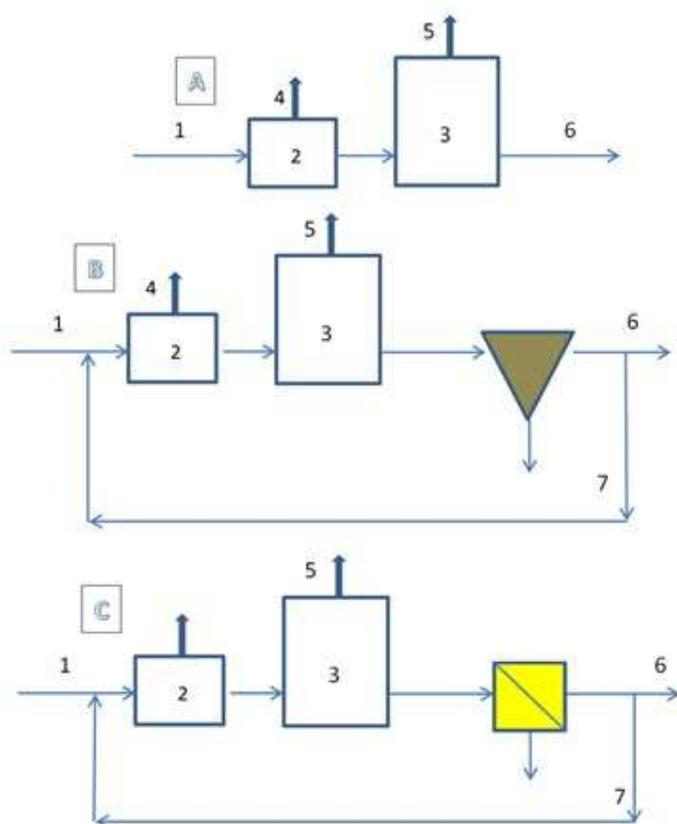
Cada reactor fue cargado con 200 mL de inóculo e introducido en un baño termostático. Una vez transcurridas 24 horas fue iniciado el proceso de alimentación. La mezcla alimentada al reactor presentó un contenido aproximado de ST del 3% tras ser diluida la mezcla A1 (con un contenido en ST del 6%) con el correspondiente líquido de dilución (agua para el sistema WR, sobrenadante digerido sin pre-tratar para el sistema MR y permeados para los sistemas MR-1, MR-2 y MR-3).

Los reactores operaron en semi-continuo con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 3 días, siendo alimentados una vez al día, y fueron mantenidos en funcionamiento durante 60 días (excepto el sistema MR-3 el cual operó durante 71 días). Para ello antes de introducir en el reactor la alimentación fresca, el mismo volumen de líquido fue retirado del reactor. El pH de los sistemas fue controlado de modo manual cada vez que los reactores fueron alimentados, manteniéndolo entre 5,0 y 6,0 unidades mediante la adición de una solución alcalina. Esta solución consistió en una mezcla de NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y KOH en concentraciones 40 g/l, 40 g/L y 60 g/L, respectivamente.

La fase de arranque fue estudiada por duplicado utilizando los sistemas WR y MR-3. De este modo, el sistema MR-3 operó inicialmente sin adición del

correspondiente permeado durante 40 días. Durante esta fase de arranque sólo fueron monitorizados la producción de hidrógeno y el consumo de alcalinidad. Después de este periodo fue adicionado el correspondiente permeado a la alimentación del sistema MR-3 durante 31 días.

La figura 5.1 muestra un diagrama de flujo de los reactores utilizados en el ensayo. El reactor 2 corresponde al reactor de producción de hidrógeno y el 3 a un reactor metanogénico. En este estudio únicamente fue evaluado el reactor de producción de hidrógeno y el efluente metanogénico utilizado para obtener las diferentes recirculaciones fue el lodo digerido utilizado como inóculo.



**Figura 5.1. Diagrama de flujo de los reactores: (A) Reactor operando sin recirculación (WR), (B) Reactor operando con recirculación de sobrenadante metanogénico (MR), (C) Reactor operando con recirculación de permeados obtenidos a partir del efluente metanogénico (MR-1, MR-2 y MR-3). 1.- Alimentación, 2.- Reactor de hidrógeno, 3.- Reactor metanogénico, 4.- Producción de hidrógeno, 5.- Producción de metano, 6.- Efluente del reactor metanogénico, 7.- Recirculación.**

### **5.3.1.2. Producción de hidrógeno y metano en dos etapas a escala piloto con y sin adición de sobrenadante digerido.**

El sustrato utilizado consistió en un residuo de comida elaborado a partir de alimentos frescos (A2). Dicha mezcla fue elaborada con frutas, verduras, pan, carne y pescado de forma que cada componente presentó una contribución fija en el contenido en ST de la mezcla, la cual fue descrita en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. El inóculo utilizado fue lodo digerido con una concentración de ST y de SV de 22,0 g/L y 13,8 g/L, respectivamente, y fue descrito en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. No fue aplicado ningún pre-tratamiento al inóculo.

El trabajo experimental fue dividido en dos fases. La primera fase consistió en la evaluación de un proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas en condiciones mesofílicas ( $34\pm 2$  °C). Para producir hidrógeno fue utilizado el Reactor 3 de la planta piloto descrito en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. Para producir metano fue utilizado un reactor de mezcla completa de 22 L de capacidad, fabricado en acero inoxidable, con una toma de fondo, una apertura superior y una apertura lateral, utilizada para la toma de muestras y por donde el sustrato fue aportado diariamente (figura 5.2). El reactor fue provisto de un agitador tipo RZR 1 de la casa Heidolph y de un dispositivo para la regulación de la velocidad de agitación. A su vez, fue provisto de un encamisado exterior por el que circuló agua de calefacción que permitió mantener el sistema a una temperatura controlada. El gas producido fue recogido por una abertura superior y fue conducido a un medidor.

El reactor de hidrógeno operó con un volumen de trabajo de 25 L y un TRH de 3 días. Fue alimentado con la mezcla A2 con un contenido de ST del 3%. Dicho contenido en ST fue fijado para incrementar la estabilidad del proceso de fermentación tal y como indican los resultados obtenidos por Gómez et al. (2009). El reactor de metano fue evaluado con un volumen de trabajo de 18 L y un TRH de 25 días. Fue alimentado con el efluente procedente del reactor de hidrógeno. El exceso procedente de este reactor fue extraído del sistema. Ambos reactores

operaron en semi-continuo durante 63 días siendo alimentados de forma manual dos veces al día. Para ello antes de introducir en el reactor la alimentación fresca, el mismo volumen de líquido fue retirado del reactor.



**Figura 5.2. Fotografía del reactor utilizado para la producción de metano.**

El pH del reactor de hidrógeno fue controlado de modo manual cada vez que el reactor fue alimentado, manteniéndolo entre 5,0 y 6,0 unidades mediante la adición de una solución alcalina. Esta solución consistió en una mezcla de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{KOH}$  en concentraciones 120 g/l, 120 g/L y 180 g/L, respectivamente.

En la segunda fase experimental fue evaluado el efecto de adicionar sobrenadante digerido al sistema de producción de hidrógeno. Para obtener dicho sobrenadante el lodo digerido utilizado como inóculo fue sometido a sedimentación por gravedad. Dicho sobrenadante fue mezclado con el residuo de comida utilizado como sustrato de forma que el contenido en ST y SV de la mezcla alimentada al reactor de hidrógeno fue 28,8 g/L y 26,2 g/L,

respectivamente. El volumen de sobrenadante añadido representó el 20% del volumen total de la alimentación. El sistema de producción de hidrógeno fue evaluado bajo estas condiciones durante 35 días. Una vez fue completada la evaluación del rendimiento del reactor fueron restablecidas las condiciones de la primera fase experimental manteniendo la operación durante 10 días. Para la etapa metanogénica fueron mantenidas las condiciones de operación descritas en la primera fase experimental.

La producción diaria de gas fue medida utilizando un caudalímetro de impulsos en la etapa de producción de hidrógeno, y un medidor de desplazamiento de agua de volumen reversible asociado a un contador de contacto húmedo en la etapa de producción de metano.

### **5.3.2. Metodología analítica.**

Los análisis rutinarios para el control del proceso fueron: pH, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), demanda química de oxígeno (DQO), amonio, concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y volumen y composición de biogás producido. En el reactor de metano también fue determinada la alcalinidad. Todos ellos fueron medidos de modo general 2 veces por semana, excepto el volumen producido que fue medido a diario, conforme a los procedimientos descritos en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. Todos los datos de producción de gas fueron normalizados a temperatura y presión estándar (0 °C y 760 mm Hg).

### **5.3.3. Tratamiento estadístico de los datos.**

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Origin 6.1, llevando a cabo un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) que permitió determinar si el efecto que tiene la adición de sobrenadante digerido sobre el consumo diario de solución alcalina y la producción específica de hidrógeno es significativo a un nivel de significación del 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Además, fue aplicado

el test de separación de medias de Tukey para comparar entre que líquidos adicionados existen diferencias significativas respecto al consumo diario de solución alcalina a un nivel de significación del 95%.

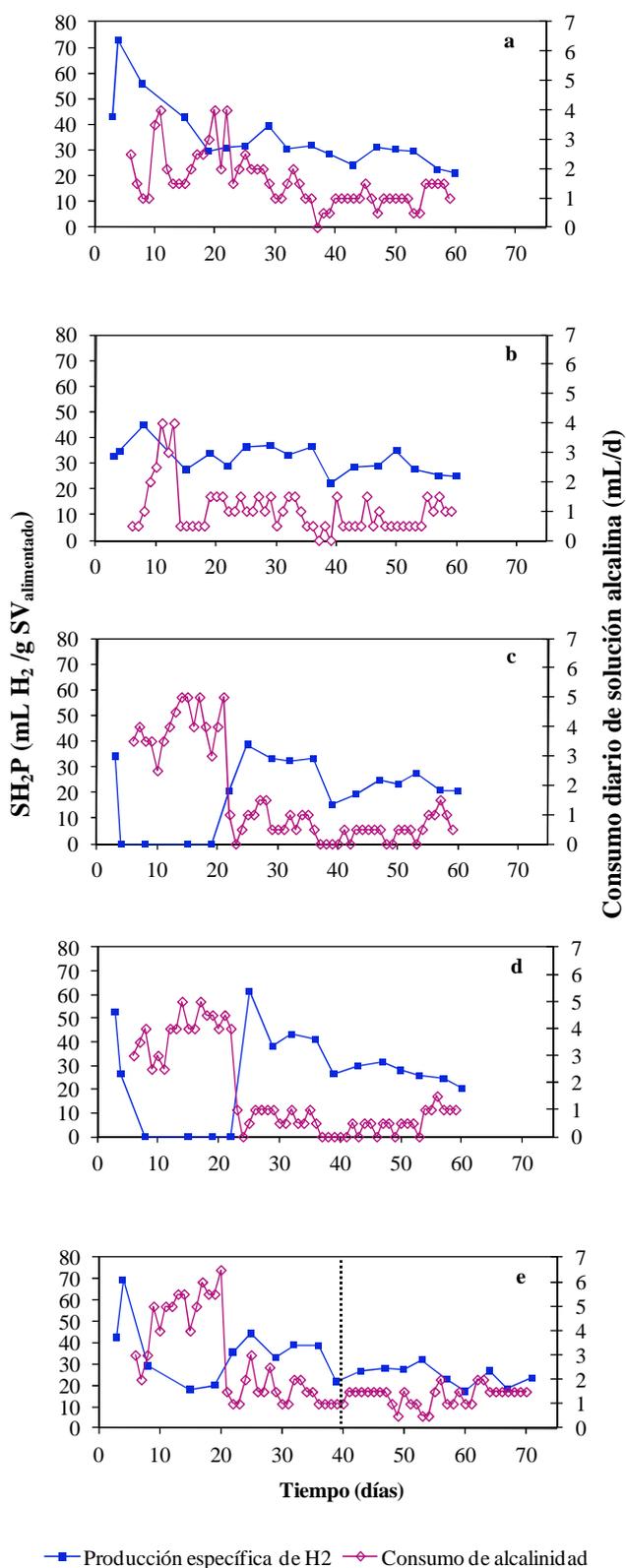
## **5.4. RESULTADOS.**

### ***5.4.1. Adición de sobrenadante digerido (con y sin pre-tratamiento de filtración) en un sistema de fermentación oscura a escala de laboratorio.***

#### **5.4.1.1. Producción de hidrógeno.**

El pH inicial de los reactores fue de 7,7, correspondiente al pH del inóculo utilizado. Una vez iniciado el proceso de alimentación, el pH de los sistemas disminuyó gradualmente alcanzando el valor de 5,8 en el día 3. El control manual de pH fue establecido a partir del día seis ya que fue entonces cuando el pH de los sistemas después de ser alimentados descendió hasta valores inferiores a 5,5 unidades. Una vez restaurado el valor del pH, después de cada proceso de alimentación, no fueron realizadas otras correcciones hasta la siguiente alimentación. Este descenso del pH, observado en todos los reactores durante la fase de arranque, fue debido a la acumulación de AGV. Este comportamiento en la modificación del pH fue también observado por otros autores (Han y Shin, 2004; Liu et al., 2006; Gómez et al., 2009).

La figura 5.3 muestra la evolución del consumo diario de solución alcalina y de la producción específica de hidrógeno ( $\text{SH}_2\text{P}$ ) calculada en base al volumen diario de hidrógeno producido y la masa de SV alimentada diariamente al reactor.



**Figura 5.3.** Evolución del consumo diario de solución alcalina y de la producción específica de hidrógeno (SH<sub>2</sub>P) en los sistemas: WR (a), MR (b), MR-1 (c), MR-2 (d) y MR-3 (e).

En todos los sistemas evaluados la producción de gas comenzó inmediatamente una vez cargados los reactores, pero tras unos pocos días de funcionamiento (alrededor del día 8 para el sistema MR y del día 4 para los otros sistemas) descendió progresivamente, al igual que el contenido de hidrógeno en el gas generado. Los sistemas MR-1 y MR-2 fueron caracterizados por un periodo de nula producción de hidrógeno (desde los días 5 al 20) y la posterior reactivación de los sistemas fue alcanzada sin modificar la estrategia de alimentación. Este comportamiento concuerda con los resultados publicados por Gómez et al. (2006, 2009) quienes observaron una rápida producción de gas durante el arranque de los reactores de producción de hidrógeno y una posterior disminución en los días siguientes. Por otro lado, una vez superada la fase lag (primeros 20 días de operación), la producción de biogás y el contenido en hidrógeno aumentaron en todos los sistemas estudiados obteniéndose resultados estables durante los restantes días de funcionamiento. Además del descenso en la producción de hidrógeno observado durante el arranque en todos los sistemas estudiados, también fue observado un aumento en el volumen de solución alcalina necesaria para la regulación del pH, con un posterior descenso en los días siguientes cuando los sistemas registraron un comportamiento estable.

Respecto a los sistemas WR y MR-3, los cuales operaron inicialmente como réplicas, presentaron un comportamiento similar durante la fase lag, siendo el sistema MR-3 el que presentó un mayor consumo de alcalinidad. Por otro lado, el sistema MR presentó menos variaciones en la producción de hidrógeno durante los primeros 20 días de operación en comparación con los otros reactores.

Los diferentes comportamientos de los reactores durante el arranque podrían ser explicados por diferencias en el proceso de germinación de las esporas de bacterias productoras de hidrógeno presentes en el sobrenadante digerido. Así, la calidad del sobrenadante digerido puede afectar a dicho proceso. El rendimiento del reactor MR sugiere que el sobrenadante digerido sin pre-tratar puede contener una variedad de bacterias productoras de hidrógeno que permitieron reducir la fase lag y alcanzar una producción de hidrógeno estable desde el día 13. Los géneros *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium* son capaces de producir hidrógeno a partir de carbohidratos (Dong et al., 2008). *Clostridium spp.* constituyen una parte

importante de la población microbiana productora de hidrógeno en los sistemas de fermentación oscura. Estos microorganismos forman esporas y presentan altos niveles de tolerancia en condiciones ambientales desfavorables tales como insuficiencia de nutrientes, oxígeno, altas temperaturas y bajos pH (Hawkes et al., 2008). Lee et al. (2010) publicaron que las formas esporuladas de *Clostridium spp.* presentes en el efluente metanogénico recirculado a un sistema de producción de hidrógeno por fermentación oscura pueden jugar un papel importante a la hora de alcanzar la viabilidad económica del proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas, ya que su germinación permite alcanzar altas producciones de hidrógeno durante largos periodos de tiempo (meses). En esta misma línea, Chu et al. (2008) estudiaron el proceso de fermentación en dos etapas (para la producción termofílica de hidrógeno y la producción mesofílica de metano) con recirculación de lodo digerido utilizando como sustrato residuos de comida. Los autores observaron que las bacterias productoras de hidrógeno presentes en el lodo digerido contribuyeron a mantener altas concentraciones de estos organismos en el reactor de producción de hidrógeno.

Aunque, los reactores evaluados presentaron diferentes comportamientos durante la fase de arranque, todos ellos están caracterizados por la ausencia de metano en el biogás producido. Este resultado indica que las condiciones de operación evaluadas fueron suficientes para reducir la actividad de los microorganismos metanogénicos viables presentes en el sobrenadante digerido adicionado a los sistemas. A su vez, estos resultados también indicaron que el tratamiento del sobrenadante digerido mediante filtración con membrana no fue necesario para lograr una producción estable de hidrógeno. Estos resultados concuerdan con los publicados por Lee et al. (2010). En dicho estudio observaron una producción de hidrógeno estable durante un proceso termofílico de fermentación en dos etapas usando residuo de comida como sustrato y recirculando lodo digerido. En este trabajo no fue necesario aplicar tratamientos de filtración con membrana o de calor para acondicionar el lodo recirculado.

La aplicación de un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) a los datos obtenidos para los sistemas individuales (utilizando los datos desde el día 25 al día 60 para los sistemas WR, MR, MR-1 y MR-2, y desde el día 43 al día

71 para el sistema MR-3) revelan que el efecto del tipo de sobrenadante digerido adicionado en el consumo diario de solución alcalina fue significativo a un nivel de significación del 95% ( $\alpha=0,05$ ) para los sistemas estudiados (la tabla A.4 del Anexo A.II recoge los resultados del análisis estadístico). Esto quiere decir que al menos una de los sobrenadantes ha originado consumos de alcalinidad tales que su media difiere estadísticamente del resto de los sistemas. Sin embargo, no fueron observadas diferencias significativas en la producción específica de hidrógeno de los sistemas evaluados a un nivel de significación del 95% (la tabla A.5 del Anexo A.II recoge los resultados del análisis estadístico). Esto implica que ningún efecto en la producción de hidrógeno fue detectado cuando el sobrenadante digerido y los permeados fueron añadidos a la alimentación.

Una vez confirmado que el tipo de sobrenadante tuvo un efecto significativo sobre el consumo diario de solución alcalina, fue aplicado el test de separación de medias de Tukey para comparar entre que sistemas existen diferencias significativas en el consumo diario de solución alcalina a un nivel de significación del 95%. Los resultados indicaron que el sobrenadante digerido aplicado a los sistemas MR, MR-1 y MR-2 disminuyó significativamente el consumo diario de solución alcalina (la tabla A.6 del Anexo A.II recoge los resultados del análisis estadístico). Este resultado confirma que la adición de sobrenadante digerido (sistema MR) o permeado de ultrafiltración (sistemas MR-1 y MR-2) en la alimentación de los sistemas redujo los requerimientos de alcalinidad para el control del pH. Sin embargo, este no ocurrió cuando fue utilizado el permeado de nanofiltración. Esto fue debido a que alcalinidad de dicho permeado fue inferior a la del sobrenadante digerido y la de los permeados de ultrafiltración.

Chu et al. (2008) observaron que la alta alcalinidad del lodo digerido recirculado al reactor de hidrógeno en un proceso de fermentación en dos etapas permitió neutralizar la acidez del reactor de hidrógeno reduciendo los costes asociados a los agentes químicos utilizados para la regulación de su pH. Además, permitió mantener un bajo nivel de iones  $\text{Na}^+$  en el efluente del reactor de hidrógeno. Por otro lado, Kraemer y Bagley (2005) publicaron que la recirculación permitió reducir el consumo de alcalinidad para el control del pH en

aproximadamente un 40% cuando estudiaron un sistema de producción de hidrógeno en dos fases con control del pH a 5,5 unidades y un ratio de reciclo del 0,98. Romli et al. (1994) observaron una reducción del consumo de alcalinidad de 31% cuando evaluaron el efecto de la recirculación en un sistema de tratamiento anaerobio de aguas residuales de alta carga en dos fases, con un ratio de reciclo igual a 1. En el presente trabajo, la reducción media en el consumo diario de solución alcalina fue del 52% para el sistema MR-2 cuando fue comparado con los requerimientos de alcalinidad del sistema WR. Esta reducción fue mayor que la reportada por Kraemer y Bagley (2005), esto pudo ser debido a que en dicho estudio la recirculación utilizada presentó una alcalinidad inferior ya que el pH del efluente del reactor de metano descendió de 7,2 a 6,9 una vez que el proceso de recirculación fue iniciado. Esta caída del pH fue debida a que menos hidróxido de sodio fue utilizado para regular el pH durante la etapa de recirculación, de este modo la alcalinidad disponible fue más baja en su sistema en dos fases. Lee et al. (2010) también observaron que una baja alcalinidad en la recirculación utilizada para regular el pH ocasionó un descenso en el pH del reactor de hidrógeno. Los autores sugirieron que esta caída del pH ocasiona un cambio en las rutas metabólicas de fermentación predominantes en el reactor de hidrógeno pasando de una fermentación tipo ácido butírico a una fermentación donde los productos principales fueron solventes y ácido láctico. Esto provocaría un descenso en la producción de hidrógeno debido a la reducción de la actividad de bacterias productoras de hidrógeno.

La tabla 5.3 muestra los parámetros de rendimiento de los sistemas de producción de hidrógeno (los valores fueron calculados utilizando los datos obtenidos desde el día 25 al día 60 para los sistemas WR, MR, MR-1 y MR-2, y desde el día 43 al día 71 para el sistema MR-3). Aunque los resultados fueron similares, el sistema MR-2 presentó valores medios más altos para los parámetros de rendimiento del reactor. Esto fue debido a que después de la reactivación del sistema, tras el periodo de nula producción de hidrógeno, el reactor MR-2 presentó un alto contenido de hidrógeno en el gas (36%) que posteriormente descendió presentando finalmente un comportamiento similar al de los otros reactores. Sin embargo, debido a la alta producción de hidrógeno que ocurrió

inmediatamente después de la reactivación del sistema MR-2, la concentración media de hidrógeno en el gas fue del 25% siendo este valor medio mayor que los obtenidos en los otros sistemas estudiados.

**Tabla 5.3. Valores medios de los parámetros de rendimiento de los sistemas evaluados.**

Parámetro	WR <sup>1</sup>	MR <sup>1</sup>	MR-1 <sup>1</sup>	MR-2 <sup>1</sup>	MR-3 <sup>2</sup>
<b>Producción de gas (mL/d)</b>	237±10	253±8	233±12	246±8	192±4
<b>% H<sub>2</sub> em el gas</b>	22±1,0	22±0,9	21±0,7	25±1,5	23±1,5
<b>Producción H<sub>2</sub> (L H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>*d)</b>	0,27±0,01	0,28±0,01	0,24±0,02	0,31±0,03	0,23±0,01
<b>SH<sub>2</sub>P (mL H<sub>2</sub>/g SV<sub>alimentado</sub>)</b>	29,2±1,5	30,5±1,6	26,2±2,2	33,7±3,5	24,7±1,6
<b>Rendimiento H<sub>2</sub> (mL H<sub>2</sub>/g SV<sub>eliminado</sub>)</b>	78±4	85±3	73±5	97±4	62±2
<b>Consumo de alcalinidad (mL/d)</b>	1,17±0,09	0,83±0,08	0,59±0,07	0,56±0,07	1,32±0,08
<b>ST (g/L)</b>	22,4±1,1	22,8±0,7	22,6±0,8	23,1±0,9	21,9±0,8
<b>SV (g/L)</b>	20,4±0,7	20,6±0,5	20,4±0,6	20,9±0,6	19,8±0,6
<b>% Destrucción SV</b>	24,00±0,04	23,00±0,03	24,00±0,05	22,00±0,04	26,00±0,04
<b>DQO<sub>s</sub> (g/L)</b>	12,5±1,8	11,7±1,7	12,9±1,7	13,2±1,8	12,9±1,7

±: desviación durante la fase estable o steady state.

<sup>1</sup>los valores fueron calculados utilizando los datos obtenidos desde el día 25 al día 60.

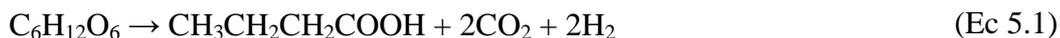
<sup>2</sup>los valores fueron calculados utilizando los datos obtenidos desde el día 43 al día 71.

Los rendimientos de hidrógeno recogidos en la tabla 5.3 están expresados en términos de volumen diario de hidrógeno gas producido por volumen de reactor. El reactor MR-2 alcanzó el rendimiento más alto con un valor medio de 0,31±0,03 L H<sub>2</sub>/ L<sub>reactor</sub>\*d debido a las razones previamente explicadas y dicho rendimiento no fue significativamente diferente a los resultados obtenidos en los otros reactores. Los rendimientos de hidrógeno en términos de volumen de

hidrógeno gas producido por cantidad de SV eliminado estuvieron, para todos los sistemas estudiados, en el rango de 62 a 97 mL H<sub>2</sub>/g SV<sub>eliminado</sub>.

Con respecto al contenido de sólidos en los diferentes reactores evaluados, no fueron observadas diferencias significativas y todos los sistemas presentaron valores similares de SV eliminados. Además, no hay diferencias relevantes entre los reactores con respecto a los datos de DQO soluble.

Teóricamente, la glucosa puede ser convertida directamente a hidrógeno por bacterias anaerobias a través del metabolismo de fermentación ácido butírico/ácido acético (ecuaciones 5.1 y 5.2) proporcionando rendimientos de 2-4 mol de hidrógeno por mol de hexosa convertida, respectivamente (Levin et al. 2004).



La eficiencia del proceso puede ser calculada utilizando la equivalencia propuesta por Valdez-Vazquez et al. (2005). Ellos asumieron que 1 gramo de SV equivale aproximadamente a 0,9 gramos de hexosa. Así, el rendimiento medio de hidrógeno, para todos los sistemas evaluados, calculado en términos de moles de hexosa convertida fue  $0,71 \pm 0,09$  mol de hidrógeno por mol de hexosa, lo cual implicó una eficiencia de  $17,8 \pm 2,3\%$  cuando el resultado fue comparado con el máximo rendimiento de 4 mol de hidrógeno por mol de hexosa. Rendimientos de hidrógeno de 1,25 moles de hidrógeno por mol de hexosa han sido observados en sistemas operando en continuo con bacterias anaerobias facultativas del género *Enterobacter* (Tanisho y Ishiwata, 1994). Sin embargo, rendimientos más altos fueron observados cuando microorganismos anaerobios obligados tales como especies del género *Clostridium* fueron responsables de la producción de hidrógeno (Hussy et al., 2005). Debido al hecho de que en este estudio los reactores fueron mantenidos en contacto con la atmósfera en el momento de ser

alimentados y ser ajustado el pH, parece probable que los microorganismos facultativos hayan sido los principales productores de hidrógeno.

#### **5.4.1.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV).**

La figura 5.4 representa las variaciones en la concentración de AGV de los sistemas estudiados. La evolución de la concentración de los AGV es un importante parámetro para analizar los caminos de fermentación y permite explicar la variabilidad de la producción de hidrógeno representada en la figura 5.2. Así, los sistemas MR-1 y MR-2 estuvieron caracterizados por bajas concentraciones de ácido butírico, una alta concentración de ácido acético, y una nula producción de hidrógeno durante la fase lag (primeros 20 días de operación). Esta nula producción de hidrógeno contrasta con los comportamientos observados en los otros reactores donde únicamente fue observada una reducción de la producción asociada a concentraciones inferiores de ácido acético y concentraciones superiores de ácido butírico, en comparación con los sistemas MR-1 y MR-2.

Dicho comportamiento de los sistemas MR-1 y MR-2 puede ser explicado en base a los argumentos utilizados por Chen et al. (2009). En este estudio los autores publicaron la existencia de microorganismos homoacetogénicos, principalmente *Clostridium spp.*, capaces de crecer heterotróficamente mediante la conversión de glucosa en ácido acético sin producción de hidrógeno (Ec. 5.3), y otros capaces de crecer autotróficamente produciendo ácido acético a partir de una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono como únicas fuentes de energía y carbono (Ec. 5.4). Todo ello puede ocasionar un incremento en la concentración de ácido acético observando de forma simultánea una nula producción de hidrógeno, tal y como ocurrió durante la fase lag de los sistemas MR-1 y MR-2.



En este estudio, la concentración de ácido butírico aumentó en todos los sistemas a partir del día 20 y fue el AGV mayoritario producido una vez la fase lag fue superada. Este resultado sugiere que la adición de sobrenadante no modificó los caminos de fermentación en la degradación de los compuestos orgánicos siendo la principal ruta metabólica la fermentación tipo ácido butírico. Es importante tener en cuenta que la ruta de producción de hidrógeno generando como subproducto ácido butírico presenta un rendimiento menor por unidad de substrato alimentado que la ruta de producción de hidrógeno que genera como subproducto ácido acético (ecuaciones 5.1 y 5.2, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los publicados por Lee et al. (2010). Estos autores observaron que los AGV mayoritarios fueron el ácido butírico (30,5-37,7%) y el ácido acético (14,9%-26,7%) durante un proceso de producción en régimen termofílico de hidrógeno y metano en dos fases con recirculación de lodo digerido.

Por otro lado, la concentración de ácido propiónico fue baja en todos los sistemas durante el periodo de operación. La fermentación tipo ácido propiónico ha sido asociada con bajos rendimientos de hidrógeno (Li et al., 2009). Ren et al. (2007) observaron una reducción de la producción de hidrógeno asociada a un incremento en la concentración de ácido propiónico con valores de pH en torno a 5,5.

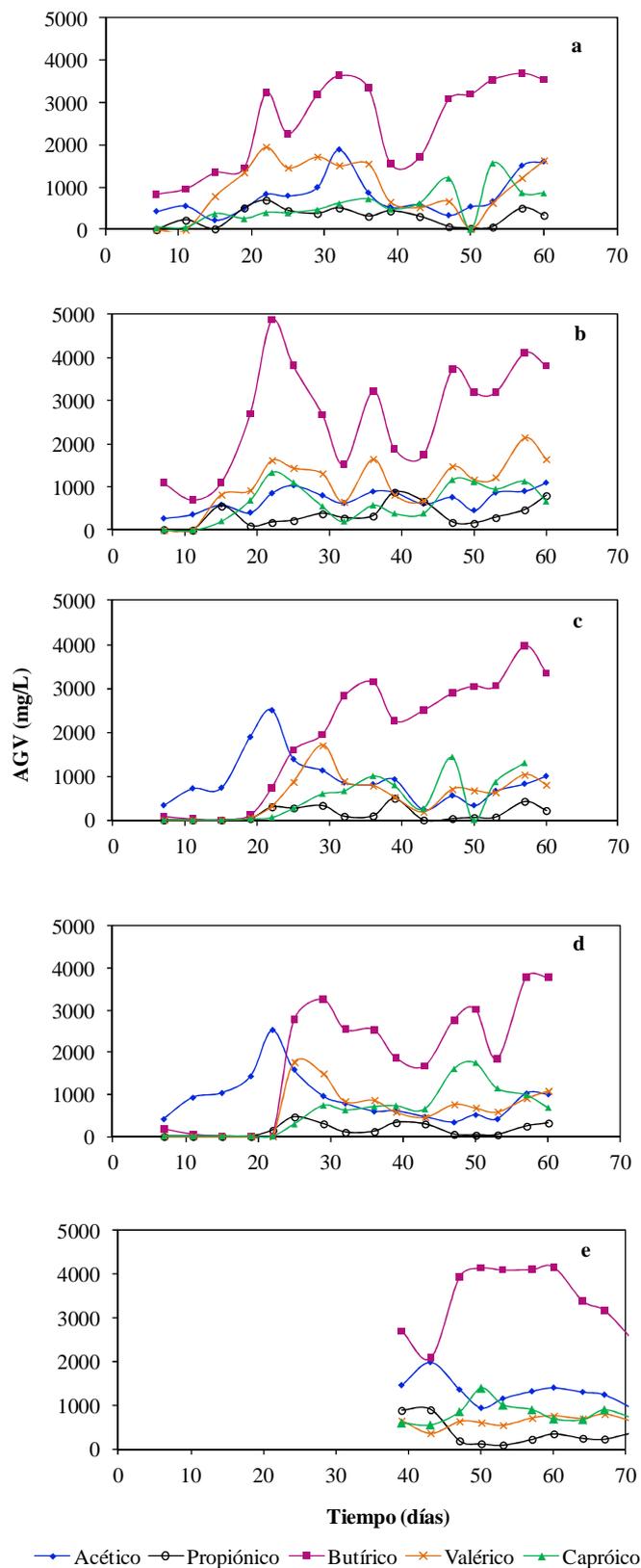


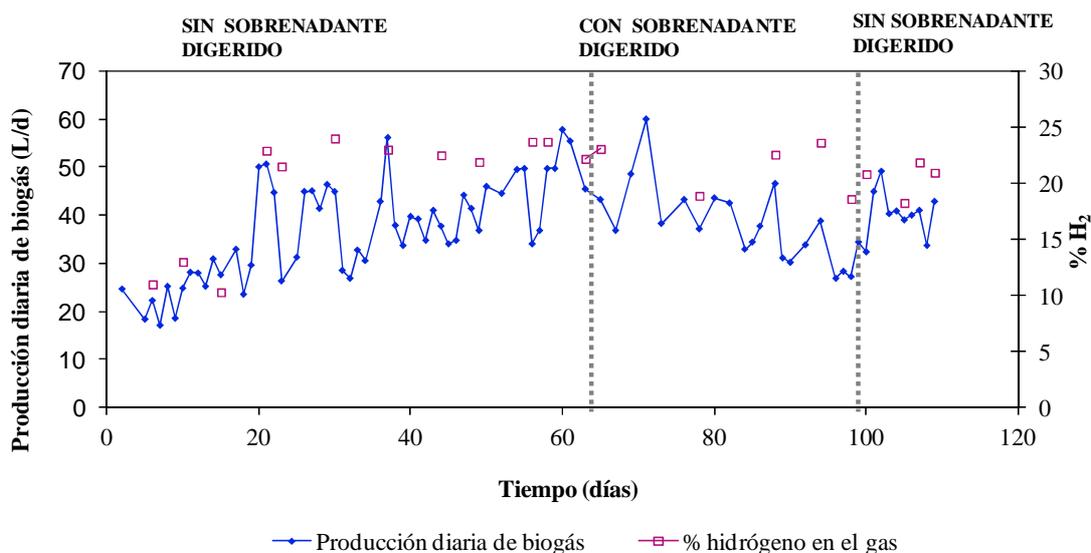
Figura 5.4. Evolución de la concentración de AGV en los sistemas: WR (a), MR (b), MR-1 (c), MR-2 (d) y MR-3 (e).

### 5.4.2. Producción de hidrógeno y metano en dos etapas a escala piloto con y sin adición de sobrenadante digerido.

#### 5.4.2.1. Producción de hidrógeno por fermentación oscura sin adición de sobrenadante digerido.

El pH inicial del reactor de producción de hidrógeno fue de 7,9, correspondiente al pH del inóculo utilizado. Este valor descendió gradualmente una vez que el proceso de alimentación fue iniciado, alcanzando el valor de 5,6 en el día 3. La acidificación del reactor fue debida a la conversión de materia orgánica en AGV, y al reemplazamiento del contenido del reactor por la mezcla de alimentación, la cual presentó un valor bajo de pH (5,0 unidades). El control manual del pH fue establecido cuando el pH del sistema, después de ser alimentado, descendió hasta valores inferiores a 5,5 unidades.

La figura 5.5 muestra la producción diaria de biogás en el reactor de hidrógeno (medido como el volumen total de gas producido diariamente, L/d), así como el contenido de hidrógeno en el gas generado.



**Figura 5.5. Evolución de la producción diaria de biogás y del contenido de hidrógeno en el gas producido durante la etapa de producción de hidrógeno.**

Aunque la producción de gas comenzó de forma inmediata tras alimentar el reactor, el volumen producido fue bajo presentando un progresivo incremento con el tiempo de operación. Durante este periodo inicial (que abarca los 20 primeros días) el biogás producido estuvo caracterizado por un bajo contenido en hidrógeno ( $11,4\pm 0,3\%$ ). Una vez transcurridos los primeros 20 días fue observado un aumento del rendimiento del proceso, asociado a un aumento en la producción diaria de gas y en el contenido de hidrógeno de dicho gas. El mecanismo de producción de hidrógeno por fermentación indica que los carbohidratos son los sustratos óptimos para la producción de hidrógeno en comparación con proteínas, lípidos y lignocelulosas, así la producción de hidrógeno desde un sustrato que incorpore proteínas o grasas (caso presente) es muy inferior a la producción observada desde un sustrato basado en carbohidratos (Dong et al., 2009; Li et al., 2009). Por lo tanto, el rendimiento inicial del sistema de producción de hidrógeno puede ser interpretado como un periodo de adaptación al contenido en lípidos y en nitrógeno del sustrato.

Un comportamiento estable (en términos del contenido de hidrógeno en el gas producido) fue observado a partir del día 20 de operación, registrando un contenido medio de  $22,8\pm 0,9\%$  (valor calculado utilizando los datos obtenidos desde el día 20 al día 63). La concentración media de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) en el biogás fue  $12\pm 2$  ppm y el contenido de metano estuvo dentro del rango 0,00-1,73% durante el tiempo de operación. La presencia de metano en el biogás ha sido observada durante el proceso de producción de hidrógeno por fermentación oscura utilizando como sustrato una mezcla de residuo de comida y residuo de sangre procedente de un matadero de aves (Cuetos et al., 2007). En este estudio el incremento en la concentración de metano fue asociado con el incremento en el contenido de nitrógeno en la alimentación debido a la adición de un co-sustrato rico en proteínas (sangre). La presencia de metano también ha sido observada por Zhu et al. (2009) en el estudio de un proceso de fermentación oscura utilizando estiércol de cerdo suplementado con glucosa como sustrato. Los autores observaron una producción máxima de hidrógeno utilizando un TRH de 16 horas y una concentración de sustrato de 10,5 g/L, pero también observaron la presencia

de metano en el gas bajo condiciones de pH inferiores a 6,0 unidades y con TRH inferiores a 24 horas.

La tabla 5.4 muestra los parámetros de rendimiento del sistema de producción de hidrógeno cuando operó sin adición de sobrenadante digerido (los valores fueron calculados utilizando los datos obtenidos desde el día 20 hasta el día 63).

**Tabla 5.4. Valores medios de los parámetros de rendimiento del sistema de producción de hidrógeno sin adición de sobrenadante digerido y con adición de sobrenadante digerido.**

<i>Parámetro</i>	<b>Sin sobrenadante digerido<sup>1</sup></b>	<b>Con sobrenadante digerido<sup>2</sup></b>
<b>Producción de gas (L/d)</b>	41,5±1,3	37,7±2,2
<b>% Hidrógeno en el gas</b>	22,8±0,9	21,7±1,4
<b>Producción H<sub>2</sub> (L H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>*d)</b>	0,39±0,03	0,36±0,03
<b>SH<sub>2</sub>P (L H<sub>2</sub>/kg SV<sub>alimentado</sub>)</b>	45,5±3,5	41,7±3,9
<b>Rendimiento H<sub>2</sub> (L H<sub>2</sub>/kg SV<sub>eliminado</sub>)</b>	104±5	68±2
<b>Consumo de alcalinidad (mL/d)</b>	157±10	100±10
<b>ST (g/L)</b>	23,2±0,5	19,9±0,7
<b>SV (g/L)</b>	16,6±0,4	13,8±0,4
<b>% Destrucción SV</b>	26,9±1,3	47,1±2,2
<b>DQO<sub>s</sub> (g/L)</b>	17,5±2,2	20,5±0,4
<b>Amonio (mg/L)</b>	63,5±7,1	133±14

±: desviación durante la fase estable o steady state.

<sup>1</sup>los valores fueron calculados utilizando los datos obtenidos desde el día 20 al día 63.

<sup>2</sup>los valores fueron calculados utilizando los datos obtenidos desde el día 73 al día 99.

Los valores medios de la producción de gas y la producción específica de hidrógeno ( $\text{SH}_2\text{P}$ ) fueron  $41,5 \pm 1,3$  L/d y  $45,5 \pm 3,5$  L  $\text{H}_2/\text{kg SV}_{\text{alimentado}}$ , respectivamente. El valor máximo de producción específica de hidrógeno fue 60 L  $\text{H}_2/\text{kg SV}_{\text{alimentado}}$  y fue observado el día 37. Estos resultados concuerdan con los publicados por varios autores (Liu et al. 2006; Wang y Zhao, 2009).

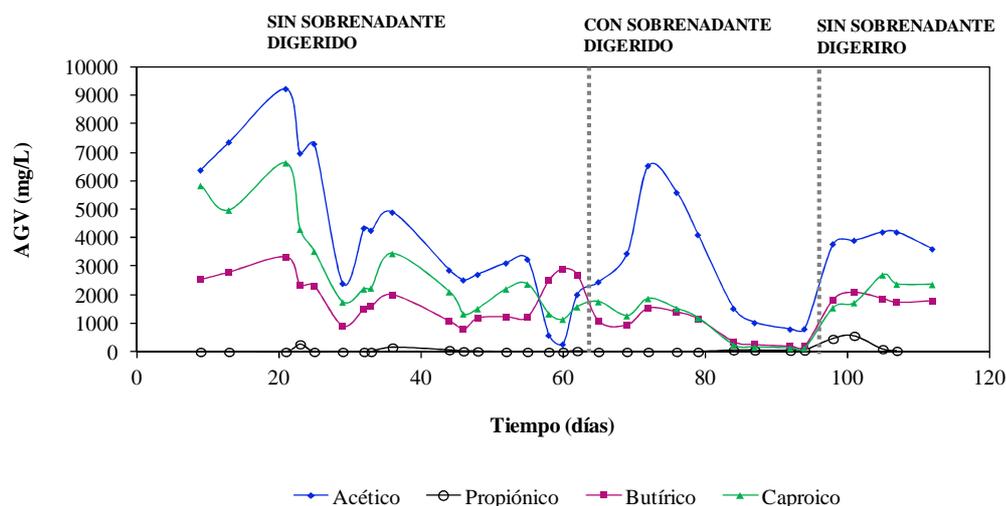
La producción media de hidrógeno por litro de alimentación fue 1,2 L  $\text{H}_2/\text{L}_{\text{alimentación}}$  ( $45,45$  mL  $\text{H}_2/\text{gSV}_{\text{alimentado}}$ ). En base a ello y dado que 1 mol de hidrógeno (22,4 L) equivale a 16 gramos de DQO, la producción de hidrógeno correspondió a 857 mg DQO (en base a los cálculos propuestos por Han and Shin, 2004), lo cual representa aproximadamente un 3% de la DQO contenida en la alimentación. Estos valores de eficiencia en la producción de hidrógeno son similares a los obtenidos por otros autores (Han y Shin, 2004; Zhu et al., 2008).

Respecto al contenido de sólidos, el efluente obtenido del sistema de producción de hidrógeno presentó un contenido medio de ST de  $23,2 \pm 0,5$  g/L con un contenido medio de SV de  $16,6 \pm 0,4$  g/L, representando una destrucción de SV de  $26,9 \pm 1,3\%$ . El valor medio de DQO soluble del efluente fue de  $17,5 \pm 2,2$  g/L, registrando una disminución con respecto a la DQO soluble de la alimentación (18,8 g/L) que representa un grado de eliminación de  $6,9 \pm 0,7\%$ .

La concentración de amonio está correlacionada con la degradación de proteínas cuando son utilizadas como sustrato por bacterias fermentativas tales como especies de *Clostridium* (Lay et al., 2003). La concentración media de amonio durante la fermentación fue de  $63,5 \pm 7,1$  mg/L, registrando un aumento con respecto a la concentración de amonio en la alimentación (12,1 mg/L) indicando que una cierta degradación de las proteínas tuvo lugar. De tal modo, el contenido proteico en el residuo de comida pudo proporcionar capacidad amortiguadora para neutralizar los AGV generados y también pudo mejorar la producción de hidrógeno al proporcionar nitrógeno orgánico fácilmente disponible (tal como proteínas solubles y aminoácidos) para los microorganismos (Ding et al. 2008).

La figura 5.6 muestra la evolución de la concentración de los AGV durante el proceso de fermentación. Durante los primeros 20 días de operación fueron

registrados altos valores de concentración de AGV, asociados a bajos rendimientos de hidrógeno. A su vez, la reducción de la concentración de estos AGV estuvo asociada al aumento del rendimiento de hidrógeno experimentado tras los primeros 20 días de operación.



**Figura 5.6. Evolución de la concentración de AGV en el reactor de producción de hidrógeno.**

Durante la fase de arranque del sistema de fermentación pudo haber ocurrido un efecto inhibitorio en la producción de hidrógeno relacionado con las altas concentraciones de AGV observadas. La concentración de los ácidos acético, butírico y caproico fueron  $7436 \pm 374$  mg/L,  $2653 \pm 165$  mg/L y  $5042 \pm 287$  mg/L, respectivamente (valores medios correspondientes a los primeros 25 días). Wang et al. (2008) demostraron que la adición de cantidades cada vez mayores de etanol y de ácidos acético, propiónico y butírico inhibió la capacidad de cultivos mixtos para producir hidrógeno. A su vez, altos niveles de AGV han sido responsables de la inhibición de la producción de hidrógeno en un estudio publicado por Wang et al. (2009). Los autores observaron un descenso en la producción de hidrógeno cuando la concentración de AGV alcanzó valores superiores a 10,0 g/L, acompañado de un incremento en el contenido de ácido propiónico. Kim et al. (2008) evaluaron la producción de hidrógeno de *Clostridium beijerinckii* KCTC

1785 a partir de residuos de comida, observando una inhibición con valores de concentración de ácido acético inferiores a 5 g/L y de concentración de ácido butírico inferiores a 3 g/L. Del mismo modo, en el presente estudio la baja producción de hidrógeno observada durante la fase de arranque puede ser explicada por una degradación de la materia orgánica que originó altos niveles de concentración de AGV, aunque en esta ocasión no ocurrió una desviación de la ruta de fermentación hacia la fermentación tipo ácido propiónico. Así, la concentración de ácido propiónico fue baja durante todo el periodo de operación presentando un valor medio de  $32\pm 9$  mg/L.

Sin embargo, tras este periodo inicial (después de los primeros 25 días de operación) tuvo lugar un cambio en las rutas metabólicas y una concentración estable más baja de ácidos acético, butírico y caproico fue medida ( $2544\pm 235$  mg/L,  $1597\pm 127$  mg/L y  $1900\pm 179$  mg/L, respectivamente), coincidiendo con el aumento de la producción diaria de biogás y del contenido de hidrógeno en el biogás generado (figura 5.5). Al final de este periodo de evaluación (en torno al día 58) fue observado otro cambio en la distribución de AGV en el efluente del reactor de hidrógeno. La concentración de ácido acético experimentó un descenso acusado pasando a ser el AGV mayoritario el ácido butírico. El descenso en la concentración de ácido acético y el aumento en la concentración de ácido butírico llevó asociado una mayor producción de hidrógeno que posteriormente disminuyó a medida que la concentración de ácido acético aumentó y la de ácido butírico disminuyó (según indican las figuras 5.5 y 5.6, el día 60 fue observado un mínimo en la concentración de ácido acético y un máximo en la producción de hidrógeno y en la concentración de ácido butírico). Por lo tanto, a medida que el ratio ácido butírico/ácido acético (B/A) en base molar aumentó la producción de hidrógeno también aumentó sugiriendo que la formación de ácido butírico favoreció la producción de hidrógeno. Resultados similares fueron observados por otros autores (Chen et al., 2001; Kim et al. 2006; Lin et al., 2006).

Por otro lado, en este trabajo fue detectado durante todo el tiempo de operación el ácido caproico en el efluente del reactor de hidrógeno (figura 5.6). La generación de este ácido en sistemas de fermentación oscura no ha sido traducida en altos rendimientos de hidrógeno sino que su formación ha sido asociada a

fermentaciones secundarias donde son producidos etanol y ácido acético o etanol y ácido butírico. Así, la formación de ácido caproico es un indicador de que una solventogénesis significativa ha ocurrido reduciendo el rendimiento de producción de hidrógeno (Ding et al., 2010).

#### **5.4.2.2. Producción de hidrógeno por fermentación oscura con adición de sobrenadante digerido.**

La adición de sobrenadante digerido fue evaluada durante la segunda fase experimental (a partir del día 64 de operación), para ello el sobrenadante fue mezclado con el residuo de comida utilizado como sustrato de forma que el contenido en ST y SV de la mezcla alimentada al reactor de hidrógeno fue 28,8 g/L y 26,2 g/L, respectivamente. La DQO soluble de la alimentación fue 21,7 g/L.

La figura 5.5 muestra la evolución de la producción diaria de gas y del contenido de hidrógeno en el gas generado durante la evaluación del efecto de la adición de sobrenadante digerido al reactor de hidrógeno. La producción diaria de gas experimentó una reducción gradual y alcanzó un valor medio durante este periodo de  $37,7 \pm 2,2$  L/d. Sin embargo, no fue observado un efecto apreciable sobre la concentración de hidrógeno en el gas cuyo valor medio fue  $21,7 \pm 1,4\%$ . La concentración media de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) en el biogás fue  $18 \pm 3$  ppm. De este modo, el rendimiento medio de hidrógeno (recogido en la tabla 5.4) expresado en términos de volumen diario de hidrógeno gas producido por volumen de reactor fue  $0,36 \pm 0,03$  L  $H_2$ / L<sub>reactor</sub>\*d y fue un 7,7% inferior al observado cuando el reactor operó sin adición de sobrenadante digerido ( $0,39 \pm 0,03$  L  $H_2$ / L<sub>reactor</sub>\*d). Respecto, a la producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ) su valor medio fue  $41,7 \pm 3,9$  L  $H_2$ /kg  $SV_{alimentado}$  (un 8,3% más baja respecto a la producción específica de hidrógeno observada cuando el reactor operó sin adición de sobrenadante digerido). El valor máximo de producción específica de hidrógeno alcanzado durante este periodo fue 62 L  $H_2$ /kg  $SV_{alimentado}$  y fue observado el día 88. A su vez, no fue detectado metano en el biogás indicando que las condiciones de operación evaluadas fueron adecuadas para reducir la actividad de los microorganismos metanogénicos viables presentes en el

sobrenadante digerido. Por lo tanto, aunque la adición de sobrenadante digerido disminuyó levemente el rendimiento de hidrógeno, ésta puede ser considerada una alternativa viable para reducir el consumo de agua del proceso a la hora de preparar las alimentaciones del reactor. La leve disminución de los rendimientos puede ser asumida como un coste de operación. Sin embargo, el proceso no fue estable durante esta etapa (desde el día 64 al día 99 de operación), y el ligero deterioro observado en la producción de hidrógeno puede ser asociado a la adición de sobrenadante digerido ya que el cambio de las condiciones experimentales a las establecidas en la fase inicial (impuesto el día 100) originó un nuevo aumento en la producción de biogás (figura 5.5). Durante este último periodo de operación la producción media de gas fue  $39,7 \pm 1,5$  L/d y el porcentaje medio de hidrógeno en el gas producido fue  $20,5 \pm 0,8\%$  (estos valores medios fueron calculados con los datos observados desde el día 103 al día 110).

Respecto al consumo de solución alcalina, requerido para regular el pH del reactor de hidrógeno en el rango 5,5-6,0, fue observada una reducción del 36% cuando fue adicionado sobrenadante digerido con un valor medio de alcalinidad de 2 g/L (determinada como carbonato de calcio,  $\text{CaCO}_3$ ). Posteriormente, en el último periodo de experimentación en el cual no fue utilizado sobrenadante digerido para preparar la alimentación, el consumo de alcalinidad aumentó hasta los valores observados en la primera fase experimental ( $145 \pm 7$  mL/d fue el valor medio observado desde el día 103 al día 110).

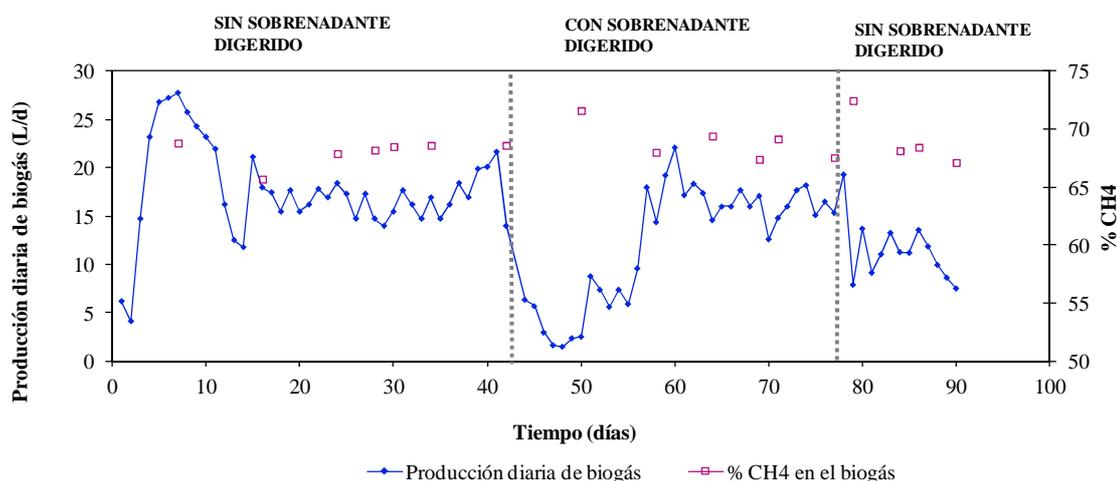
Los cambios observados en la producción de gas estuvieron acompañados de variaciones en la concentración de AGV (figura 5.6). Así, cuando el sobrenadante digerido fue adicionado al reactor de hidrógeno fue observado un incremento inicial en la concentración de ácido acético que alcanzó una concentración máxima de  $6521 \pm 323$  mg/L. Posteriormente fue observado un descenso en la concentración de los ácidos acético, butírico y caproico, probablemente indicando que las condiciones experimentales no fueron favorables para la microflora productora de hidrógeno, así la restauración de las condiciones iniciales (sin adición de sobrenadante digerido) llevó asociado un incremento inmediato en la concentración de estos ácidos y de la producción de hidrógeno.

Hay que tener en cuenta que la producción de hidrógeno puede ser suprimida por altas concentraciones de amonio en la alimentación (Salerno et al., 2006). Así, el deterioro observado en la producción de hidrógeno cuando el sobrenadante digerido fue adicionado a la mezcla de alimentación pudo estar asociado al incremento en la concentración de amonio en el reactor. En el presente estudio la adición de sobrenadante digerido en la mezcla de alimentación elevó un 52% el contenido de amonio en el efluente del reactor de hidrógeno desde una concentración de  $63,5 \pm 7,1$  mg  $\text{NH}_4^+$ /L (operando sin adición de sobrenadante digerido) hasta  $133 \pm 14$  mg  $\text{NH}_4^+$ /L (operando con adición de sobrenadante digerido con una concentración de amonio de 650 mg/L). Salerno et al. (2006) publicaron el efecto inhibitorio de la concentración de amonio sobre la microflora productora de hidrógeno cuando cantidades de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) cada vez mayores fueron añadidas a reactores de fermentación operando en modo discontinuo y en modo continuo, en condiciones mesofílicas. Una inhibición total de la producción de hidrógeno, asociada a una microflora no aclimatada, fue observada durante la operación en continuo con una concentración de 0,8 g  $\text{NH}_4^+$ /L. Sin embargo, Chu et al. (2008) obtuvieron resultados satisfactorios cuando estudiaron un proceso de fermentación en dos fases con recirculación de lodo digerido con una concentración de amonio de 599 mg  $\text{NH}_4^+$ /L.

El efluente obtenido del sistema de producción de hidrógeno durante este periodo presentó un contenido medio de ST de  $19,9 \pm 0,7$  g/L con un contenido medio de SV de  $13,8 \pm 0,4$  g/L, representando una destrucción de SV de  $47,1 \pm 2,2\%$ . Estos valores de ST y SV son inferiores a los obtenidos durante la operación sin adición de sobrenadante digerido indicando que operando bajo adición de sobrenadante la hidrólisis y solubilización del material contenido en la alimentación fue más alta. Sin embargo, la disminución en la producción de hidrógeno y en la concentración de AGV observada durante este periodo, indica que las condiciones no fueron favorables para la metabolización del sustrato soluble por la microflora productora de hidrógeno. Respecto, al valor medio de DQO soluble del efluente ( $20,5 \pm 0,4$  g/L) fue superior al observado cuando el reactor operó sin adición de sobrenadante digerido, debido a la mayor DQO soluble de la alimentación cuando ésta fue preparada con sobrenadante digerido.

### 5.4.2.3. Estudio de la metanización del efluente del reactor de producción de hidrógeno.

El efluente generado en el proceso de fermentación oscura fue digerido en una segunda fase para la producción de metano y la estabilización final del efluente. El reactor de metano comenzó a operar el día 21 de funcionamiento del reactor de hidrógeno de modo que el efluente descargado de dicho reactor fue simultáneamente alimentado al reactor de metano una vez comenzó a operar. La figura 5.7 muestra la producción diaria de biogás en el reactor de metano, así como el contenido en metano del gas generado.



**Figura 5.7. Evolución de la producción diaria de biogás y del contenido de metano en el gas producido durante la etapa metanogénica.**

La producción de biogás comenzó de forma inmediata tras alimentar el reactor, observando una elevada producción diaria de biogás en la fase de arranque y un posterior descenso en los días siguientes, consiguiendo una producción estable de gas durante el posterior tiempo de operación. Esta producción inmediata de metano indica que el efluente del reactor de hidrógeno fue rápidamente utilizado para la metanogénesis.

La adición de sobrenadante digerido a la alimentación del reactor de hidrógeno originó una distorsión en la producción diaria de biogás en el reactor de metano que fue superada tras unos días de operación. Sin embargo, no fue observado un efecto significativo en el contenido de metano en el biogás (tabla 5.5). Este mismo comportamiento fue observado cuando fueron restablecidas las condiciones de experimentación iniciales (operación sin adición de sobrenadante en el reactor de hidrógeno). Por lo tanto, los cambios impuestos en la alimentación del reactor de hidrógeno al adicionar sobrenadante digerido fueron responsables de los cambios observados en la producción de biogás en el reactor de metano. La tabla 5.5 recoge los valores medios de los parámetros de rendimiento del reactor de metano en las dos fases experimentales evaluadas (con y sin adición de sobrenadante en la alimentación del reactor de hidrógeno).

**Tabla 5.5. Valores medios de los parámetros de rendimiento del sistema de producción de metano.**

<i>Parámetro</i>	<b>Sin sobrenadante digerido<sup>1</sup></b>	<b>Con sobrenadante digerido<sup>2</sup></b>
<b>Producción de biogás (L/d)</b>	17,6±1,4	12,5±1,2
<b>% CH<sub>4</sub> en el biogás</b>	68,0±1,0	68,9±1,0
<b>SH<sub>2</sub> (ppm)</b>	20±1	16±1
<b>Producción de metano (L CH<sub>4</sub>/L<sub>reactor</sub>*d)</b>	0,61±0,13	0,58±0,10
<b>SMP (L CH<sub>4</sub>/kg SV<sub>alimentado</sub>)</b>	590±54	550±48
<b>ST (g/L)</b>	16,4±0,6	12,0±0,3
<b>SV (g/L)</b>	8,6±0,4	6,4±0,2
<b>% Destrucción SV en la etapa metanogénica</b>	48,2±1,1	53,6 ±1,7
<b>% Destrucción Global SV</b>	62,1±1,2	75,5±1,8
<b>DQO<sub>s</sub> (g/L)</b>	9,9±1,7	11,7±1,7
<b>Amonio (mg/L)</b>	597±21	511±24
<b>Alcalinidad (mg CaCO<sub>3</sub>/L)</b>	6425±88	5433±83
<b>Ácido acético (mg/L)</b>	100±24	197±30

±: desviación durante la fase estable o steady state.

<sup>1</sup>los valores fueron calculados utilizando los datos obtenidos desde el día 11 al día 42.

<sup>2</sup>los valores fueron calculados utilizando los datos obtenidos desde el día 54 al día 78.

La producción específica media de metano (SMP) para el proceso global durante la primera fase experimental, en la cual el reactor de hidrógeno operó sin adición de sobrenadante digerido, fue de  $590 \pm 54$  L CH<sub>4</sub>/kg SV<sub>alimentado</sub>. Un ligero descenso fue observado en este parámetro cuando el sobrenadante digerido fue adicionado en la alimentación del reactor de hidrógeno, durante esta segunda fase experimental la producción específica media de metano (SMP) para el proceso global fue de  $550 \pm 38$  L CH<sub>4</sub>/kg SV<sub>alimentado</sub>.

Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores. Liu et al. (2006) obtuvieron una producción específica de metano de 500 L CH<sub>4</sub>/kg SV<sub>alimentado</sub> durante un proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas a partir de residuos sólidos generados en los hogares. A su vez, los autores observaron que la producción específica de metano obtenida en este proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas fue mayor que la obtenida durante la digestión en una fase evaluada en este estudio. Bajo una configuración similar, Chu et al. (2008) observaron una producción de metano de 464 L CH<sub>4</sub>/kg SV<sub>alimentado</sub> durante la segunda fase con una etapa de producción de hidrógeno evaluada en condiciones termofílicas. Wang y Zhao (2009) publicaron una producción específica de metano de 546 L CH<sub>4</sub>/kg SV<sub>alimentado</sub> bajo condiciones de fermentación similares a las utilizadas en el presente estudio.

La concentración media de amonio en el reactor de metano fue superior a la observada en el reactor de hidrógeno indicando que la degradación de proteínas fue alcanzada en la fase de digestión. Este resultado corrobora la hipótesis de una preferencial degradación de los carbohidratos contenidos en la alimentación durante su corta permanencia en el primer reactor (el cual operó con un TRH de 3 días), siendo el material más complejo degradado en la posterior etapa (donde fue fijado un TRH de 25 días).

La alcalinidad medida en el reactor metanogénico fue particularmente alta durante todo el tiempo de operación debido a que la adición de solución alcalina en el reactor de hidrógeno, para la regulación del pH, fue mantenida durante toda la experimentación, incluso cuando el sobrenadante digerido fue adicionado en la alimentación del sistema de fermentación oscura. Sin embargo, cuando el

sobrenadante digerido fue adicionado al reactor de hidrógeno la alcalinidad del reactor de metano disminuyó ligeramente. Esto fue debido a que el consumo de solución alcalina fue menor puesto que el sobrenadante digerido proporcionó alcalinidad y contribuyó a mantener el pH del reactor de hidrógeno en el rango deseado. Bouallagui et al. (2009) publicaron valores de alcalinidad de  $1300\pm 50$  mg/L para la digestión de residuos de comida bajo condiciones mesofílicas, el cual fue un valor claramente inferior al observado en el presente estudio.

El menor consumo de solución alcalina en la etapa de producción de hidrógeno no llevó asociado un descenso significativo en el pH del reactor de metano. Durante la primera fase experimental (sin adición de sobrenadante digerido) el pH del reactor de metano estuvo en el rango 7,4-7,7, y durante la segunda fase experimental (con adición de sobrenadante) estuvo en el rango 7,1-7,5.

El contenido medio de SV del reactor metanogénico fue  $8,6\pm 0,4$  cuando no fue adicionado sobrenadante digerido al reactor de hidrógeno, y  $6,4\pm 0,2$  g/L cuando el sobrenadante digerido fue utilizado. De este modo, la reducción de SV obtenida en la etapa de producción de metano fue  $48,2\pm 1,1\%$  y  $53,6\pm 1,7\%$ , respectivamente; y para el sistema global fue  $62,1\pm 1,2\%$  y  $75,5\pm 1,8\%$  respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gomez et al., (2006) durante el estudio de un proceso de producción de hidrógeno y metano en dos fases a partir de una mezcla de residuos de comida y de matadero utilizando un inóculo mixto sin pre-tratar. En este caso los autores observaron reducciones globales de SV en torno al 70%.

Respecto al porcentaje de eliminación de DQO soluble en el reactor de metano fue del 49% cuando fue utilizado sobrenadante digerido y del 43% cuando no fue utilizado, indicando que los productos de hidrólisis formados en el reactor de hidrógeno fueron ampliamente consumidos en el reactor de metano.

La elevada concentración de AGV presentes en el efluente del reactor de hidrógeno fue significativamente reducida en la etapa metanogénica. El ácido caproico y el ácido butírico no fueron detectados en el efluente del reactor de metano. El único ácido detectado en el sobrenadante del efluente metanogénico

fue el ácido acético con una concentración media de  $100\pm 24$  mg/L cuando fue adicionado sobrenadante digerido en la etapa de producción de hidrógeno, y  $197\pm 30$  mg/L cuando no fue adicionado sobrenadante digerido.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el proceso de producción de hidrógeno y metano a partir de residuos de comida fue eficiente y estable para la producción de energía. En base a los rendimientos de hidrógeno y metano obtenidos en este estudio (sin adición de sobrenadante digerido), la cantidad de energía obtenida por gramo seco de residuos fue 19861 kJ/kg  $SV_{\text{alimentado}}$ , de la cual el hidrógeno aportó el 2,3%.

## 5.5. CONCLUSIONES.

### ***5.5.1. Respecto al efecto de la adición de sobrenadante digerido (con y sin pre-tratamiento de filtración) en un sistema de fermentación oscura a escala de laboratorio.***

- El sistema MR que operó con adición de sobrenadante digerido sin pre-tratar alcanzó una producción de hidrógeno estable antes que el resto de sistemas lo que sugiere que el sobrenadante digerido pudo contener una variedad de bacterias productoras de hidrógeno que permitieron reducir la fase lag de 20 a 13 días.
- El sobrenadante digerido sin pre-tratar y los permeados de ultrafiltración aplicados a los sistemas MR, MR-1 y MR-2, respectivamente disminuyeron significativamente el consumo diario de solución alcalina. Sin embargo, esto no ocurrió cuando fue utilizado el permeado de nanofiltración. La reducción media en el consumo diario de solución alcalina fue del 52% para el sistema MR-2 (con adición de permeado de ultrafiltración) cuando fue comparado con los requerimientos de alcalinidad del sistema WR (sin adición de sobrenadante digerido). Sin

embargo, la adición del sobrenadante digerido sin pre-tratar y de los diferentes permeados no produjo diferencias significativas en la producción de hidrógeno.

- La adición del sobrenadante digerido sin pre-tratar y de los diferentes permeados no aumentó el contenido de metano en el biogás bajo las condiciones de operación evaluadas. Cuando el tratamiento de filtración no fue utilizado para acondicionar el sobrenadante digerido, la actividad de los microorganismos metanogénicos viables en suspensión fue baja, lo que indicó que el tratamiento mediante filtración con membrana para evitar su retorno al reactor no fue necesario para lograr una producción estable de hidrógeno.

#### ***5.5.2. Respecto a la producción de hidrógeno y metano en dos etapas a escala piloto con y sin adición de sobrenadante digerido.***

- La producción continua de hidrógeno a partir de una mezcla de alimentos frescos elaborada con frutas, verduras, pan, carne y pescado, fue llevada a cabo satisfactoriamente en un reactor de mezcla completa (CSTR) de 25 L operando con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 3 días. La producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ) fue de  $45,5 \text{ H}_2/\text{kg SV}_{\text{alimentado}}$ .
- El aumento de la concentración media de amonio en el reactor respecto a la concentración en la alimentación sugiere que una cierta degradación de las proteínas tuvo lugar bajo las condiciones de operación.
- La adición de sobrenadante digerido a la alimentación del reactor de hidrógeno originó una reducción gradual, durante todo el periodo de operación, de la producción diaria de gas pero no del contenido de hidrógeno en el gas. Así, la producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ) fue un 8,3% más baja respecto a la producción específica de hidrógeno observada cuando el reactor operó sin adición de sobrenadante digerido. Este ligero deterioro observado en la producción de hidrógeno pudo ser asociado a la adición del sobrenadante ya que su eliminación de la

alimentación del reactor originó un nuevo aumento en la producción de biogás.

- Las condiciones de operación evaluadas en el reactor de hidrógeno fueron adecuadas para reducir la actividad de los microorganismos metanogénicos viables presentes en el sobrenadante digerido alimentado, así no fue detectado metano en el biogás durante el tiempo de operación.
- Respecto al consumo de solución alcalina, requerido para regular el pH del reactor de hidrógeno en el rango 5,5-6,0, fue observada una reducción del 36,6% cuando fue adicionado sobrenadante digerido con un valor medio de alcalinidad de 2 g/L (determinada como carbonato de calcio,  $\text{CaCO}_3$ ).
- La adición de sobrenadante digerido en la mezcla de alimentación elevó un 52% el contenido de amonio en el efluente del reactor de hidrógeno. De este modo, el deterioro observado en la producción de hidrógeno cuando el sobrenadante digerido fue adicionado a la mezcla de alimentación pudo estar asociado al incremento en la concentración de amonio en el reactor.
- La producción específica media de metano (SMP) para el proceso global, experimentó un ligero descenso cuando el sobrenadante digerido fue adicionado en la alimentación del reactor de hidrógeno pasando de 590 a 550 L  $\text{CH}_4/\text{kg SV}_{\text{alimentado}}$ .
- La concentración media de amonio en el reactor de metano fue superior a la observada en el reactor de hidrógeno indicando que la degradación de proteínas fue alcanzada en la fase de digestión. La adición de solución alcalina en el reactor de hidrógeno para la regulación del pH permitió mantener una alcalinidad en el reactor metanogénico particularmente alta durante todo el tiempo de operación y los AGV presentes en el efluente del reactor de hidrógeno fueron efectivamente eliminados durante la etapa metanogénica.

## 5.6. BIBLIOGRAFÍA.

- Antonopoulou G., Stamatelatou K., Venetsaneas N., Kornaros M. and Lyberatos G. (2008). Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. Vol. 47, pp. 5227-5233.
- Bartacek J., Zabranska J. and Lens P.N.L. (2007). Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. Vol. 1, pp. 201-214.
- Bouallagui H., Lahdheb H., Ben Romdan E., Rachdi B. and Hamdi M.(2009). Improvement of fruit and vegetable waste anaerobic digestion performance and stability with co-substrates addition. *Journal of Environmental Management*. Vol. 90, pp. 1844-1849.
- Cuetos M.J., Gómez X., Escapa A. and Morán A. (2007). Evaluation and simultaneous optimization of bio-hydrogen production using 32 factorial design and the desirability function. *Journal of Power Sources*. Vol. 169, pp. 131-139.
- Chen C.C., Lin C.Y. and Chang J.S. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 57, pp. 56-64.
- Chen W.-H., Sung S. and Chen S.-Y. (2009). Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 227-234.
- Chu C.-F., Li Y.-Y., Xu K.-Q., Ebie Y., Inamori Y. and Kong H.-N. (2008). A pH-and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 4739-4746.
- Demirel B. and Yenigün O. (2002). Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 77, pp. 743-755.
- Ding H.B., Liu X.Y., Stabnikova O. and Wang J.Y. (2008). Effect of protein on biohydrogen production from starch of food waste. *Water Science and Technology*. Vol. 57, pp. 1031-1036.
- Ding H.-B., Tan G.-Y.A. and Wang J.-Y. (2010). Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*. Vol. 101, pp. 9550-9559.
- Dong-Hoom K., Sang-Hyoun K., In-Beom K., Chae-Young L. and Hang-Sik S. (2008). Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: Early switchover

- from batch to continuous operation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 1532-1541.
- Dong L., Zhenhong Y., Yongming S., Xiaoying K. And Yu Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 812-820.
- Gómez X., Morán A, Cuetos M.J. and Sánchez M.E. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: a two phase process. *Journal of Power Sources*. Vol. 157, pp. 727-732.
- Gómez X., Cuetos M.J., Prieto J.I. and Morán A. (2009). Bio-hydrogen production from waste fermentation: Mixing and static conditions. *Renewable Energy*. Vol. 34, pp. 970-975.
- Han S.-K. and Shin H.-S. (2004). Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 569-577.
- Hawkes F.R., Forsey H., Premier G.C., Dinsdale R.M., Hawkes D.L., Guwy A.J., Maddy J., Cherryman S., Shine J. and Auty D. (2008). Fermentative production of hydrogen from a wheat flour industry co-product. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 5020-5029.
- Hussy I., Hawkes F.R., Dinsdale R. and Hawkes D.L. (2005). Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 30, pp. 471-483.
- Kim S.-H., Han S.-K. and Shin H.-S. (2006). Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 199-207.
- Kim J. K., Nhat L., Chun Y.N. and Kim S.W. (2008). Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Vol. 13, pp. 499-504.
- Kraemer J.T. and Bagley D.M. (2005). Continuous fermentative hydrogen production using a two-phase reactor system with recycle. *Environmental Science & Technology*. Vol. 39, pp. 3819-3825.
- Kyazze G., Dinsdale R., Premier G.C., Hawkes F.R., Hawkes D.L. and Guwy A.J. (2007). Performance characteristics of a two stage process producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 97, pp. 759-770.
- Lay J.J., Fan K.S., Chang J.I. and Ku C.H. (2003). Influence of chemical nature of organic waster on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *International Journal Hydrogen Energy*. Vol. 28, pp. 1361-1367.

- Lee D.-Y., Ebie Y., Xu K.-Q., Li Y.-Y. and Inamori Y. (2010). Continuous H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. *Bioresource Technology*. Vol. 101, pp. S42-S47.
- Lee Y.-W. and Chung J. (2010). Bioproduction of hydrogen from food waste by pilot scale combined hydrogen/methane fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, pp. 11746-11755.
- Levin D., Pitt L. and Love M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 173-185.
- Li D., Yuan Z., Sun Z., Sun Y., Kong X. and Zhang Y. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 812-820.
- Lin C.-Y., Hung C.-H., Chen C.-H., Chung W.-T. and Cheng L.-H. (2006). Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 1383-1390.
- Liu D., Zeng R.J. and Angelikadi I. (2006). Hydrogen methane production from household solid waste in two-stage fermentation process. *Water Research*. Vol. 40, pp. 2230-2236.
- Massanet-Nicolau J., Dinsdale R. and Guwy A. (2008). Hydrogen production from sewage sludge using mixed microflora inoculum: Effect of pH and enzymatic pre-treatment. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp.6325-6331.
- Ren N.Q., Chua H., Chan S.Y., Tsang Y.F., Wang Y.J. and Sin N. (2007). Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Bioresource Technology*. Vol. 98, pp. 1774-1780.
- Romli M., Greenfield P.F. and Lee P.L. (1994). Effect of recycle on a two-phase high-rate anaerobic wastewater treatment system. *Water Research*. Vol. 28, pp. 475-482.
- Salerno M.B., Park W.S., Zuo Y. and Logan B.E. (2006). Inhibition of biohydrogen production by ammonia. *Water Research*. Vol. 40, pp. 1167-1172.
- Tanisho S. and Ishiwata Y. (1994). Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 19, pp. 807-812.
- Valdez-Vazquez I., Ríos-Leal E., Esparza-García F., Cecchi F. and Poggi-Varaldo H.M. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 30, pp. 1383-1391.

- Venetsaneas N., Antonopoulou G., Stamatelatu K., Kornaros M. and Lyberatos G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology*. Vol. 100, pp. 3713-3717.
- Wang C.C., Chang C.W., Chu C.P., Lee D.J. and Chang B.V. (2003). Sequential production of hydrogen and methane from wastewater sludge using anaerobic fermentation. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. Vol. 34, pp. 683-687.
- Wang X. and Zhao Y.-C. (2009). A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 245-254.
- Wang B., Wan W. and Wang J. (2008). Inhibitory effect of ethanol, acetic acid, propionic acid and butyric acid on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 7013-7019.
- Wang Y., Zhang Y., Meng L., Wang J. and Zhang W. (2009). Hydrogen–methane production from swine manure: Effect of pretreatment and VFAs accumulation on gas yield. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 33, pp. 1131-1138.
- Zhu J., Li Y., Wu X., Miller C., Chen P. and Ruan R. (2009). Swine manure fermentation for hydrogen production. *Bioresource Technology*. Vol. 100, pp. 5472-5477.
- Zhu H., Stadnyk A., Béland M. and Seto P. (2008). Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 5078-5084.

*6. EFECTO DEL TRH EN LA  
PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y EN  
LA COMUNIDAD MICROBIANA*

---



## **6.1. INTRODUCCIÓN.**

### ***6.1.1. Efecto del tiempo de retención hidráulico (TRH) en la producción de hidrógeno por fermentación oscura.***

Diferentes investigadores han centrado sus trabajos en el estudio de las condiciones de operación del proceso de fermentación oscura (Gómez et al., 2009; Turcot et al., 2008; Van Ginkel y Logan, 2005) debido a que los rendimientos de las poblaciones microbianas son altamente dependientes de las condiciones del proceso tales como el pH, el tiempo de retención hidráulico (TRH), la velocidad de carga orgánica (VCO) y la presión parcial del gas. Estos parámetros afectan al metabolismo microbiano y por lo tanto a los productos finales del proceso de fermentación (Antonopoulou et al., 2008).

El TRH determina las poblaciones microbianas presentes en el reactor, así como el uso eficiente del sustrato durante la producción de hidrógeno (Wang y Zhao, 2009). Varios autores han estudiado el efecto del TRH sobre el rendimiento de hidrógeno del proceso de fermentación oscura (Fan et al., 2006; Lin y Chang, 1999; Yu et al., 2003). Cuando los residuos de comida son utilizados como sustrato son necesarios amplios tiempos para la fase de hidrólisis (Shin y Youn, 2005). De este modo, TRH bajos pueden reducir el uso eficiente de sustrato por las bacterias y la retención de la biomasa activa, y por tanto, la eficiencia global del proceso (Chen et al., 2009; Kim et al., 2008a). Sin embargo, TRH altos (del orden de días) pueden originar un aumento en los microorganismos consumidores de hidrógeno, tales como microorganismos metanogénicos, y otros competidores por el sustrato, como son los microorganismos acidogénicos no productores de hidrógeno (Hawkes et al., 2002). Por lo tanto, el estudio del TRH es una tarea necesaria para lograr rendimientos óptimos en la producción de hidrógeno por fermentación oscura a partir de residuos.

Lee y Chung (2010) estudiaron el proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas a escala planta piloto utilizando residuos de comida como sustrato. El reactor utilizado para la producción de hidrógeno fue un reactor de mezcla completa (CSTR) con un volumen de 500 L. En su estudio fueron evaluados diferentes TRH dentro del rango de 66 h a 21 h. Los autores observaron rendimientos de hidrógeno variando entre  $0,62 \text{ L H}_2/ \text{m}^3 \cdot \text{d}$  y  $3,88 \text{ L H}_2/ \text{m}^3 \cdot \text{d}$  al disminuir el TRH. Gómez et al. (2006) estudiaron el proceso de fermentación oscura a partir de residuos de comida utilizando un CSTR operando con un TRH de 3 d y 5d. Los resultados indicaron un aumento de la producción volumétrica de hidrógeno con la disminución del TRH y no fue observado un deterioro en la producción específica de hidrógeno. Sin embargo, en otro estudio posterior (Cuetos et al., 2007) donde el objetivo fue evaluar la solubilidad del material particulado, observaron que TRH altos fueron necesarios para maximizar la producción de metabolitos solubles para su conversión en una segunda fase metanogénica.

## 6.2. OBJETIVOS.

El objetivo general de este capítulo es la evaluación del efecto del TRH en el proceso de producción de hidrógeno a partir de residuos de comida utilizando reactores de mezcla completa (CSTR) y manteniendo constante la concentración total de sólidos en la alimentación.

Entre los objetivos específicos están los siguientes:

- ❖ Evaluación del efecto de la sucesiva disminución del TRH (en el rango 2-0,5 días) en el rendimiento de producción de hidrógeno y en la distribución de los ácidos grasos volátiles (AGV) en un reactor de mezcla completa operando en régimen mesofílico y utilizando como sustrato residuos de comida con un contenido en sólidos totales constante.
- ❖ Estudio mediante la técnica PCR-DGGE de la población microbiana presente en el reactor de hidrógeno cuando este opera a distintos TRH (en el rango 2-0,5 días).

## 6.3. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 6.3.1. Metodología experimental.

En este trabajo fue evaluado un proceso de producción de hidrógeno bajo condiciones mesofílicas, utilizando como sustrato un residuo de comida con fracción proteica. Durante la operación fueron evaluados diferentes TRH manteniendo constante la concentración de sólidos totales (ST) de la alimentación lo que supuso la variación de la velocidad de carga orgánica (VCO) al modificar el TRH (cuanto menor fue el TRH mayor fue la VCO aplicada). A su vez, el trabajo fue completado con un análisis microbiológico, mediante la técnica PCR-DGGE, de la comunidad bacteriana presente en el reactor de hidrógeno cuando operó bajo diferentes TRH.

El sustrato utilizado consistió en un residuo de comida elaborado a partir de alimentos frescos (A2) basados en frutas, verduras, pan, carne y pescado, de forma que cada componente presentó una contribución fija en el contenido en ST de la mezcla, la cual fue descrita en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. La mezcla así preparada fue diluida con agua desionizada hasta un contenido de ST del 3%. Dicho contenido en ST fue fijado para incrementar la estabilidad del proceso de fermentación tal y como indican los resultados obtenidos por Gómez et al. (2009).

El inóculo utilizado para arrancar el reactor de hidrógeno fue el lodo digerido procedente del reactor CSTR de 25 L utilizado en los ensayos del Capítulo 5 para producir hidrógeno a partir de una alimentación con la misma composición que la utilizada en el presente estudio. Dicho reactor operó con un TRH de 3 días en régimen mesofílico ( $34\pm 2$  °C) durante 110 días. Por lo tanto, el inóculo utilizado presentó inicialmente una adaptación al tipo de residuo y las condiciones de operación. La concentración de ST y de SV del lodo digerido fueron 22,0 g/L y 13,8 g/L, respectivamente, y no fue aplicado ningún pre-tratamiento.

El proceso fue evaluado en la planta piloto descrita en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos operando de forma automática. El reactor de hidrógeno (Reactor 2 de la planta piloto) operó con un volumen de trabajo de 3L y fue termostatizado a  $34\pm 2$  °C. El residuo fue almacenado en el tanque de alimentación (Reactor 1 de la planta piloto) a 4 °C y desde ahí fue alimentado al reactor de hidrógeno. Antes de que el material fresco fuese alimentado el mismo volumen de líquido fue retirado del reactor.

El reactor operó en semi-continuo durante 55 días a distintos TRH manteniendo constante la concentración de ST de la alimentación. Cada TRH fue evaluado durante un periodo equivalente, como mínimo, a 10 veces el TRH fijado. El reactor operó con 4 ciclos de alimentación cuando fueron evaluados los TRH de 2 d y 1 d, con 5 ciclos de alimentación cuando fue evaluado el TRH de 0,75 d y con 6 ciclos de alimentación para el TRH de 0,5 d.

El pH del reactor fue controlado de forma automática mediante la adición de solución alcalina la cual permitió ajustar el pH a 5,5 unidades (siendo el pH de la alimentación inferior 5,0 unidades). La solución alcalina consistió en una mezcla de NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y KOH en concentraciones 120 g/l, 120 g/L y 180 g/L, respectivamente.

### **6.3.2. Metodología analítica.**

Los análisis rutinarios para el control del proceso fueron: pH, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), demanda química de oxígeno soluble (DQO<sub>s</sub>), amonio, concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y volumen y composición de biogás producido, conforme a los procedimientos descritos en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. Todos ellos fueron medidos tres veces por semana cuando el reactor de hidrógeno operó con un TRH de 2 y 1 días y fueron medidos a diario cuando dicho reactor operó con un TRH de 0,75 y 0,5 días. El volumen de gas producido fue medido a diario durante todo el tiempo de operación. Todos los datos de producción de gas fueron normalizados a temperatura y presión estándar (0 °C y 760 mm Hg).

La comunidad microbiana presente en el reactor fue analizada mediante la técnica PCR-DGGE según el procedimiento descrito en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. Para ello fueron tomadas dos muestras durante la evaluación de los TRH de 2 y 0,75 días.

### **6.3.3. Tratamiento estadístico de los datos.**

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Origin 6.1, llevando a cabo un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) que permitió determinar si el efecto que tiene el TRH sobre el rendimiento de hidrógeno es significativo a un nivel de significación del 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Además, fue aplicado el test de separación de medias de Tukey para comparar entre que TRH existen

diferencias significativas respecto al rendimiento de hidrógeno a un nivel de significación del 95%.

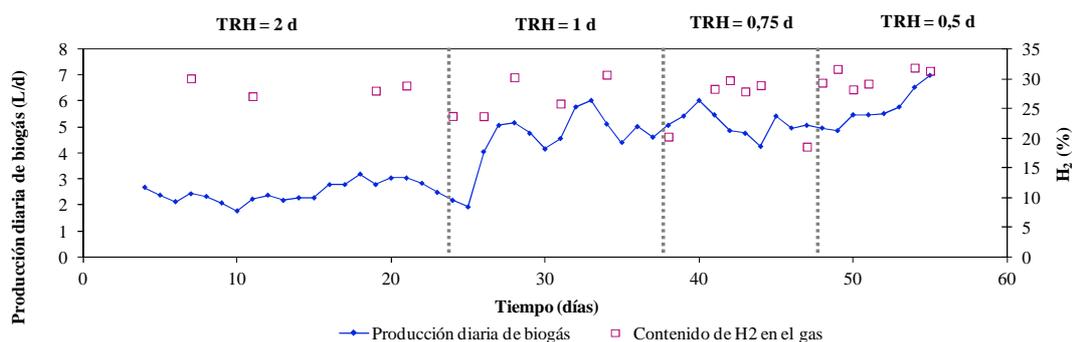
## 6.4. RESULTADOS.

### 6.4.1. Efecto del TRH en el proceso de producción de hidrógeno.

La adición de solución alcalina fue necesaria para mantener el pH del reactor de hidrógeno dentro del rango 5,0-6,0 unidades. La acidificación del reactor fue debida a la conversión de materia orgánica en AGV, y al reemplazamiento del contenido del reactor por la mezcla de alimentación, la cual presentó un valor bajo de pH (5,0 unidades). Un consumo diario medio de 22±6 ml de solución alcalina fue necesario para mantener el pH del reactor en el rango deseado. Esto provocó una concentración media de ión sodio (Na<sup>+</sup>) de 235±64 mg/L dentro del reactor de hidrógeno. Aunque este valor puede parecer alto, hay estudios que indican que la microflora productora de hidrógeno opera con valores de 1000-2000 mg/L de ion sodio sin evidenciar problemas de inhibición (Hao et al., 2006).

La figura 6.1 muestra la producción diaria de biogás y el contenido de hidrógeno en el biogás para los diferentes TRH evaluados. La reducción del TRH de 2 a 1 día implicó un aumento significativo de la producción diaria de biogás asociado a un ligero deterioro en el contenido de hidrógeno en el biogás. La modificación del TRH de 1 a 0,75 días implicó un ligero aumento en la producción diaria de biogás y en el contenido de hidrógeno en el gas generado. Sin embargo, los datos obtenidos para el TRH de 0,5 días manifestaron incrementos mayores en ambos parámetros, aunque durante este último periodo no fueron alcanzadas condiciones estacionarias.

No fue detectado metano en el biogás durante todo el tiempo de operación y la concentración media de sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>) en el gas varió entre 14-10 ppm a medida que el TRH disminuyó.



**Figura 6.1.** Evolución de la producción diaria de biogás y del contenido de hidrógeno en el biogás para los diferentes TRH evaluados.

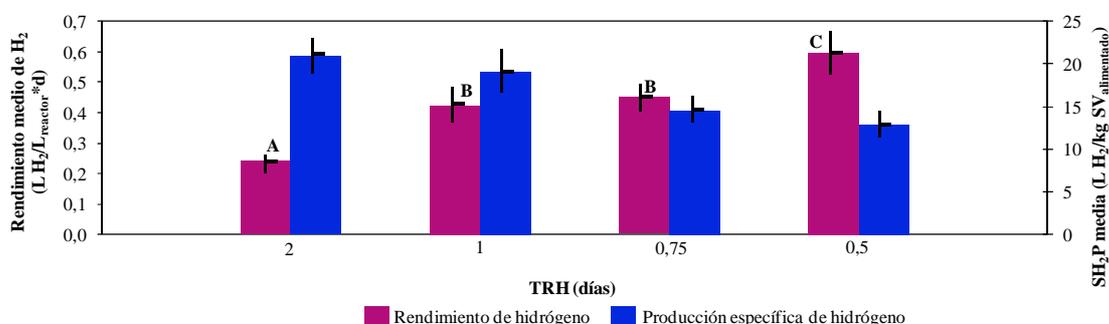
Los valores medios de los parámetros de rendimiento del reactor de hidrógeno para cada TRH evaluado están recogidos en la tabla 6.1.

**Tabla 6.1.** Valores medios de los parámetros de rendimiento de los sistemas evaluados.

Parámetro	TRH=2 d	TRH=1 d	TRH=0,75 d	TRH=0,5 d
Producción de gas (mL/d)	2,49±0,08	4,69±0,26	5,12±0,15	5,80±0,27
% H <sub>2</sub> en el gas	27,5±1,1	26,1±1,9	27,1±1,7	30,4±0,7
Producción H <sub>2</sub> (L H <sub>2</sub> /L <sub>reactor</sub> *d)	0,23±0,02	0,42±0,04	0,44±0,03	0,60±0,05
SH <sub>2</sub> P (mL H <sub>2</sub> /g SV <sub>alimentado</sub> )	20,58±1,53	18,47±1,91	14,58±0,98	13,13±1,04
VCO (g SV <sub>alimentado</sub> /L <sub>reactor</sub> *d)	11,4±0,3	22,7±0,6	30,3±0,8	45,4±1,2
ST (g/L)	20,1±0,5	20,7±0,9	21,3±0,6	21,5±0,7
SV (g/L)	17,6±0,4	17,9±0,3	19,6±0,4	19,9±0,4
% Destrucción SV	22,5±3,5	21,1±3,4	13,7±3,7	12,3±3,9
DQOs (g/L)	16,9±0,9	16,0±2,5	14,5±1,1	13,4±0,6
Amonio (mg/L)	78±8	71±6	67±6	15±2

±: desviación durante la fase estable o steady state.

Con respecto al rendimiento volumétrico de hidrógeno ( $L H_2/L_{\text{reactor}} \cdot d$ ) fue observado un aumento al disminuir el TRH. La aplicación de un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) a los rendimientos obtenidos para cada TRH revelan que difieren significativamente a un nivel de significación del 95% (la tabla A.7 del Anexo A.III recoge los resultados del análisis estadístico). Esto quiere decir que al menos uno de los sistemas ha originado rendimientos volumétricos de hidrógeno tales que su media difiere estadísticamente del resto de sistemas. La aplicación del test de separación de medias de Tukey permitió comparar entre que TRH existen diferencias significativas en el rendimiento de hidrógeno a un nivel de significación del 95% (la tabla A.8 del Anexo A.III recoge los resultados del análisis estadístico). Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas entre los valores medios obtenidos para los TRH de 1 y 0,75 d, como muestra la figura 6.2 donde cada letra fue utilizada para indicar diferencias significativas en los valores medios.



**Figura 6.2.** Valores medios de rendimiento volumétrico de hidrógeno y producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ) obtenidos para los diferentes TRH evaluados. Las medias seguidas por una misma letra no difieren significativamente de acuerdo al Test de Tukey, ( $\alpha=0,05$ ).

Sin embargo, a medida que el TRH disminuyó fue observado un descenso en la producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ). Según los datos mostrados en la tabla 6.1, la producción específica de hidrógeno disminuyó un 36% cuando el TRH descendió desde 2 a 0,5 días. Esta disminución de la producción específica

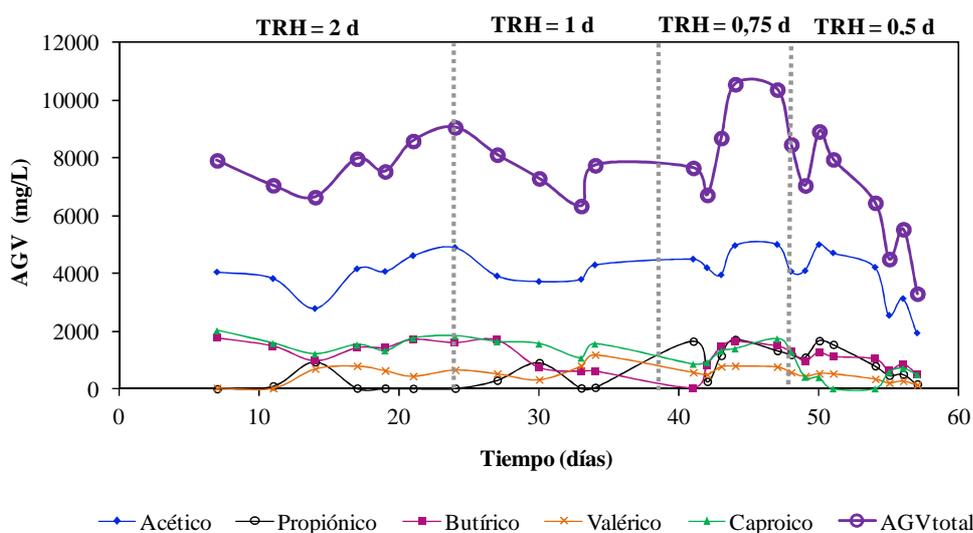
de hidrógeno asociada a la reducción del TRH puede estar causada por una escasez de sustrato soluble (debido a una hidrólisis insuficiente del material particulado) o bien por una metabolización de los productos solubles incompleta al no disponer de tiempo suficiente para el proceso de fermentación completo (considerando hidrólisis y conversión en AGV). Por lo tanto, el primer efecto a tener en cuenta cuando el TRH es reducido en un reactor está relacionado con el tiempo disponible para la hidrólisis del material particulado y la posterior metabolización de los sustratos hidrolizados por los microorganismos.

Por otro lado, cuando el TRH es reducido en un reactor manteniendo constante la concentración de ST de la alimentación hay que tener en cuenta el efecto del incremento en la velocidad de carga orgánica (VCO) asociado a un mayor volumen de sustrato alimentado al reactor por unidad de tiempo. A este respecto han sido realizados varios estudios utilizando sustratos solubles tales como glucosa y sacarosa para eludir las limitaciones de la hidrólisis como un factor adicional (Kim et al., 2006; Kyazze et al., 2006; Ozkan et al., 2010; Van Ginkel y Logan, 2005). Gómez et al. (2009) utilizaron como sustrato residuos de comida y observaron reducciones en el rendimiento de hidrógeno con el incremento de la VCO (impuesta en el sistema al aumentar el contenido en ST de la alimentación desde el 3% al 6% y manteniendo el TRH constante en 3 días). Los autores atribuyeron los resultados a la acumulación de AGV que provocó la inhibición del sistema de fermentación. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan más con el trabajo publicado por Turcot et al. (2008), aunque estos autores utilizaron glucosa como sustrato y, por lo tanto, no tuvieron que considerar impedimentos en la fase de hidrólisis. Ellos también observaron un aumento en la producción volumétrica de hidrógeno y una reducción en la producción específica de hidrógeno cuando la VCO fue incrementada. Con respecto a residuos de elevado tamaño de partícula, Kim et al. (2008a) evaluaron de forma independiente el efecto del tiempo de retención de sólidos (TRS) y TRH en la fermentación de residuos de comida, para demostrar la importancia de la hidrólisis del material insoluble durante el proceso de fermentación oscura. Wang y Zhao (2009) estudiaron el proceso de producción de hidrógeno y metano en dos etapas a partir de residuos de comida evaluando el

efecto del incremento de la VCO con la correspondiente reducción del TRS. Los autores observaron que el incremento de la VCO causó una disminución de la producción específica de hidrógeno asociada a una reducción en la eficiencia de la etapa de hidrólisis por no disponer de tiempo suficiente para la hidrólisis de los sustratos insolubles.

La hipótesis de limitaciones en la etapa de hidrólisis como la principal causa de la reducción continua de la producción específica puede ser inferida por el descenso de los valores de DQO soluble observados al disminuir el TRH (tabla 6.1). Sin embargo, en el presente estudio los valores de DQO soluble representan los productos de hidrólisis y también los AGV generados durante la fermentación, por ello el efecto puro de la hidrólisis no pudo ser cuantificado con este parámetro. De este modo, el descenso observado en los valores de DQO soluble fue asociado con un descenso en la eficiencia del proceso de fermentación (considerando hidrólisis y conversión en AGV).

La figura 6.3 muestra la evolución de los AGV para los diferentes TRH evaluados. La concentración total de AGV también fue representada. Durante el último TRH evaluado (TRH de 0,5 d) fue observada una reducción significativa en la concentración total de AGV (figura 6.3) que pudo haber sido causada por la escasez de sustrato soluble (debido a una hidrólisis insuficiente), o bien por disponer de un tiempo insuficiente para el proceso de fermentación completo (considerando hidrólisis y conversión en AGV). Esta última razón fue considerada la más probable ya que los valores medidos de DQO soluble mostraron una reducción inferior que la experimentada por los AGV totales medidos. Esto puede indicar que la etapa de fermentación tuvo un tiempo limitado, en lugar de la etapa de hidrólisis.



**Figura 6.3. Evolución de la concentración de AGV para los diferentes TRH evaluados.**

El AGV mayoritario fue el ácido acético para todos los TRH evaluados, con una concentración media de 4060 mg/l, 3935 mg/L, 4450 mg/L y 3709 mg/L para los TRH de 2, 1, 0,75 y 0,5 días, respectivamente. También fueron detectados en concentración menor los ácidos propiónico, butírico, valérico y caproico. La evolución del contenido total de AGV fue principalmente determinada por la concentración de ácido acético y no cambió significativamente al modificar el TRH, con la excepción del último periodo, en el cual experimentó una importante reducción. Todos los ácidos detectados exhibieron una tendencia descendente en concentración durante el último periodo evaluado, especialmente el ácido acético. Sin embargo, esta reducción en el contenido de AGV estuvo asociada al incremento continuo en la producción volumétrica de hidrógeno. Este comportamiento indica que ha existido durante el proceso de fermentación producción de ácido acético no vinculada a la producción de hidrógeno.

La concentración de ácido caproico no experimentó grandes modificaciones al reducir el TRH de 2 a 0,75 d (1608, 1456 y 1252 mg/L fueron las concentraciones medias correspondientes a los TRH de 2, 1 y 0,75 d, respectivamente). Sin embargo, al imponer en el reactor de hidrógeno el TRH de 0,5 d fue observado un descenso acusado en la concentración de este ácido (figura

6.3). La generación de ácido caproico en sistemas de fermentación oscura también ha sido relacionada con bajos rendimientos de hidrógeno debido a que su formación está asociada a fermentaciones secundarias donde son producidos etanol y ácido acético o etanol y ácido butírico. Así, la formación de ácido caproico es un indicador de que una solventogénesis significativa ha ocurrido reduciendo el rendimiento de producción de hidrógeno (Ding et al., 2010).

En general, es aceptado que la producción de hidrógeno por *Clostridium spp.* está relacionada con la producción de AGV y no con la producción de alcoholes. Sin embargo, los alcoholes son producidos en condiciones de bajo pH y bajo acumulación de AGV (Bahl y Dürre, 2001; Jones y Woods, 1986). La producción de alcohol por *Clostridium spp.* tiene un rendimiento energético inferior a la producción de ácido butírico y de ácido acético siendo la principal razón para la producción de alcohol el bloqueo de la penetración de AGV en la célula, lo cual es conocido como mecanismo de auto detoxificación (Kim et al., 2008b).

Según los resultados obtenidos en este estudio la acumulación de AGV observada durante los TRH de 2, 1 y 0,75 d (con concentraciones medias de 7830, 7379 y 8748 mg/L, respectivamente), pudo favorecer la producción de alcohol por parte de la población productora de hidrógeno (*Clostridium spp.*), resultando la formación de ácido caproico como un indicador de que dicha solventogénesis tuvo lugar.

Respecto a la concentración media de amonio en el reactor de hidrógeno disminuyó a medida que el TRH fue reducido (tabla 6.1) observando una concentración media de amonio similar a la de la alimentación (12,1 mg/L) cuando el TRH de 0,5 d fue evaluado. Puesto que la degradación de aminoácidos implica producción de AGV y amonio, la concentración de amonio en el reactor puede ser correlaciona con la cantidad de aminoácidos degradados cuando la carne es utilizada como sustrato. Los resultados obtenidos indican que las proteínas fueron degradadas en menor grado a medida que el TRH fue reducido no observando degradación significativa cuando fue evaluado el TRH de 0,5 d.

Además, el contenido de ST y SV del reactor de hidrógeno aumentó con la reducción del TRH. La reducción de SV (expresada como %) fue también calculada y recogida en la tabla 6.1. Como en el caso previo, la continua reducción del TRH resultó en un descenso en este parámetro, indicando la reducción de la eficiencia de la hidrólisis a medida que el TRH disminuyó debido al menor tiempo disponible para la hidrólisis de los sustratos insolubles. Resultados similares fueron observados por Wang y Zhao (2009).

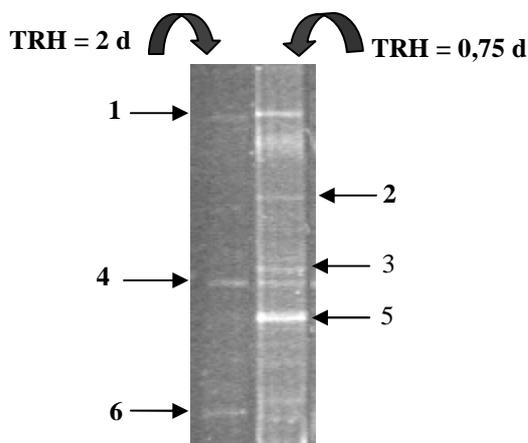
Estos resultados indican que TRH mayores son necesarios para lograr un segundo pico de producción de hidrógeno, relacionado con una degradación más completa del sustrato. El hidrógeno producido por litro de alimentación equivale a 326, 291, 248 y 210 mg de DQO cuando el reactor operó con TRH de 2, 1, 0,75 y 0,5 días, respectivamente (en base a los cálculos propuestos por Han and Shin, 2004). Esto representa aproximadamente un 1% de la DQO total contenida en la alimentación. Por lo tanto, durante el proceso de fermentación solo una pequeña cantidad de la materia orgánica fue convertida en biogás y el principal resultado del proceso fue la conversión de materiales orgánicos en DQO soluble.

En base a los resultados obtenidos TRH mayores fueron más favorables para la etapa de producción de hidrógeno en términos de la utilización del sustrato, ya que significan más tiempo para el proceso combinado de hidrólisis de los sustratos y la posterior conversión en productos ácidos. Sin embargo, con el descenso del TRH fue observado un aumento del rendimiento del reactor (expresado como  $L H_2/L_{\text{reactor}} * d$ ) ya que la VCO fue más alta, lo que conlleva un beneficio asociado al menor volumen del reactor necesario para obtener una determinada producción de hidrógeno. Este compromiso entre la eficiencia en la utilización de sustrato y el rendimiento del reactor expresado como  $L H_2/L_{\text{reactor}} * d$  puede ser salvado mediante la optimización del proceso de fermentación en base a la producción volumétrica de hidrógeno por unidad de reactor e incrementando el rendimiento global del proceso utilizando una segunda etapa alimentada con los productos metabólicos generados en el reactor de hidrógeno para producir más energía ya sea en forma de hidrógeno o metano (Redwood et al., 2009).

### 6.4.2. Efecto del TRH en la comunidad microbiana del reactor de hidrógeno.

La comunidad microbiana presente en el reactor fue analizada mediante la técnica PCR-DGGE a partir de dos muestras tomadas para los TRH de 2 y 0,75 días. Para el TRH de 2 días fue analizada una muestra tomada el día 24 de funcionamiento, y para el TRH de 0,75 días fue analizada una muestra tomada el día 43 de funcionamiento, correspondiendo al quinto día de evaluación de este TRH.

Los patrones de bandas obtenidos están recogidos en la figura 6.4. Las bandas más importantes observadas en los geles fueron cortadas y posteriormente analizada su secuencia. Estos resultados están recogidos en la tabla 6.2.



**Figura 6.4. Perfiles de bandas obtenidos mediante PCR-DGGE correspondientes a las muestras extraídas de los TRH de 2 y 0,75 días.**

**Tabla 6.2. Resultados de la secuenciación correspondiente a las bandas extraídas.**

Nº de banda	Correspondencia	Similitud (%)
1	<i>Selenomonas noxia</i>	92
2	Sin identificar	--
3	<i>Clostridium acidisoli</i>	97
4	<i>Clostridium butyricum</i>	94
5	<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	93
6	<i>Bifidobacterium spp.</i>	95

El patrón de bandas obtenido en cada muestra fue diferente indicando que un cambio en la comunidad microbiana tuvo lugar al modificar el TRH de 2 a 0,75 d. El número de bandas detectado cuando el reactor operó con un TRH de 2 d fue menor que el detectado para el TRH de 0,75 d, sugiriendo que la reducción aplicada al TRH aumentó la diversidad de especies en el reactor.

Para el TRH de 2 d fueron identificadas 3 bandas, 1, 4 y 6, correspondientes a las especies *Selenomonas noxia*, *Clostridium butyricum* y *Bifidobacterium spp.*, respectivamente. La intensidad de las bandas 1 y 6 fue semejante indicando que la abundancia relativa de las correspondientes especies microbianas en el reactor fue similar (Fang y Liu, 2002; Zhang y Fang, 2001). Sin embargo, la banda 4 correspondiente a *Clostridium butyricum* fue más intensa indicando que fue la especie que predominó en el reactor durante este periodo de evaluación.

Para el TRH de 0,75 d fueron detectadas 6 bandas. Las bandas 1, 4 y 6 que caracterizaron la población microbiana del reactor para el TRH de 2 días también estuvieron presentes en el reactor cuando éste operó a 0,75 días pero su intensidad fue diferente, así la banda 1, correspondiente a *Selenomonas noxia*, aumentó en intensidad y la banda 6, correspondiente a *Bifidobacterium spp.*, disminuyó en intensidad. A su vez, durante este periodo fueron identificadas dos especies más, *Clostridium acidisoli* y *Bifidobacterium thermacidophilum*, correspondientes a las

bandas 3 y 5, respectivamente. Dichas especies no estuvieron presentes en el reactor cuando éste operó con un TRH de 2 d. A su vez, la banda 5 fue la más intensa del patrón de bandas correspondiente al TRH de 0,75 días indicando que *Bifidobacterium thermacidophilum* fue la especie dominante en el reactor durante este periodo de experimentación.

La especie *Selenomonas noxia* es una bacteria productora de ácido propiónico. Los resultados del análisis microbiológico obtenido en el presente estudio indican que su presencia fue más significativa cuando el reactor operó con un TRH de 0,75 d, respecto al periodo evaluado a un TRH de 2d. Esta observación concuerda con la distribución de AGV atribuida a cada TRH, así la concentración de ácido propiónico fue mantenida a un mínimo en los TRH de 2 y 1 d (con valores medios de 179 y 340 mg/L, respectivamente) y una reducción en el TRH a 0,75 d resultó en un incremento en la concentración de este ácido (cuyo valor medio fue 1232 mg/L).

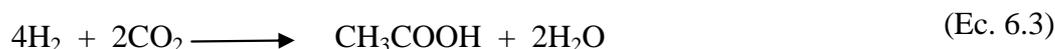
Secuencias de ADN relacionadas con *Selenomonas spp.* han sido identificadas en diversos estudios de producción de hidrógeno por fermentación oscura (Ueno et al., 2001, Kim et al., 2008b). Cohen et al. (1985) estudiaron la producción de hidrógeno a partir de sacarosa utilizando un cultivo mixto. En este estudio los productores de ácido butírico fueron principalmente *Clostridium spp.* y los productores de ácido propiónico fueron identificados principalmente con *Selenomonas spp.* Los autores observaron que la reducción del TRH de 0,75 a 0,5 d resultaba desventajosa para los productores de ácido propiónico. Un comportamiento similar fue observado en el presente estudio, así durante el TRH de 0,75 d la concentración de ácido propiónico aumentó pero al reducir el TRH a 0,5 d la concentración de ácido propiónico mostró una clara tendencia decreciente (figura 6.3) sugiriendo que dicho TRH no fue favorable para los productores de ácido propiónico (*Selenomonas noxia*), y un rendimiento más alto de hidrógeno fue observado. La producción de ácido propiónico involucra consumo de sustrato orgánico e hidrógeno (el cual debe ser producido por otras rutas metabólicas) según la ecuación (6.1) por ello es de esperar una reducción en el rendimiento de hidrógeno (Zhang et al. 2006). Así, la fermentación tipo ácido propiónico ha sido

asociada a bajos rendimientos de hidrógeno por diferentes autores (Li et al., 2009; Ren et al., 2007).



Durante el TRH de 2 d fue identificado *Bifidobacterium spp.*, sin embargo la banda correspondiente (banda 6) apenas resultó apreciable en la muestra analizada para el TRH de 0,75 d indicando que fue sensible a dicho TRH. A su vez, la especie *Bifidobacterium thermacidophilum* fue detectada en el reactor cuando operó con un TRH de 0,75 d y la intensidad de la banda indicó que fue la especie predominante durante este periodo de experimentación. Estas bacterias son productoras de ácido acético pudiendo transformar una molécula de glucosa en tres de ácido acético según la ecuación (6.1), pero normalmente forman tres moles de ácido acético y dos moles de ácido láctico por cada dos moles de glucosa. Kim et al. (2008b) también observaron la presencia de *Bifidobacterium thermacidophilum* durante la producción de hidrógeno a partir de sacarosa.

Tal y como fue explicado en el apartado anterior, la distribución de AGV observada en este ensayo indica que ha existido durante el proceso de fermentación producción de ácido acético no vinculada a la producción de hidrógeno. De este modo, es de esperar la presencia de microorganismos homoacetogénicos durante TRH superiores a 0,5 d. Dichos microorganismos son capaces de crecer bien heterotróficamente mediante la conversión de glucosa en ácido acético sin producir hidrógeno (en base a la ecuación 6.2), o bien autotróficamente produciendo ácido acético a partir de hidrógeno y dióxido de carbono como únicas fuentes de energía y carbono (en base a la ecuación 6.3) (Chen et al., 2009). Así, una vez impuesto el TRH de 0,5 d la concentración de ácido acético disminuyó drásticamente indicando que los microorganismos homoacetogénicos fueron sensibles a dichas condiciones de operación. En consecuencia el rendimiento de hidrógeno pudo ser beneficiado por supresión de las rutas metabólicas representadas por las ecuaciones (6.2) y (6.3).



*Clostridium butyricum* es una bacteria estrictamente anaerobia que fermenta carbohidratos a ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno (Chen et al., 2006). Según los resultados obtenidos en este trabajo *Clostridium butyricum* está presente cuando el reactor opera con un TRH de 2 y 0,75 d siendo responsable de la producción de hidrógeno en ambos casos. La intensidad de la banda es similar en ambos casos indicando que dicha especie no fue sensible a la reducción del TRH. A su vez, cuando el reactor operó con un TRH de 0,75 d fue determinada la presencia de *Clostridium acidisoli*, el cual fermenta los carbohidratos a ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno (Kuhner et al., 2000), siendo también responsable de la producción de hidrógeno durante este periodo. Kim et al. (2006, 2008b) también observaron la presencia simultánea de *C. butyricum* y *C. acidisoli* durante la producción continua de hidrógeno utilizando sacarosa como sustrato y sometiendo el lodo anaerobio utilizado como inóculo a un pre-tratamiento térmico.

Los resultados de este estudio sugieren que las especies del género *Clostridium* detectadas en el reactor no fueron sensibles a la reducción del TRH aplicado. A su vez, hay diversos estudios que confirman la presencia de *Clostridium* durante la producción continua de hidrógeno a TRH inferiores a 0,5 d (Chang et al., 2008; Lin et al., 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la reducción del TRH desde 2 d a 0,75 d originó cambios en la comunidad microbiana desde un consorcio que contenía principalmente productores de hidrógeno a otro que contenía productores de hidrógeno y consumidores de hidrógeno o no productores de hidrógeno, tales como bacterias productoras de ácido propiónico y de ácido acético. Esto coincidió con cambios en la concentración de los metabolitos determinados en el efluente del reactor. Así, durante el TRH de 0,75 d aumentó la concentración de ácido acético y ácido propiónico, respecto al TRH de 2 d. Sin

embargo, los rendimientos aumentaron debido a la mayor VCO suministrada al imponer un menor TRH.

Estos resultados indican que el TRH puede modificar la comunidad microbiana del reactor pudiendo afectar al rendimiento de hidrógeno. Del mismo modo, Chen y Lin (2003) observaron un incremento en el rendimiento de hidrógeno al reducir el TRH utilizando glucosa como sustrato y Zhang et al. (2006) también observaron que el TRH tiene un efecto significativo en la selección de la población microbiana presente en un reactor de producción de hidrógeno donde fue utilizado como inóculo un cultivo mixto.

## **6.5. CONCLUSIONES.**

### ***6.5.1. Respecto al efecto del TRH en el proceso de producción de hidrógeno.***

- La reducción sucesiva del TRH (entre 2 y 0,5 d) en el reactor de producción de hidrógeno originó un aumento significativo del rendimiento volumétrico de hidrógeno ( $L\ H_2/L_{\text{reactor}}*d$ ) lo que conlleva un beneficio asociado al menor volumen del reactor necesario para obtener una determinada producción de hidrógeno.
- Los TRH mayores fueron más favorables para la etapa de producción de hidrógeno en términos de la utilización del sustrato (estando asociados a producciones específicas de hidrógeno ( $SH_2P$ ) mayores), ya que significan más tiempo para el proceso combinado de hidrólisis de los sustratos y la posterior conversión en productos ácidos.
- La reducción en el TRH originó valores de SV y DQO solubles cada vez menores en el reactor de hidrógeno asociados con un descenso en la eficiencia del proceso de fermentación (considerando hidrólisis y conversión en AGV). A su vez, los resultados observados respecto a la

concentración media de amonio en el reactor de hidrógeno indicaron que las proteínas fueron degradadas en menor grado a medida que el TRH fue reducido no observando degradación significativa cuando fue evaluado el TRH de 0,5 d.

### **6.5.2. Respecto al efecto del TRH en la comunidad microbiana del reactor de hidrógeno.**

- El análisis de la comunidad microbiana presente en el reactor realizado mediante la técnica PCR-DGGE indicó que la reducción aplicada al TRH de 2 a 0,75 d aumentó la diversidad de especies en el reactor.
- La reducción del TRH desde 2 d a 0,75 d originó cambios en la comunidad microbiana desde un consorcio que contenía principalmente productores de hidrógeno (*Clostridium butyricum*) a otro que contenía productores de hidrógeno (*Clostridium butyricum* y *Clostridium acidisoli*) y consumidores de hidrógeno o no productores de hidrógeno, tales como bacterias productoras de ácido propiónico (*Selenomonas noxia*) y bacterias productoras de ácido acético (*Bifidobacterium thermacidophilum*). Por lo tanto, el TRH puede modificar la comunidad microbiana del reactor pudiendo afectar al rendimiento de hidrógeno.

## **6.6. BIBLIOGRAFÍA.**

- Antonopoulou G., Gavala H.N., Ioannis V., Skiadas K., Angelopoulos C. and Lyberatos G. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 110-119.
- Bahl H. and Dürre P. *Clostridia*. (2001). *Biotechnology and Medical Applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 49-63.
- Cohen A., Distel B., Vandeursen A., Breure A.M. and Vanandel J.G. (1985). Role of anaerobic spore-forming bacteria in the acidogenesis of glucose — changes induced by

- discontinuous or low-rate feed supply. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*. Vol. 51, pp. 179-192.
- Cuetos M.J., Gómez X., Escapa A. and Morán A. (2007). Evaluation and simultaneous optimization of bio-hydrogen production using 32 factorial design and the desirability function. *Journal of Power Sources*. Vol. 169, pp. 131-139.
- Chang J.-J., Wu J.-H., Wen F.-S., Hung K.-Y., Chen Y.-T. and Hsiao C.-L. (2008). Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 1579-1585.
- Chen C.C. and Lin C.Y. (2003). Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen production reactor. *Advances in Environmental Research*. Vol. 7, pp. 695-699.
- Chen W.H., Chen S.Y., Khanal S.K. and Sung S.W. (2006). Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 31, pp. 2170-2178.
- Chen W.-H., Sung S. and Chen S.-Y. (2009). Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 227-234.
- Ding H.-B., Tan G.-Y.A. and Wang J.-Y. (2010). Caproate formation in mixed-culture fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*. Vol. 101, pp. 9550-9559.
- Fan H.H.P. and Liu H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by mixed culture. *Bioresource Technology*. Vol. 82, pp. 87-93.
- Fan K.S., Kan N.R. and Lay J.J. (2006). Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR. *Bioresource Technology*. Vol. 97, pp. 84-89.
- Gómez X., Morán A, Cuetos M.J. and Sánchez M.E. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: a two phase process. *Journal of Power Sources*. Vol. 157, pp. 727-732.
- Gómez X., Cuetos M.J., Prieto J.I. and Morán A. (2009). Bio-hydrogen production from waste fermentation: Mixing and static conditions. *Renewable Energy*. Vol. 34, pp. 970-975.
- Han S.-K. and Shin H.-S. (2004). Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 569-577.
- Hao X., Zhou M., Yu H., Shen Q. and Lei L. (2006). Effect of sodium ion concentration on hydrogen production from sucrose by anaerobic hydrogen-producing granular sludge. *Chinese Journal of Chemical Engineers*. Vol. 14, pp. 511-517.

- Hawkes FR., Dinsdale R., Hawkes DL. and Hussy I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 27, pp. 1339-1347.
- Jones D.T. and Woods D.R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 50, pp. 484-524.
- Kim S.H., Han S.K. and Shin H.S. (2006). Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 199-207.
- Kim S.H., Han S.K. and Shin H.S. (2008a). Optimization of continuous hydrogen fermentation of food waste as a function of solids retention time independent of hydraulic retention time. *Process Biochemistry*. Vol. 43, pp. 213-218.
- Kim D.-H., Kim S.-H., Ko I.-B., Lee C.-Y. and Shin H.-S. (2008b). Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: Early switchover from batch to continuous operation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 1532-1451.
- Kuhner C.H., Matthies C., Acker G., Schmittroth M., Göbner A.S. and Drake H.L. (2000) *Clostridium akagii* sp. nov. and *Clostridium acidisoli* sp. nov.: acid tolerant, N<sub>2</sub>-fixing clostridia isolated from acidic forest soil and litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol. 50, pp. 873-881.
- Kyazze G., Martinez-Perez N., Dinsdale R., Premier G.C., Hawkes F.R., Guwy A.J. and Hawkes D.L. (2006). Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production. *Biotechnology and Bioenergy*. Vol 5, pp. 971-979.
- Lee Y.-W. and Chung J. (2010). Bioproduction of hydrogen from food waste by pilot scale combined hydrogen/methane fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 35, pp. 11746-11755.
- Li D., Yuan Z., Sun Z., Sun Y., Kong X. and Zhang Y. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 812-820.
- Lin C.Y. and Chang R.C. (1999). Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 74, pp. 498-500.
- Lin C.Y., Lee .CY., Tseng I.C. and Shiao I.Z. (2006). Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 915-919.
- Ozkan L., Erguder T.H. and Demirer G.N. (2010). Investigation of the effect of culture type on biological hydrogen production from sugar industry wastes. *Waste Management*. Vol. 30, pp. 792-798.

- Ren N.Q., Chua H., Chan S.Y., Tsang Y.F., Wang Y.J. and Sin N. (2007). Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Bioresource Technology*. Vol. 98, pp. 1774-1780.
- Redwood M.D., Paterson-Beedle M. and Macaskie L.E. (2009). Integrating dark and light biohydrogen production strategies: towards the hydrogen economy. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. Vol. 8, pp. 149-185.
- Shin H.S. and Youn J.H. (2005). Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis. *Biodegradation*. Vol. 16, pp. 33-44.
- Turcot J., Bisailon A. and Hallenbeck P.C. (2008). Hydrogen production by continuous cultures of *Escherichia coli* under different nutrient regimes. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 1465-1470.
- Ueno Y., Haruta S., Ishii M. and Igarashi Y. Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 56, pp. 555-562.
- Van Ginkel S.W. and Logan B.E. (2005). Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*. Vol. 39, pp. 3819-3826.
- Wang X. and Zhao Y.-C. (2009). A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 245-254.
- Yu H.Q., Hu Z.H. and Hong T.Q. (2003). Hydrogen production from rice winery wastewater by using a continuously stirred reactor. *Journal of Chemical Engineers of Japan*. 36, 1147-1151.
- Zhang T. and Fang H.H. (2001). Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 57, pp. 437-440.
- Zhang Z.P., Show K.Y., Tay J.H., Liang D.T., Lee D.J. and Jiang W.J. (2006). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 2118-2123.



*7. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A  
PARTIR DE LACTOSUERO*

---



## **7.1. INTRODUCCIÓN.**

### ***7.1.1. Producción de hidrógeno a partir de lactosuero.***

Una fuente importante de generación de residuos lo conforman los efluentes de las industrias agroalimentarias y especialmente de la industria láctea, que están caracterizados por presentar una alta carga orgánica. Este es el caso del lactosuero un subproducto de la fabricación de quesos que representa aproximadamente el 80% del volumen de la leche transformada. La producción mundial anual estimada de lactosuero es de aproximadamente  $10^8$  toneladas y debido a su alta carga orgánica (60-80 g DQO/L) constituye un contaminante potencial si su disposición es inadecuada (Davila-Vazquez et al., 2009).

En los últimos años, la industria láctea ha tomado conciencia de la importancia de tratar estos efluentes y transformarlos en productos útiles, no sólo como una manera de proteger el medio ambiente y en base a una legislación más

estricta (Farizoglu et al., 2004), sino también por razones económicas al poder comercializar un subproducto que inicialmente constituía un generador de importantes costes de producción (Yang et al, 2007).

Como han indicado Kapdan y Kargi (2006), las aguas residuales de la industria alimentaria, y especialmente de la industria láctea, tienen un alto potencial para ser utilizadas como materias primas para la producción de hidrógeno. Así, en los últimos años han sido realizados estudios que demuestran la viabilidad de producir hidrógeno a partir de lactosuero. Ferchichi et al. (2005) utilizaron lactosuero diluido (con una concentración de lactosa de 41,1 g /L) para estudiar la influencia del pH inicial en la producción de hidrógeno mediante ensayos en discontinuo utilizando como inóculo un cultivo puro de *Clostridium*. Collet et al. (2004) estudiaron la producción continua de hidrógeno a diferentes pH y velocidades de dilución utilizando lactosa como sustrato (10 g/L) y un cultivo puro. El primer trabajo publicado sobre producción continua de hidrógeno a partir de lactosuero utilizando cultivos mixtos fue realizado por Yang et al. (2007). Los autores evaluaron diferentes velocidades de carga orgánica (VCO) a un tiempo de retención hidráulico (TRH) fijo y realizaron un análisis de la comunidad microbiana del reactor que permitió detectar la presencia de especies del género *Lactobacillus* y en menor extensión del género *Clostridium*. Calli et al. (2008) evaluaron el proceso de producción discontinuo de hidrógeno en régimen termofílico a partir de xilosa y lactosa utilizando como inóculo compost. Davila-Vazquez et al. (2009) evaluaron la producción volumétrica de hidrógeno a diferentes TRH a partir de una solución de lactosuero en polvo y utilizando lodo anaerobio como inóculo. Tras determinar el TRH que permitió alcanzar la producción volumétrica de hidrógeno más alta, los autores estudiaron el efecto de la VCO manteniendo fijo el TRH. Venetsaneas et al. (2009) estudiaron el proceso de fermentación en dos etapas para la producción de hidrógeno y metano en régimen mesofílico utilizando como sustrato lactosuero no diluido (con una DQO total de 60,5 g/L). Los autores utilizaron como inóculo un cultivo mixto indígena contenido en el lactosuero crudo, una práctica que también ha sido aplicada por Antonopoulou et al. (2008a,b).

Un parámetro crítico para determinar la aplicación práctica a gran escala del proceso de fermentación es el rendimiento del reactor (expresado como  $LH_2/L_{\text{reactor}} \cdot d$ ) ya que cuanto mayor es dicho parámetro menor es el volumen de reactor necesario para obtener una determinada producción de hidrógeno, y de este modo los costes del reactor necesario también son menores (Levin et al., 2004; Kyazze et al., 2007). De lo que ha sido publicado hasta el momento sobre producción continua de hidrógeno mediante fermentación oscura utilizando como sustrato lactosuero o lactosa, puede considerarse que las velocidades de producción volumétrica de hidrógeno son mejoradas mediante una apropiada selección del inóculo y parámetros tales como la VCO y el TRH. Particularmente, puede considerarse que TRH más cortos y VCO más altas pueden aumentar la velocidad de producción volumétrica de hidrógeno (Davila-Vazquez et al., 2009).

## 7.2. OBJETIVOS.

Con los resultados de los estudios citados anteriormente, fue planteado como objetivo general de este capítulo el diseño e implementación de una metodología de trabajo para producir de forma continua hidrógeno a partir de lactosuero, en reactores de mezcla completa (CSTR) y en régimen mesofílico.

Entre los objetivos específicos están los siguientes:

- ❖ Evaluación del proceso de producción de hidrógeno según la fuente de inóculo utilizada mediante ensayos en discontinuo.
- ❖ Diseño e implementación de una metodología de arranque y operación para producir de forma continua y estable hidrógeno a partir de lactosuero en reactores de mezcla completa (CSTR).
- ❖ Evaluación del efecto de la disminución sucesiva del TRH (manteniendo constante la concentración de DQO del sustrato) sobre el rendimiento de hidrógeno y la distribución de ácidos grasos volátiles (AGV).

- ❖ Evaluación del efecto del aumento de la VCO (manteniendo constante el TRH) sobre el rendimiento de hidrógeno y la distribución de ácidos grasos volátiles (AGV).

## **7.3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### ***7.3.1. Metodología experimental.***

En este trabajo fue realizado en primer lugar un ensayo en discontinuo que permitió evaluar el proceso de producción de hidrógeno a partir de lactosuero según la fuente de inóculo utilizada. Posteriormente, una vez seleccionada la fuente de inóculo considerada como óptima, fue realizado un ensayo en continuo donde fue definida e implementada una metodología de trabajo que permitió producir de forma continua y estable hidrógeno. Una vez alcanzadas las condiciones estacionarias fueron evaluados diferentes TRH manteniendo constante la concentración de DQO de la alimentación lo que supuso la variación de la VCO al modificar el TRH (cuanto menor fue el TRH mayor fue la VCO aplicada). Finalmente, fue evaluado el efecto del aumento de la VCO al aumentar la concentración de DQO de la alimentación manteniendo constante el TRH.

#### **7.3.1.1. Ensayo de producción de hidrógeno en discontinuo.**

En este ensayo fueron evaluados tres sistemas que permitieron estudiar el comportamiento de tres fuentes de inóculo durante el proceso de producción de hidrógeno mediante fermentación oscura: lodo digerido, pellets de biosólido y la microflora indígena contenida en el lactosuero fresco. Los sistemas fueron denominados LD, PB y LS, respectivamente. Todas las fuentes de inóculo fueron descritas y caracterizadas en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. El lodo digerido utilizado presentó una concentración de sólidos totales (ST) y de sólidos volátiles (SV) de 22,0 g/L y 12,7 g/L, respectivamente.

El sustrato utilizado fue el lactosuero también descrito en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. Dicho sustrato fue diluido con agua desionizada hasta obtener una concentración de 63 g DQO/L. La tabla 7.1 recoge las principales características de la alimentación así preparada.

**Tabla 7.1. Características de la alimentación utilizada.**

<i>Parámetro</i>	<b>LS</b>
<b>pH</b>	6,5
<b>ST (g/l)</b>	51
<b>SV (g/l)</b>	47
<b>DQO (g/L)</b>	63
<b>Alcalinidad (mg/l)</b>	560
<b>Amonio (mg/l)</b>	25,9
<b>Lactosa (g/L)</b>	48
<b>Ácido láctico (mg/L)</b>	105
<b>Cl<sup>-</sup> (mg/l)</b>	899
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mg/l)</b>	169
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/l)</b>	< 50
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (mg/l)</b>	1175
<b>Na<sup>+</sup> (mg/l)</b>	942
<b>K<sup>+</sup> (mg/l)</b>	262
<b>Ca<sup>++</sup> (mg/l)</b>	278
<b>Nitrógeno total (Kjeldahl) (mg/L)</b>	294

Como reactores fueron utilizados erlenmeyers de 250 mL con tapones de caucho que disponían de una salida para el gas, similares a los utilizados en los ensayos del capítulo 4 (figura 4.1). La medición del volumen de biogás fue realizada mediante medidores de desplazamiento de agua. El estudio fue llevado a cabo en un baño termostatizado a 34±2 °C con agitación magnética.

Cada reactor fue cargado con un volumen determinado de sustrato y de inóculo, y también fueron añadidos 4 g de hidrogenocarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) como fuente de alcalinidad, tal y como está recogido en la tabla 7.2. Este suplemento de alcalinidad fue utilizado por otros autores para compensar la baja alcalinidad del lactosuero (Antonopoulou et al., 2008a,b; Venetsaneas et al., 2009). El sistema LD fue diseñado con un ratio alimentación/microorganismos (F/M) de 5,0. La concentración de la alimentación (F) fue basada en la demanda química de oxígeno (DQO) y la concentración de microorganismos fue estimada en base a la concentración de sólidos volátiles (SV) del inóculo utilizado. En todos los casos el volumen final del reactor fue 200 mL.

Los reactores fueron mantenidos en funcionamiento hasta que no fue detectada producción de gas. Para evaluar cada sistema fueron preparadas tres réplicas, una de ellas fue utilizada para determinar a diario el volumen de gas generado y su composición, y las restantes réplicas fueron utilizadas para tomar muestras de la fase líquida que fueron analizadas mediante los análisis rutinarios expuestos en la metodología analítica.

**Tabla 7.2. Descripción de los sistemas en el ensayo en discontinuo.**

<i>Sistema</i> <sup>1</sup>	<b>LD</b>	<b>PB</b>	<b>LS</b>
<b>Lactosuero (mL)</b>	100	200	200
<b>Lodo digerido (mL)</b>	100	---	---
<b>Pellets de biosólido (g)</b>	---	4	---
<b>NaHCO<sub>3</sub> (g)</b>	4	4	4

<sup>1</sup>LD: lodo digerido; PB: pellets de biosólido; LS: lactosuero.

### 7.3.1.2. Ensayo de producción de hidrógeno en continuo.

El inóculo utilizado para arrancar el reactor de hidrógeno fue fijado en base a los resultados obtenidos en el ensayo en discontinuo. El sustrato utilizado fue lactosuero descrito en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos.

Dicho sustrato fue diluido con agua desionizada hasta obtener una concentración de 63 g DQO/L (tabla 7.1). La alimentación así preparada fue almacenada en un tanque a 4 °C y desde ahí fue conducida al reactor de hidrógeno.

El reactor utilizado consistió en un reactor de mezcla completa (CSTR) con un volumen de trabajo de 5 L fabricado en metacrilato transparente de 5 mm de espesor y montado sobre una estructura autoportante de acero inoxidable. Estuvo provisto de un encamisado exterior por el que circuló agua de calefacción que permitió mantener el sistema a una temperatura de  $34\pm 2$  °C. El agitador utilizado fue tipo RZR 1 de la casa Heidolph y constó de un dispositivo para la regulación de la velocidad de agitación.

El reactor fue diseñado con una apertura superior para la salida del gas generado, una apertura lateral para la entrada de la corriente de alimentación, y una toma de fondo para la salida del efluente tratado. Las corrientes de alimentación y de efluente fueron bombeadas mediante bombas peristálticas modelo Dosiper C1R, las cuales fueron programadas, de acuerdo al régimen de alimentación utilizado en cada momento, mediante un controlador digital PID. Antes de que el material fresco fuese alimentado el mismo volumen de líquido fue retirado del reactor.

El gas producido en el reactor fue recogido por una abertura superior y conducido a un medidor de desplazamiento de agua de volumen reversible asociado a un contador de contacto húmedo. El pH del sistema fue controlado manualmente dos veces al día mediante la adición de solución de hidróxido de sodio (NaOH) 3N lo que permitió mantener el pH del sistema dentro del rango 5,0-6,0 unidades. Dicha solución alcalina fue utilizada por otros autores con resultados satisfactorios de producción estable de hidrógeno para controlar el pH durante la operación en continuo (Davila-Vazquez et al., 2008, 2009; Venetsaneas et al., 2009). La figura 7.1 recoge un esquema del montaje experimental utilizado en este ensayo.

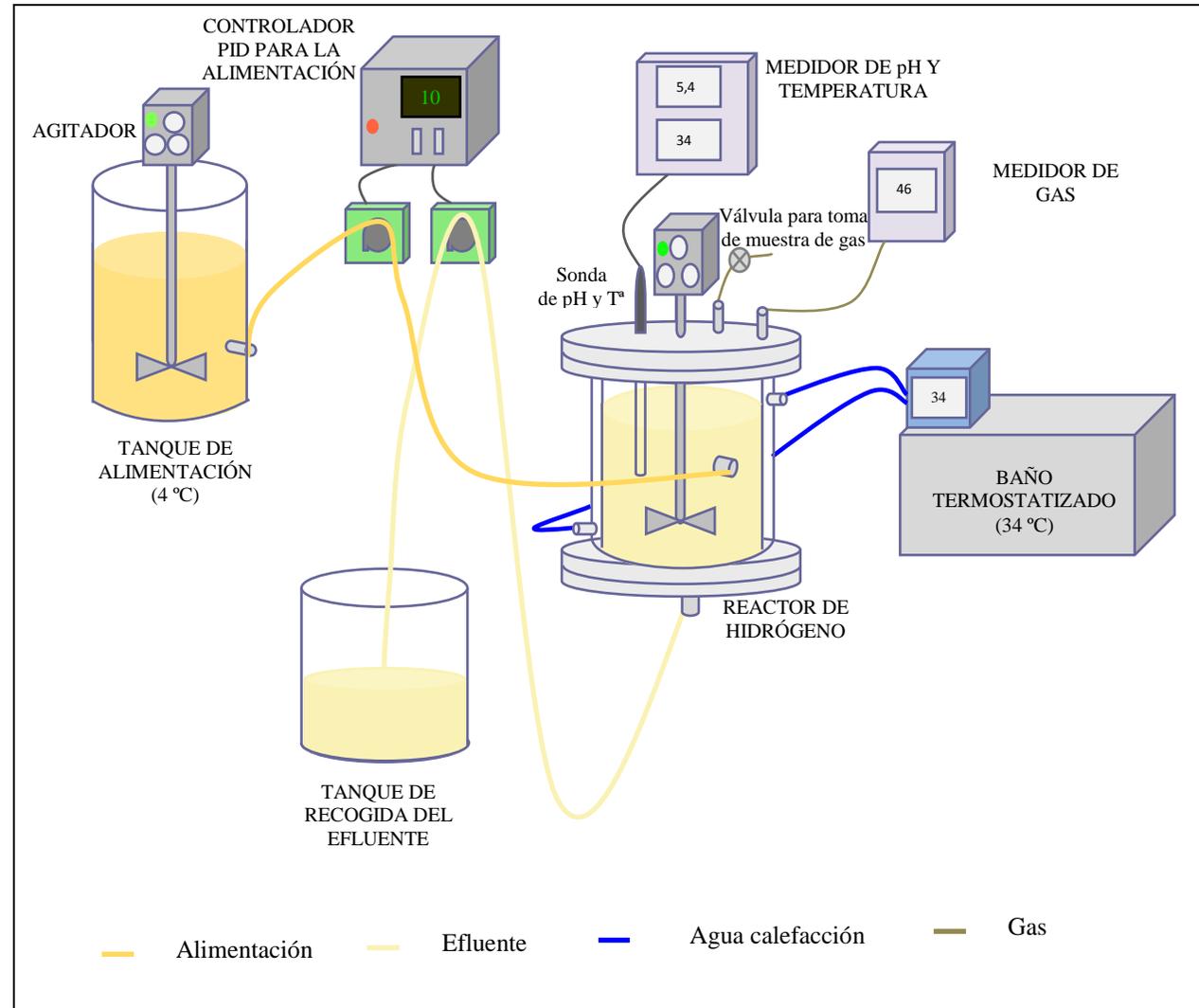


Figura 7.1. Esquema del montaje experimental utilizado para la producción de H<sub>2</sub>.

El reactor de hidrógeno operó con un volumen de trabajo de 3L. Inicialmente fue cargado con 3 L de alimentación, con 60 g de pellet de biosólido como fuente de inóculo, y con 60 g de NaHCO<sub>3</sub> como suplemento de alcalinidad. De este modo, fue mantenido el diseño evaluado durante el ensayo en discontinuo.

Tras cargar el reactor permaneció en discontinuo, a una temperatura de 34±2 °C y bajo agitación, hasta que el pH del sistema descendió a un valor de 5,4 unidades, permitiendo de este modo la activación de la microflora productora de hidrógeno contenida tanto en el inóculo como en el lactosuero (Antonopoulou et al., 2008a,b; Davila-Vázquez et al., 2009; Venetsaneas et al., 2009). Una vez observada la acidificación del sistema fue iniciado el proceso de alimentación que permitió evaluar de forma sucesiva cuatro condiciones experimentales operando en semi-continuo. Cada condición experimental fue evaluada durante un tiempo equivalente como mínimo a 7 veces el TRH fijado. A continuación, son descritas las características operacionales de cada periodo evaluado.

- ❖ **Periodo I:** fue fijado un TRH de 3 d y 4 ciclos de alimentación al día de 250 mL cada uno. La concentración de DQO de la alimentación fue 63 g DQO/L. La VCO fue 21 g DQO/L<sub>R</sub>\*d.
- ❖ **Periodo II:** fue fijado un TRH de 2 d y 6 ciclos de alimentación de 250 mL cada uno. La concentración de DQO de la alimentación no fue variada (63 g DQO/L). La VCO suministrada fue 31,5 g DQO/L<sub>R</sub>\*d.
- ❖ **Periodo III y IV:** fue fijado un TRH de 1 d y 8 ciclos de alimentación de 375 mL cada uno. En este caso fueron evaluadas dos VCO manteniendo fijo el TRH en 1 d. Para ello fue modificada la concentración de DQO de la alimentación diluyendo el sustrato inicial con agua desionizada hasta la concentración deseada. Durante el **periodo III** la concentración de DQO de la alimentación fue 40 g DQO/L de modo que la VCO suministrada fue 40 g DQO/L<sub>R</sub>\*d. Durante el **periodo IV** la concentración de DQO de la alimentación de partida no fue modificada (63 g DQO/L) de modo que la VCO suministrada fue 63 g DQO/L<sub>R</sub>\*d.

### **7.3.2. Metodología analítica.**

Los análisis rutinarios para el control del proceso fueron: pH, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), demanda química de oxígeno soluble (DQO<sub>s</sub>), amonio, concentración de lactosa, de ácido láctico y de ácidos grasos volátiles (AGV) y volumen y composición de biogás producido, conforme a los procedimientos descritos en el capítulo Materiales Empleados y Métodos Analíticos. Todos ellos fueron medidos a diario en el ensayo de producción de hidrógeno en discontinuo y tres veces por semana en el ensayo de producción de hidrógeno en continuo. El volumen de gas producido fue medido a diario durante todo el tiempo de operación. Todos los datos de producción de gas fueron normalizados a temperatura y presión estándar (0 °C y 760 mm Hg).

### **7.3.3. Tratamiento estadístico de los datos.**

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico Origin 6.1, llevando a cabo un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) que permitió determinar si el efecto que tiene el TRH sobre el rendimiento de hidrógeno es significativo a un nivel de significación del 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Además, fue aplicado el test de separación de medias de Tukey para comparar entre que TRH existen diferencias significativas respecto al rendimiento de hidrógeno a un nivel de significación del 95%.

## **7.4. RESULTADOS.**

### **7.4.1. Ensayo de producción de hidrógeno en discontinuo.**

#### **7.4.1.1. Producción de hidrógeno.**

El pH es un factor crítico en la producción de hidrógeno mediante procesos de fermentación. Existen varios trabajos relativos al estudio del rango

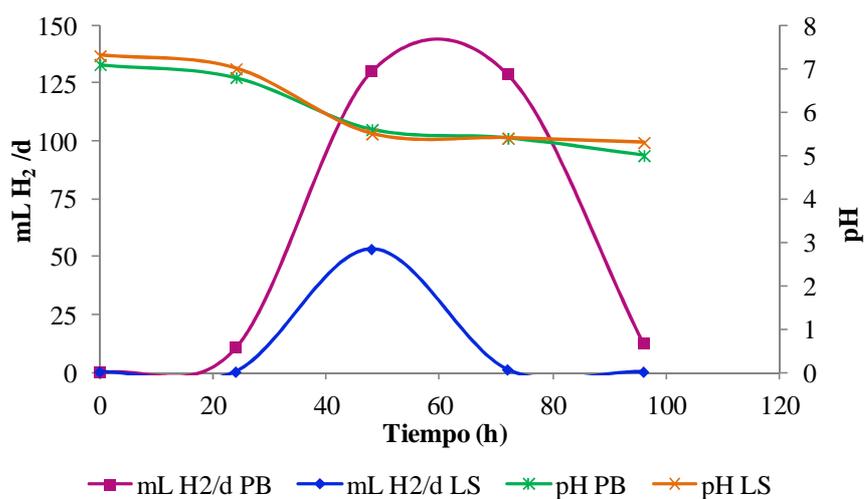
óptimo de pH que han proporcionado diferentes resultados. Kisaalita et al. (1987) indicaron que el rango de pH óptimo para la acidogénesis de lactosa o lactosuero está entre 5 y 6,5 unidades. A su vez, Kyazze et al. (2007) y Fang y Liu (2002) observaron máximos rendimientos de hidrógeno cuando el pH del medio varió entre 5 y 6. Ferchichi et al. (2005) realizaron experimentos en discontinuo para investigar el efecto del pH inicial (entre 5 y 10) sobre la producción de hidrógeno a partir de lactosuero fresco utilizando un inóculo puro de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Los autores observaron la velocidad de producción volumétrica de hidrógeno y el rendimiento molar de hidrógeno más altos cuando el pH inicial fue 6 alcanzando valores de 9,4 mmol H<sub>2</sub>/L/h y 2,7 mol H<sub>2</sub>/mol lactosa, respectivamente. Davila-Vazquez et al. (2008) obtuvieron rendimientos comparables cuando realizaron un estudio cinético de la producción de hidrógeno utilizando como inóculo lodo anaerobio y como sustrato lactosuero en polvo mediante ensayos en discontinuo. Sin embargo, en este caso la velocidad de producción volumétrica de hidrógeno más elevada fue observada bajo condiciones más alcalinas, cuando el pH inicial del sistema fue 7,5 y la concentración de sustrato fue 25 g/L.

Recientemente han sido realizados estudios de producción de hidrógeno a partir de lactosuero bajo control del pH mediante la adición de suplementos de alcalinidad en la alimentación de los sistemas. Antonopoulou et al. (2008a) utilizaron como sustrato para la producción de hidrógeno extracto de sorgo con un pH de 7,5 unidades, y como inóculo utilizaron la microflora indígena contenida en dicho sustrato (sin pre-tratar). Los autores añadieron 2,24 g de hidróxido de sodio (NaOH) and 6,80 g de dihidrógeno fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) por litro de alimentación lo que permitió mantener el pH del reactor dentro del rango 4,7-5,5 cuando evaluaron el proceso a diferentes TRH dentro del rango 24-4 h y observaron un contenido de hidrógeno en la fase gas dentro del intervalo 30,4-40,5%. Antonopoulou et al. (2008b) añadieron manualmente hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) en el lactosuero fresco sin diluir en una concentración de 20 g/L manteniendo el pH del sistema en 5,2 cuando operaron con un TRH de 24 h. Este mismo procedimiento fue utilizado por Venetsaneas et al. (2009) quienes estudiaron la producción de hidrógeno a partir de lactosuero fresco utilizando

como inóculo la microflora indígena contenida en la alimentación y fijando el TRH en 24 h. Los autores evaluaron dos métodos para mantener el pH en 5,2 unidades: la adición de  $\text{NaHCO}_3$  en el lactosuero fresco en una concentración de 20 g/L y el control automático del pH mediante una solución alcalina de  $\text{NaOH}$  2N. El contenido de hidrógeno en la fase gas en condiciones estacionarias fue 23,8% cuando el sistema fue suplementado con  $\text{NaHCO}_3$  y 32,0% cuando el pH fue controlado automáticamente. Sin embargo, la producción de biogás fue significativamente más alta con el primer método ya que la adición de  $\text{NaHCO}_3$  en la alimentación produjo grandes cantidades de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) incrementando el volumen total de biogás. Así, la velocidad de producción de hidrógeno y el rendimiento molar de hidrógeno fue superior cuando el pH fue ajustado mediante la adición de alcalinidad en la alimentación.

En base a los estudios mencionados en el párrafo anterior, en el presente trabajo fue añadido inicialmente  $\text{NaHCO}_3$  en una concentración de 20g/L como un suplemento de alcalinidad. De este modo, los pH iniciales de los sistemas LD, PB y LS fueron 7,0, 7,1 y 7,3, respectivamente.

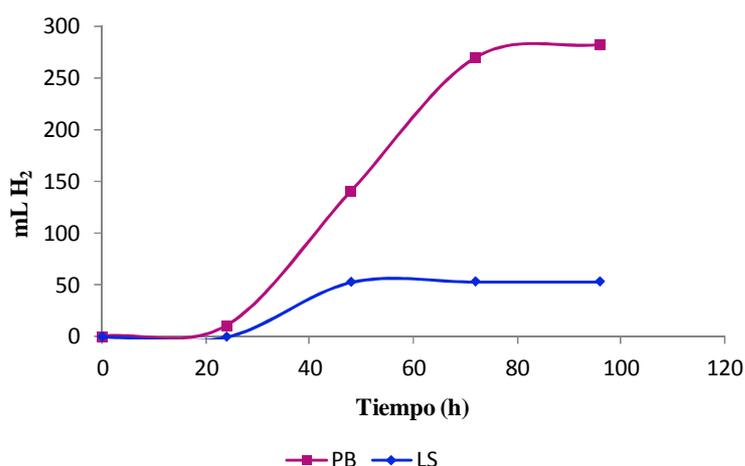
La figura 7.2 muestra la evolución de la producción diaria de hidrógeno y el cambio del pH para los sistemas PB y LS (ya que el sistema LD no mostró producción de biogás durante el tiempo de operación y su pH experimentó un ligero aumento variando en el rango de 7,0 a 8,8). El sistema PB y el sistema LS experimentaron un descenso del pH una vez transcurridas 24 horas coincidiendo con el inicio de la producción de hidrógeno. La acidificación de los sistemas fue debida a la conversión de la materia orgánica en AGV y conllevó la reducción del pH hasta valores de 5,0 y 5,3 unidades para los sistemas PB y LS, respectivamente. Un comportamiento similar fue observado por Yang et al. (2007) cuando evaluaron mediante ensayos en discontinuo la producción de hidrógeno utilizando como sustrato lactosuero en polvo y añadiendo carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) para ajustar el pH de los sistemas evaluados. En este caso la producción de biogás comenzó tras 6,5 horas coincidiendo con la reducción del pH del sistema que varió en el rango 7,5-5,0 unidades.



**Figura 7.2. Evolución del pH y la producción diaria de hidrógeno en los sistemas PB y LS.**

La figura 7.3 muestra la evolución de la producción acumulada de hidrógeno en los sistemas PB y PS durante el tiempo de experimentación. Tras una fase lag de aproximadamente 24 horas comenzó la producción de hidrógeno a diferente velocidad y extensión en ambos sistemas. El contenido máximo de hidrógeno en el gas generado fue del 47,8% y del 11,4% para los sistemas PB y LS, respectivamente. Y la producción acumulada de biogás fue 852 mL para el sistema PB y 552 mL para el sistema LS. De este modo, el sistema PB presentó una producción de hidrógeno acumulada un 81% superior a la del sistema LS (281,9 y 53,37 mL H<sub>2</sub>, respectivamente). En ninguno de los tres sistemas evaluados fue detectado metano en el biogás producido.

Estos resultados sugieren que la microflora indígena contenida en el lactosuero puede ser utilizada para producir hidrógeno sin necesidad de aplicar un pre-tratamiento al sustrato. Del mismo modo, los pellets de biosólido fueron un inóculo adecuado para producir hidrógeno a partir de lactosuero generando una fase gaseosa rica en hidrógeno.

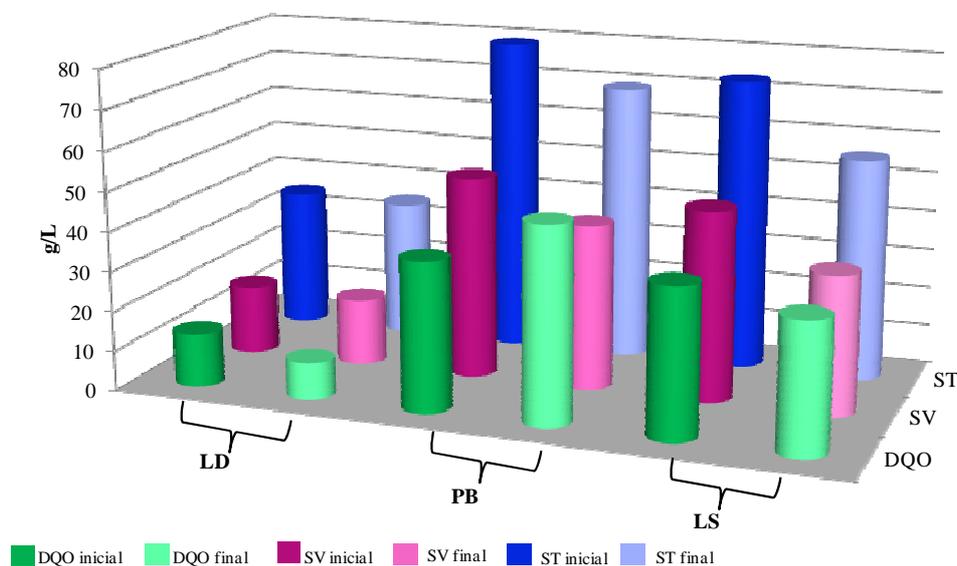


**Figura 7.3. Evolución de la producción acumulada de hidrógeno en los sistemas PB y LS.**

Los sistemas PB y PS fueron alimentados con 200 mL de lactosuero con una concentración de lactosa de 48 g/L. De este modo, el rendimiento molar de hidrógeno por mol de lactosa para los sistemas PB y LS fue 449 y 85 mmol de H<sub>2</sub>/mol de lactosa, respectivamente.

En la figura 7.4 está representado el contenido en ST y SV y DQO de los diferentes sistemas evaluados al inicio de la producción de hidrógeno (tras 24 h de experimentación) y al final del ensayo (tras 96 h de experimentación). Con respecto al sistema inoculado con lodo digerido (LD) no fueron observadas modificaciones significativas en el contenido en ST, SV y DQO. En el sistema LS fue observado un descenso en el contenido de ST, SV y DQO durante el tiempo de experimentación. Del mismo modo, en el sistema inoculado con pellets de biosólido (PB) fue observado un descenso en el contenido en ST y SV. Sin embargo, el contenido de DQO de este sistema aumentó durante el tiempo de estudio debido a que la inmersión de los pellets en el lactosuero generó la solubilización y la acidificación de la materia orgánica presente en el lodo seco (Kalogo y Bagley, 2008). Este efecto también fue observado en el ensayo en discontinuo descrito en el capítulo 4 donde el sustrato consistió en residuo de comida con un 3% en ST. En dicho estudio la materia orgánica contenida en el

lodo generó un valor alto de DQO soluble pero por sí misma no presentó producción de hidrógeno.

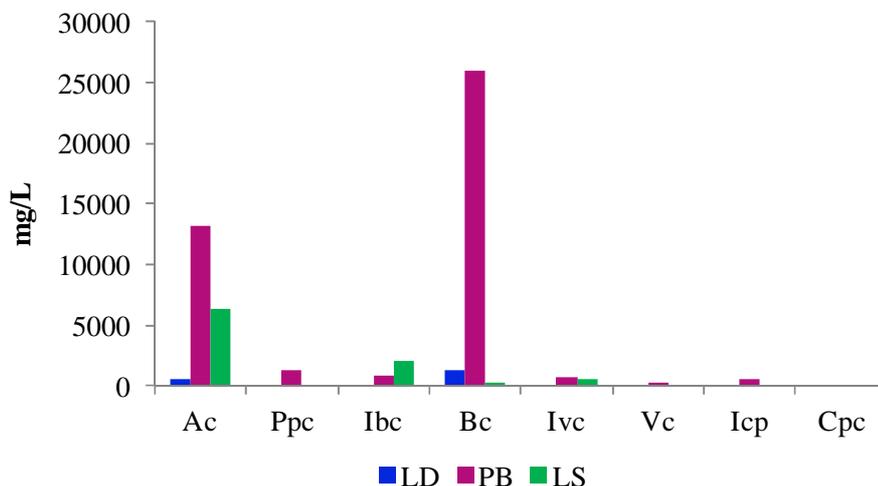


**Figura 7.4.** Valores iniciales (tras 24 h) y finales (tras 96 h) de ST, SV y DQO para los sistemas LD, PB y LS.

#### 7.4.1.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV).

La figura 7.5 muestra la evolución de los AGV para los diferentes sistemas evaluados. En el sistema LD no fue observada una producción significativa de AGV (la concentración total fue 1,9 g/L). Con respecto a los sistemas PB y LS, la acidificación de los pellets de biosólido generó un mayor contenido de AGV (la concentración total de AGV en ambos sistemas fue 43,0 y 9,2 g/L, respectivamente). El contenido de AGV en el sistema PB comprende la generación desde la materia orgánica contenida en el lodo seco junto con la debida a la acidificación del sustrato adicionado. En dicho sistema los ácidos grasos mayoritarios fueron el ácido butírico (con una concentración final de 26,0 g/L) y el ácido acético (con una concentración final de 13,2 g/L). Sin embargo, en el

sistema LS a penas fue observada producción de ácido butírico siendo más significativa la producción de ácido acético (con una concentración final de 6,3 g/L).



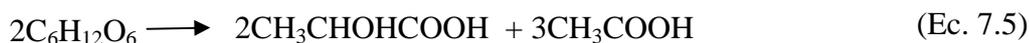
**Figura 7.5. Evolución de la concentración de AGV para los diferentes sistemas evaluados. Acético (Ac); Propiónico (Ppc); Isobutírico (Ibc); Butírico (Bc); Isovalérico (Ivc); Valérico (Vc); Isocaproico (Icp); Caproico (Cpc).**

El rendimiento molar de hidrógeno observado en los sistemas PB y LS fue significativamente inferior a los rendimientos máximos correspondientes a la fermentación tipo ácido acético, representada por la ecuación (7.1) (Collet et al., 2004), y la fermentación tipo ácido butírico, representada por la ecuación (7.2) (Khanal et al., 2004), cuyos valores son 8,0 y 4,0 mol hidrógeno/mol lactosa consumida, respectivamente.



Estos bajos rendimientos de hidrógeno pueden ser debidos a la producción de metabolitos reducidos tales como ácido láctico y ácido propiónico (Calli et al., 2008; Venetsaneas et al., 2009). En el sistema PB fue detectado ácido propiónico con una concentración de 1,3 g/L, y la concentración de ácido láctico en los

sistemas PB y LS fue 10,9 y 15,6 g/L, respectivamente (en ambos casos superior a la concentración de ácido láctico en el lactosuero utilizado como alimentación, 0,10 g/L). La producción de ácido láctico a partir de glucosa puede ocurrir por tres rutas metabólicas (Antonopoulou et al., 2008a): la homofermentativa representada por la ecuación (7.3), la heterofermentativa representada por la ecuación (7.4) y la ruta bifidum representada por la ecuación (7.5). Dichas rutas metabólicas tienen un balance de hidrógeno nulo, es decir, nada de hidrógeno es consumido o producido. Sin embargo, la formación de ácido láctico implica consumo de sustrato que no lleva asociada producción de hidrógeno por lo que su formación contribuye a reducir los rendimientos.



Por el contrario, la producción de ácido propiónico consume hidrógeno de acuerdo a la ecuación (6.3) indicada en el capítulo 6, aunque también puede ser producido junto al ácido acético a partir de ácido láctico, según la ecuación (7.6).



## ***7.4.2. Ensayo de producción de hidrógeno en continuo.***

### **7.4.2.1. Producción de hidrógeno.**

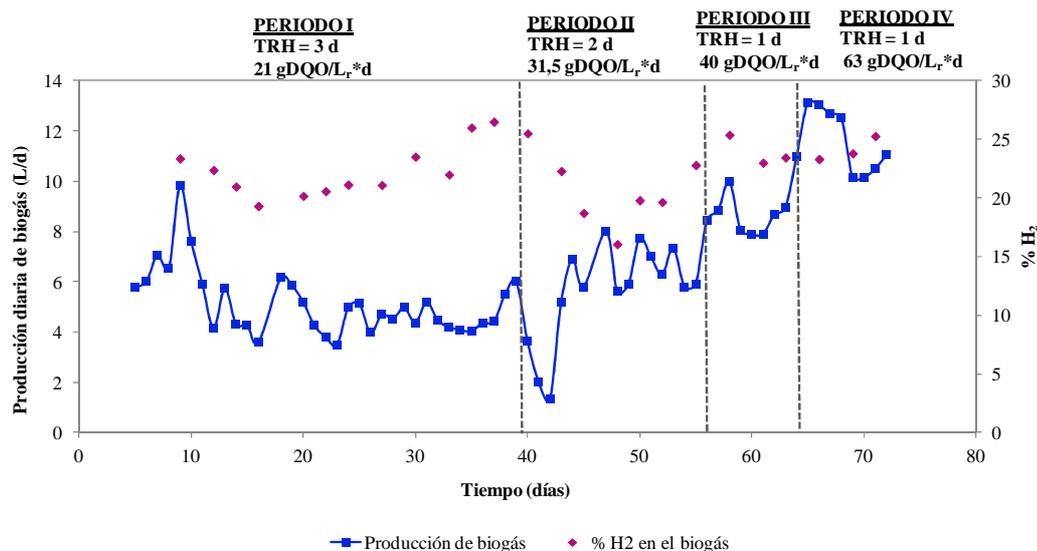
En este ensayo fue aplicado inicialmente un periodo de operación en discontinuo con el objetivo de activar la microflora productora de hidrógeno presente en el inóculo añadido (pellets de biosólido) y en el propio sustrato (lactosuero). Durante este periodo de operación en discontinuo el control del pH fue realizado mediante la adición de un suplemento de alcalinidad reproduciendo

la metodología aplicada en el primer ensayo. Tras 48 h de operación en discontinuo el pH del sistema descendió a 5,4 unidades y la producción de hidrógeno comenzó indicando la proliferación de microorganismos productores de hidrógeno dentro del reactor. A partir de este momento fue iniciado el periodo de operación en continuo fijando inicialmente un TRH de 3 d. Una fase gas rica en hidrógeno fue lograda manteniendo el pH del sistema dentro del rango 5,0-6,0 unidades mediante el control manual del pH utilizando una solución alcalina de NaOH 3N.

La producción de gas aumentó de forma inmediata tras iniciar el régimen de alimentación del reactor con un TRH de 3 d y posteriormente experimentó una progresiva reducción con el tiempo de operación (figura 7.6). Una vez transcurridos los primeros 20 días la producción de biogás fue estable presentando un valor medio de  $4,53 \pm 0,64$  L/d. A su vez, un comportamiento estable en términos del contenido de hidrógeno en el gas producido fue observado durante todo el tiempo de operación bajo un TRH de 3 d, registrando un contenido medio de  $22,5 \pm 2,3\%$ . Estos resultados concuerdan con los publicados por Gómez et al. (2006, 2009) acerca de la producción de hidrógeno a partir de residuos de comida y utilizando un inóculo mixto sin pre-tratamiento. En dichos estudios el máximo volumen de gas fue obtenido en la fase de arranque, con un posterior descenso en los días siguientes, consiguiendo una producción estable de gas durante el posterior tiempo de operación.

La reducción del TRH de 3 a 2 d y posteriormente de 2 a 1 d originó modificaciones inmediatas en la producción diaria de biogás y en el contenido de hidrógeno. Sin embargo, tras unos días de operación después de cada modificación el sistema recuperó la estabilidad. La tabla 7.3 recoge los valores medios de los parámetros de rendimiento del reactor de hidrógeno para cada condición experimental calculados durante la fase estable del sistema. Los valores medios de la producción diaria de biogás recopilados en la tabla 7.3 indican que dicho parámetro experimentó un aumento al disminuir el TRH. Sin embargo, el contenido de hidrógeno en el biogás sufrió un deterioro importante al modificar el TRH de 3 a 2 d experimentando una progresiva recuperación durante el tiempo de operación. Así, al final del periodo de evaluación del TRH de 2 d el contenido de

hidrógeno en el gas fue 22,8% y al final del periodo de evaluación del TRH de 1 d fue 25,3%. No fue detectado metano en el biogás durante todo el tiempo de operación indicando la ausencia de microorganismos metanogénicos en el reactor de producción de hidrógeno.



**Figura 7.6. Evolución de la producción diaria de biogás y del contenido de hidrógeno en el biogás para las diferentes condiciones de operación evaluadas.**

Durante el periodo I la producción volumétrica de hidrógeno media fue  $0,33 \pm 0,04$  L H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>\*d. La reducción del TRH de 3 a 1 d manteniendo constante la concentración de DQO de la alimentación (periodos I, II y IV) incrementó la producción volumétrica de hidrógeno (tabla 7.3) como resultado del incremento de la VCO. Este comportamiento concuerda con los resultados obtenidos en el capítulo 6 y también ha sido observado por diferentes estudios (Davila-Vazquez et al., 2009; Show et al, 2007; Van Ginkel y Logan, 2005).

Para determinar si existen diferencias significativas en la producción volumétrica de hidrógeno (L H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>\*d) para los diferentes TRH evaluados manteniendo constante la concentración de DQO de la alimentación, fue aplicado un análisis simple de la varianza (one-way ANOVA). Los resultados revelan que existen diferencias significativas en las producciones medias obtenidas para cada

TRH a un nivel de significación del 95% (la tabla A.9 del Anexo A.IV recoge los resultados del análisis estadístico). Esto quiere decir que al menos uno de los sistemas ha originado producciones volumétricas de hidrógeno tales que su media difiere estadísticamente del resto de sistemas. La aplicación del test de separación de medias de Tukey permitió comparar entre que TRH existen diferencias significativas en la producción volumétrica de hidrógeno a un nivel de significación del 95% (la tabla A.10 del Anexo A.IV recoge los resultados del análisis estadístico). Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas entre los valores medios obtenidos para los TRH de 3 y 2 d.

Los resultados anteriores, al respecto de la producción volumétrica de biogás y del contenido de hidrógeno en el gas, indican que la modificación del TRH de 3 a 2 d provocó un periodo de inestabilidad en la producción de hidrógeno que rápidamente fue superado, una vez que la población microbiana del reactor estuvo adaptada a las nuevas condiciones de operación. La posterior reducción del TRH de 2 a 1 d fue tolerada por la población microbiana sin ser apreciado un deterioro en la producción volumétrica de hidrógeno sino que aumentó de forma significativa como consecuencia del aumento de la VCO.

La mayor producción volumétrica de hidrógeno fue observada para el periodo IV (caracterizado por un TRH de 1 d y una VCO de 63 g DQO/L<sub>reactor</sub>\*d). Dicha producción resultó inferior a las observadas por otros autores. Antonopoulou et al. (2008b) observaron una producción de 2,51 L H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>\*d a partir de lactosuero sin diluir, sin añadir una fuente externa de inóculo y operando con un TRH de 1 d. Venetsaneas et al. (2009) obtuvieron en similares condiciones una producción volumétrica de hidrógeno de 1,92 L H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>\*d trabajando bajo control automático del pH a 5,2 unidades con una solución de NaOH 2N. Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos por estos autores y los obtenidos en el presente estudio pueden ser atribuidas a diferencias en la alimentación (tales como, carga microbiana, contenido en carbohidratos, proteínas, etc.) y en la fuente de inóculo. Así en este trabajo fue añadida una fuente externa de inóculo (pellets de biosólidos) y la alimentación consistió en lactosuero procesado mediante ultrafiltración y ósmosis inversa y, posteriormente, diluido con agua desionizada. En el trabajo realizado por Venetsaneas et al.

(2009) el contenido de nitrógeno total (Kjeldahl) del lactosuero utilizado como sustrato fue un 20,5% superior al contenido de la alimentación del presente estudio. Esto pudo afectar al metabolismo de la lactosa por parte de microorganismos productores de hidrógeno (tales como *Clostridium sp.*), condicionando la producción de hidrógeno y AGV. Diferentes estudios indican que la actividad de los microorganismos productores de hidrógeno depende de las características de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo y del ratio carbono/nitrógeno (C/N) (Kalil et al., 2008; Lin y Lay, 2004; Morimoto et al., 2004). Lin y Lay (2004) indicaron que la capacidad de producir hidrógeno de la microflora anaerobia (dominada por *Clostridium pasteurianum*) contenida en el lodo digerido fue dependiente del ratio C/N. Cuando el ratio C/N fue 47 el rendimiento de hidrógeno y la velocidad de producción de hidrógeno fueron 4,8 mol H<sub>2</sub>/mol sacarosa y 270 mmol H<sub>2</sub>/L\*d, respectivamente. Esto supuso un incremento del 500% y 80%, respectivamente, en comparación con el blanco evaluado. Así, los autores indican que una proporción adecuada de C/N mejoró la producción de hidrógeno modificando el camino metabólico.

Por otro lado, cuando el TRH disminuyó de 3 a 2 días (periodo I y II), manteniendo constante la concentración de DQO de la alimentación en 63 g DQO/L, fue observada una reducción del 19,7% en la producción específica de hidrógeno (SH<sub>2</sub>P) y el rendimiento molar de hidrógeno disminuyó desde 0,70 a 0,57 mmol H<sub>2</sub>/g DQO<sub>alimentada</sub>. La relación inversa entre el TRH y el rendimiento molar de hidrógeno fue observado por otros autores (Show et al., 2007; Yu et al., 2002; Van Ginkel y Logan, 2005). Van Ginkel y Logan (2005) estudiaron el efecto de la VCO sobre la producción de hidrógeno a partir de glucosa e indicaron que al disminuir el TRH (de 10 a 1 h) manteniendo constante la concentración de DQO de la alimentación (de 2,5 a 10 g DQO/L), la velocidad de producción volumétrica de hidrógeno aumentó y el rendimiento molar de hidrógeno disminuyó. Según los datos recogidos en la tabla 7.3 la reducción que experimentó la producción específica de hidrógeno y el rendimiento molar de hidrógeno cuando el TRH disminuyó de 3 a 2 d fue más pronunciada que la observada cuando el TRH fue reducido de 3 d a 1 d (periodo I y IV, la producción específica de hidrógeno disminuyó un 10,4% y el rendimiento molar de hidrógeno

descendió desde 0,70 a 0,64 mmol H<sub>2</sub>/g DQO<sub>alimentada</sub>). Esto fue debido a que el periodo evaluado con un TRH de 2 d estuvo caracterizado por un importante deterioro en la producción de hidrógeno que logró su recuperación hacia el final de la etapa, por lo que los valores medios de los parámetros de rendimiento fueron más bajos de lo esperado.

Los resultados obtenidos sugieren que el aumento de la VCO al modificar el TRH entre 3 y 1 d manteniendo constante la concentración de DQO de la alimentación en 63 g DQO/L, reduce ligeramente la producción específica de hidrógeno y el rendimiento molar de hidrógeno. Este resultado difiere del observado en el capítulo 6 donde la reducción del TRH estuvo asociada a una disminución más importante de la producción específica de hidrógeno. Esta diferencia es debida a las características del sustrato ya que la lactosa no presentó las limitaciones en la etapa de hidrólisis que sí existieron durante los ensayos del capítulo 6 donde el sustrato consistió en material particulado.

**Tabla 7.3. Valores medios de los parámetros de rendimiento de los sistemas evaluados.**

<i>Parámetro</i>	<b>TRH=3 d 21gDQO/L<sub>r</sub>*d</b>	<b>TRH=2 d 31,5gDQO/L<sub>r</sub>*d</b>	<b>TRH=1 d 40gDQO/L<sub>r</sub>*d</b>	<b>TRH=1 d 63gDQO/L<sub>r</sub>*d</b>
<b>Producción gas (mL/d)</b>	4,53±0,64	6,46±0,91	8,59±0,70	11,58±1,25
<b>% H<sub>2</sub> en el gas</b>	22,5±2,3	19,9±2,5	23,9±1,3	24,1±1,0
<b>Producción H<sub>2</sub> (L H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>*d)</b>	0,33±0,04	0,40±0,07	0,72±0,12	0,90±0,10
<b>SH<sub>2</sub>P (mL H<sub>2</sub>/g SV<sub>alimentado</sub>)</b>	22,38±2,51	17,96±3,21	21,01±3,55	20,06±2,32
<b>Rendimiento H<sub>2</sub> (mmol H<sub>2</sub>/g DQO<sub>alimnt</sub>)</b>	0,70±0,05	0,57±0,08	0,80±0,14	0,64±0,12
<b>ST (g/L)</b>	41,6±1,1	46,1±1,0	32,3±0,6	44,7±0,7
<b>SV (g/L)</b>	30,0±0,6	40,5±0,5	25,1±0,4	36,6±0,4
<b>% Destrucción SV</b>	36,1±5,3	13,8±5,9	26,1±5,7	22,1±5,2
<b>DQO (g/L)</b>	54,2±1,7	54,8±1,9	34,0±1,3	48,9±1,6
<b>Amonio (mg/L)</b>	11,1±3,6	---	---	---
<b>Lactosa (g/L)</b>	32,98±4,77	30,71±1,38	34,91±4,30	40,66±3,14

±: desviación durante la fase estable o stady state.

Durante los periodos de evaluación III y IV fue estudiado el efecto del incremento de la VCO (desde 40 a 63 g DQO/L<sub>reactor</sub>\*d) manteniendo constante el TRH en 1 d. Para ello fue incrementada la concentración de DQO de la alimentación desde 40 a 63 g DQO/L. Este incremento de la VCO originó un aumento de la producción volumétrica de hidrógeno y una disminución de la producción específica y del rendimiento molar de hidrógeno (tabla 7.3). Este comportamiento coincide con el observado por otros autores (Kim et al., 2006; Van Ginkel y Logan, 2005). Van Ginkel y Logan (2005) estudiaron el efecto de la VCO sobre la producción de hidrógeno a partir de glucosa e indicaron que al aumentar la concentración de DQO de la alimentación (de 2,5 a 10 g DQO/L) manteniendo constante el TRH (entre 1 y 10 h), la velocidad de producción volumétrica de hidrógeno aumenta y el rendimiento molar de hidrógeno disminuye.

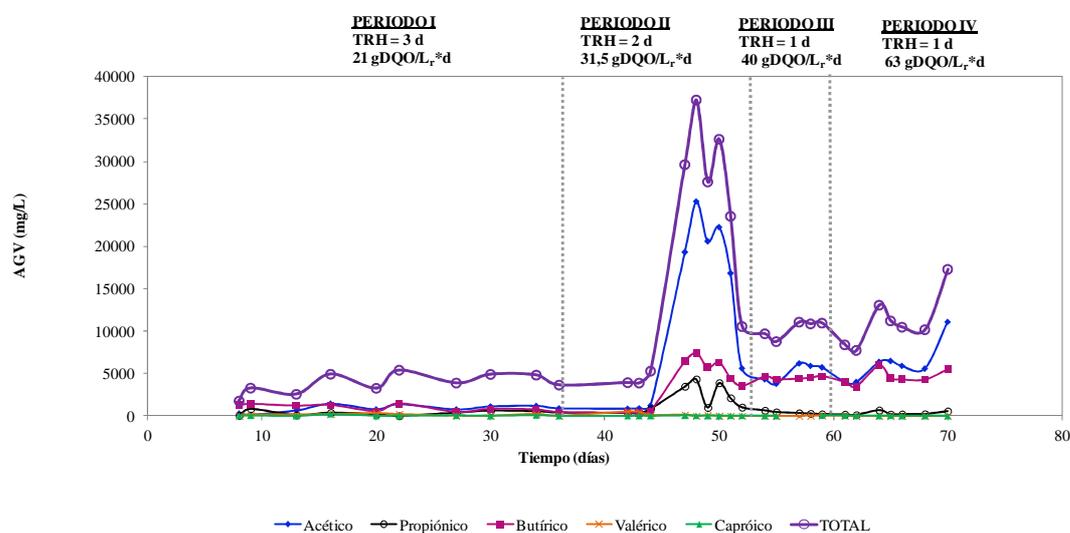
Por lo tanto, el aumento de la VCO alcanzado por reducción del TRH o por aumento de la concentración de DQO de la alimentación, bajo las condiciones experimentales evaluadas, provocó el incremento de la velocidad de producción volumétrica de hidrógeno y una ligera reducción del rendimiento molar de hidrógeno. Estos resultados pueden ser atribuidos a una fermentación deficiente o a la aparición de inhibición por sustrato o producto durante la producción de hidrógeno (Van Den Heuve and Beeftink, 1988; Wu et al., 2003). El compromiso entre ambos parámetros de rendimiento puede ser alcanzado mediante la optimización del proceso de fermentación basada en la velocidad de producción volumétrica de hidrógeno ( $LH_2/L_{reactor} * d$ ), ya que cuanto mayor es dicho parámetro menor es el volumen de reactor necesario para obtener una determinada producción de hidrógeno, e incrementando el rendimiento global del proceso utilizando una segunda etapa alimentada con los AGV generados para producir más energía en forma de hidrógeno o metano (Redwood et al., 2009).

La concentración media de DQO recogida en la tabla 7.3 corresponde a la suma de los diferentes productos metabólicos (AGV, ácido láctico, etanol, etc.), así como a los carbohidratos residuales no consumidos contenidos en el lactosuero. Durante el periodo III fue observada la mayor producción de hidrógeno por unidad de DQO eliminada alcanzando dicho parámetro el valor de

120,0 L H<sub>2</sub>/kg DQO<sub>eliminada</sub>. Asimismo, teniendo en cuenta el consumo de lactosa, la producción de hidrógeno durante los periodos I, II, III y IV fue 1,01, 0,71, 2,16 y 1,89 mol H<sub>2</sub> / mol lactosa consumida, respectivamente. El mayor rendimiento obtenido (2,16 mol H<sub>2</sub> / mol lactosa consumida, periodo III) representa un 27% del máximo rendimiento teórico (8 mol de hidrógeno por mol de lactosa consumida) considerando una fermentación tipo ácido acético.

#### 7.4.2.2. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y de ácido láctico.

La figura 7.7 muestra la evolución de los AGV para las diferentes condiciones experimentales evaluadas. La concentración total de AGV también fue representada.



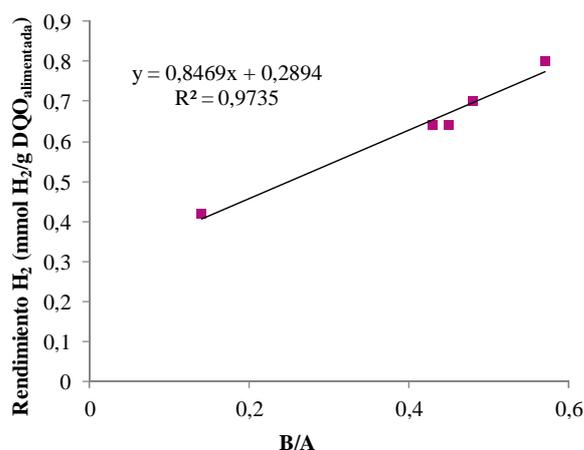
**Figura 7.7. Evolución de la concentración de AGV para las diferentes condiciones experimentales evaluadas.**

La modificación del TRH de 3 a 2 d provocó un periodo de inestabilidad que conllevó la reducción de la producción de hidrógeno y el aumento brusco de la concentración total de AGV en el reactor. Esto puede ser atribuido a la

necesidad de la población microbiana del reactor a adaptarse a las nuevas condiciones de operación. Así, tras unos días de operación bajo el TRH de 2 d la concentración total de AGV disminuyó y el sistema recuperó la estabilidad.

Habitualmente, un alto rendimiento de hidrógeno está asociado a un alto ratio molar ácido butírico/ácido acético (B/A) (Kim et al., 2006; Zhao et al., 2008), tal y como indicaron los resultados obtenidos en este trabajo. El valor medio del ratio molar B/A durante el periodo estable de operación con un TRH de 3 d fue de 0,48 experimentando un descenso al imponer el TRH de 2 d hasta alcanzar el valor mínimo de 0,14 el día 49. Simultáneamente el rendimiento molar de hidrógeno descendió desde 0,70 mmol H<sub>2</sub>/g DQO<sub>alimentada</sub> (valor medio para el TRH de 3 d) hasta 0,42 mmol H<sub>2</sub>/g DQO<sub>alimentada</sub> (alcanzado el día 49). A su vez, la recuperación del rendimiento molar de hidrógeno estuvo asociada a la recuperación del valor del ratio molar B/A alcanzando el valor de 0,43 al final del periodo evaluado a un TRH de 2 d. Los valores de este parámetro para el TRH de 1 d fueron 0,57 y 0,45 cuando la VCO fue 40 y 63 g DQO/L<sub>reactor</sub>\*d, respectivamente. Tal y como indica la figura 7.8 existió una buena correlación entre el rendimiento molar de hidrógeno y el ratio molar B/A, sugiriendo que la formación de ácido butírico favoreció la producción de hidrógeno.

En teoría, la producción de ácido acético da lugar a rendimientos de hidrógeno mayores que la producción de ácido butírico (8 mol hidrógeno/mol lactosa consumida frente a 4 mol hidrógeno/mol lactosa consumida) (Collet et al., 2004; Khanal et al., 2004). Sin embargo, la producción de ácido acético puede también estar relacionada con el consumo de hidrógeno de acuerdo a la ecuación (6.2) recogida en el capítulo 6 (Chen et al., 2009; Kim et al., 2006). De este modo, los bajos rendimientos molares de hidrógeno observados durante todo el periodo de operación pueden estar asociados con el consumo de hidrógeno para la formación de ácido acético (Zhao et al., 2008).



**Figura 7.8. Correlación entre el rendimiento molar de hidrógeno y el ratio molar ácido butírico/ ácido acético (B/A).**

En general, los bajos rendimientos de hidrógeno son debidos a reacciones competitivas que ocurren de forma simultánea bajo las condiciones de fermentación. La formación de diferentes productos metabólicos finales justifica la hipótesis anterior. Así, durante todo el tiempo de operación fue observada la formación de ácido propiónico, la cual aumentó durante el periodo inestable provocado al modificar el TRH de 3 a 2 d (figura 7.7), dicha producción de ácido propiónico está asociada con la reducción del rendimiento de hidrógeno (Koskinen et al., 2007; Zhao et al., 2008). Del mismo modo fue detectado ácido láctico cuya concentración durante los periodos I, II, III y IV fue 7583, 3750, 1845 y 1327 mg/L, respectivamente. La formación de ácido láctico implica consumo de sustrato que no lleva asociada producción de hidrógeno por lo que su formación también contribuye a reducir los rendimientos (Antonopoulou et al., 2008a).

Estos resultados sugieren que una mezcla de fermentaciones ácidas ocurrieron durante la degradación biológica de los carbohidratos contenidos en el lactosuero resultando en bajos rendimientos de producción de hidrógeno. Tal y como fue indicado en los párrafos anteriores, este rendimiento varió en función de la concentración de los productos metabólicos individuales.

## **7.5. CONCLUSIONES.**

### ***7.5.1. Respecto a la producción de hidrógeno a partir de lactosuero en discontinuo con diferentes fuentes de inóculo.***

- La microflora indígena contenida en el lactosuero puede ser utilizada para producir hidrógeno sin necesidad de aplicar un pre-tratamiento al sustrato. Del mismo modo, los pellets de biosólido fueron un inóculo adecuado para producir hidrógeno a partir de lactosuero generando una fase gaseosa rica en hidrógeno.

### ***7.5.2. Respecto a la producción continua de hidrógeno a partir de lactosuero utilizando diferentes VCO.***

- La aplicación inicial de un periodo de operación en discontinuo de 48 horas de duración y caracterizado por el control del pH mediante la adición de un suplemento de alcalinidad, fue adecuada para activar la microflora productora de hidrógeno presente en el inóculo (pellets de biosólido) y en el propio sustrato (lactosuero).
- La modificación del TRH de 3 a 2 d dio lugar a un periodo de inestabilidad en la producción de hidrógeno que rápidamente fue superado, una vez que la población microbiana del reactor estuvo adaptada a las nuevas condiciones de operación. La posterior reducción del TRH de 2 a 1 d fue tolerada por la población microbiana sin ser apreciado un deterioro en la producción volumétrica de hidrógeno sino que aumentó de forma significativa como consecuencia del aumento de la VCO.
- El aumento de la VCO provocado por la modificación del TRH (entre 3 y 1 d) o por la modificación de la concentración de DQO de la alimentación (entre 40 y 63 g DQO/L), redujo ligeramente la producción específica de hidrógeno y el rendimiento molar de hidrógeno e incrementó la producción volumétrica de hidrógeno. Los bajos rendimientos molares de

hidrógeno observados durante todo el periodo de operación pueden estar asociados con el consumo de hidrógeno para la formación de ácido acético y ácido propiónico, así como a la formación de ácido láctico que implica un consumo de sustrato que no lleva asociada producción de hidrógeno.

- Existió una buena correlación entre el rendimiento molar de hidrógeno y el ratio molar B/A, sugiriendo que la formación de ácido butírico favoreció la producción de hidrógeno.

## 7.6. BIBLIOGRAFÍA.

- Antonopoulou G., Gavala H.N., Skiadas I.V., Angelopoulos K. and Lyberatos G. (2008a). Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 110-119.
- Antonopoulou G., Stamatelatos K., Venetsaneas N., Kornaros M. and Lyberatos G. (2008b). Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. Vol. 47, pp. 5227-5233.
- Calli B., Schoenmaekers K., Vanbroekhoven K. and Diels L. (2008). Dark fermentative H<sub>2</sub> production from xylose and lactose-effects of on-line pH control. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 522-530.
- Collet C., Adler N., Schwitzguebel J.P. and Peringer P. (2004). Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 1479-1485.
- Chen W.-H., Sung S. and Chen S.-Y. (2009). Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 227-234.
- Davila-Vazquez G., Cota-Navarro C.B., Rosales-Colunga L.M., León-Rodríguez A. and Razo-Flores E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 34, pp. 4296-4304.

- Davila-Vazquez G., Alatraste-Mondragón F., León-Rodríguez A. and Elías Razo-Flores. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 33, pp. 4989-4997.
- Fan H.H.P. and Liu H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by mixed culture. *Bioresource Technology*. Vol. 82, pp. 87-93.
- Farizoglu B., Keskinler B., Yildiz E. and Nuhoglu A. (2004). Cheese whey treatment performance of an aerobic jet loop membrane bioreactor. *Process Biochemistry*. Vol. 39, pp. 2283-2291.
- Ferchichi M., Crabbe E., Gil G.H., Hintz W. and Almadidy A. (2005). Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology*. Vol. 120, pp. 402-409.
- Gómez X., Morán A, Cuetos M.J. and Sánchez M.E. (2006). The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid wastes and slaughterhouse waste: a two phase process. *Journal of Power Sources*. Vol. 157, pp. 727-732.
- Gómez X., Cuetos M.J., Prieto J.I. and Morán A. (2009). Bio-hydrogen production from waste fermentation: Mixing and static conditions. *Renewable Energy*. Vol. 34, pp. 970-975.
- Khanal S.K., Chen W.H., Li L. and Sung A. (2004). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 1123-1131.
- Kalil S.M., Alshiyab S.H. and Yusoff M.W. (2008). Effect of Nitrogen Source and Carbon to Nitrogen Ratio on Hydrogen Production using *C. acetobutylicum*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 4, pp. 393-401.
- Kalogo Y. and Bagley M.D. (2008). Fermentative hydrogen gas production using biosolids pellets as the inoculum source. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 540-546.
- Kapdan I.K. and Kargi F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microbiology Technology*. Vol. 38, pp. 569-582.
- Kim S.H., Han S.K. and Shin H.S. (2006). Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*. Vol. 41, pp. 199-207.
- Kisaalita W. S., Pinder K.L. and Lo K.V. (1987). Acidogenic fermentation of lactose. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 30, pp. 88-104.
- Koskinen P.E.P., Kaksonen A.H. and Puhakka J.A. (2007). The relationship between instability of H<sub>2</sub> production and compositions of bacterial communities within a dark

- fermentation fluidised-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 97, pp. 742-758.
- Kyazze G., Dinsdale R., Guwy A.J., Hawkes F.R., Premier G.C. and Hawkes D.L. (2007). Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 97, pp. 759-770.
- Levin D.B., Pitt L. and Love M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 173-185.
- Lin C.Y. and Lay C.H. (2004). Carbon/nitrogen ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 41-45.
- Morimoto M., Atsuko M., Atif A.A.Y., Ngan M.A., Fakhru-Razi A., Iyuke S.E. and Bakir A.M. (2004). Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 29, pp. 709-713.
- Redwood M.D., Paterson-Beedle M. and Macaskie L.E. (2009). Integrating dark and light biohydrogen production strategies: towards the hydrogen economy. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. Vol. 8, pp. 149-185.
- Show K.-Y., Zhang Z.-P., Tay J.-H., Tee Liang D., Lee D.-J. and Jiang W.-J. (2007). Production of hydrogen in a granular sludge-based anaerobic continuous stirred tank reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 32, pp. 4744-4753.
- Van Den Heuve J.C. and Beftink H.H. (1988). Kinetic effects of simultaneous inhibition by substrate and product. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 31, pp. 718-724.
- Van Ginkel S.W. and Logan B. (2005). Increased biological hydrogen production with reduced organic loading. *Water Research*. Vol. 39, pp. 3819-3826.
- Venetsaneas N., Antonopoulou G., Stamatelatos K., Kornaros M. and Lyberatos G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology*. Vol. 100, pp. 3713-3717.
- Yang P., Zhang R., McGarvey J.A. and Benemann J.R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 32, pp. 4761-4771.
- Yu H., Zhu Z., Hu W. and Zhang H. (2002). Hydrogen production from rice winery wastewater in an up flow anaerobic reactor by using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. Vol. 27, pp. 1359-1365.

Wu S.Y., Lin C.N. and Chang J.S. (2003). Hydrogen production with immobilized sewage sludge in three-phase fluidized-bed bioreactors. *Biotechnology Progress*. Vol. 19, pp. 828-832.

Zhao Q.-B., Mu Y., Wang Y., Liu X.-W., Dong F. and Yu H.-Q. (2008). Response of a biohydrogen-producing reactor to the substrate shift from sucrose to lactose. *Bioresource Technology*. Vol. 99, pp. 8344-8347.



## *8. CONCLUSIONES GENERALES*

---



La realización del trabajo experimental de producción de hidrógeno por fermentación oscura a partir de residuos de comida y lactosuero permite extraer las siguientes conclusiones:

***8.1. Respecto a la producción de hidrógeno utilizando pellets de biosólido como fuente de inóculo.***

- ❖ Los pellets de biosólido fueron una fuente de inóculo adecuada para los sistemas de producción de hidrógeno por fermentación oscura en régimen mesofílico y termófilo, utilizando como sustrato residuos vegetales de comida. Los ensayos iniciales indicaron que su capacidad para generar microflora productora de hidrógeno no estuvo afectada por el ajuste inicial del pH del sistema (a pH 5,0 y 7,0) ni por la masa de inóculo utilizada. Estos resultados permitieron fijar una masa de inóculo óptima (4 gramos de pellets de biosólido por cada 250 ml de volumen de reactor) y fue descartada la necesidad de realizar un ajuste del pH inicial.

- ❖ Una vez iniciada la producción de hidrógeno, el sistema termofílico presentó un contenido de hidrógeno en el gas superior al del sistema mesofílico y su producción específica de hidrógeno fue 3,3 veces mayor. Estos resultados fueron explicados al certificar la presencia de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus spp.*) en el sistema mesofílico ya que su metabolismo de la glucosa produce ácido láctico y etanol pero no produce hidrógeno. Sin embargo, estas bacterias no fueron detectadas en el reactor termofílico como tampoco fue detectada la producción de etanol.
- ❖ Los resultados del estudio de la población microbiana indicaron que la producción de hidrógeno en régimen termofílico estuvo asociada a *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* y en régimen mesofílico fue asociada a *Clostridium butyricum*.
- ❖ La producción de hidrógeno en el reactor MBR termofílico fue 3,2 veces más alta que en el reactor MBR mesofílico, consiguiendo valores de producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ) de 57,6 y 17,9 mL  $H_2/g$   $SV_{alimentado}$ , respectivamente, operando bajo un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 2,5 días, un tiempo de retención de sólidos (TRS) de 12,5 días y bajo control del pH dentro del rango 5,0-6,0 unidades. Esta menor producción de hidrógeno observada en el reactor MBR mesofílico, se relaciona con una producción más alta de ácido propiónico que consume hidrógeno y de ácido caproico asociado a solventogénesis significativas.
- ❖ No fue detectado metano en el gas generado en los reactores MBR, tanto en régimen mesofílico como en régimen termofílico. Esto indica que las condiciones de operación fueron adecuadas para eliminar o suprimir las bacterias metanogénicas en dichos reactores sin ser necesario un pretratamiento adicional del inóculo.

### ***8.2. Respecto a la producción continua de hidrógeno con adición de sobrenadante digerido.***

- ❖ Los requerimientos de álcali necesarios para mantener el pH del reactor de hidrógeno entre 5,0 y 6,0 unidades fueron reducidos mediante la adición de sobrenadante digerido sin pretratar o pretratado en una unidad de ultrafiltración.
- ❖ La producción continua de hidrógeno a partir de una mezcla de alimentos frescos elaborada con frutas, verduras, pan, carne y pescado, fue llevada a cabo en un reactor de mezcla completa (CSTR) de 25 L operando con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 3 días y bajo control del pH dentro del rango 5,0-6,0 unidades. La producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ) fue de  $45,5 \text{ H}_2/\text{kg SV}_{\text{alimentado}}$ .
- ❖ La adición de sobrenadante digerido a este reactor ocasionó una reducción del 36,6% en los requerimientos de alcalinidad necesarios para el control del pH y un descenso del 8,3% en la producción específica de hidrógeno.
- ❖ El efluente generado en el proceso de fermentación oscura fue digerido favorablemente en una segunda fase para la producción de metano, observando una producción específica media de metano (SMP) para el proceso global de  $590 \text{ L CH}_4/\text{kg SV}_{\text{alimentado}}$ , cuando el reactor de hidrógeno operó sin adición de sobrenadante digerido. La adición de sobrenadante digerido en el reactor de hidrógeno provocó una pequeña reducción de este parámetro hasta un valor de  $550 \text{ L CH}_4/\text{kg SV}_{\text{alimentado}}$ .

### ***8.3. Respecto al efecto del Tiempo de Retención Hidráulico en la producción de Hidrógeno y en la comunidad microbiana.***

- ❖ La producción de hidrógeno obtenida a partir de la fermentación de residuos de comida estuvo muy afectada por las modificaciones efectuadas

en el TRH (manteniendo constante la concentración de sólidos en la alimentación). La reducción sucesiva del TRH (entre 2 y 0,5 d) originó un aumento significativo del rendimiento volumétrico de hidrógeno ( $L_{H_2}/L_{\text{reactor}} \cdot d$ ) lo que conlleva un beneficio asociado al menor volumen del reactor necesario para obtener una determinada producción de hidrógeno. Sin embargo, esta reducción del TRH no fue favorable en términos de la utilización del sustrato provocando una reducción de la producción específica de hidrógeno ( $SH_2P$ ).

- ❖ El TRH influye en la población microbiana dominante en el reactor, así la reducción aplicada al TRH aumentó la diversidad de especies en el reactor. La reducción del TRH originó cambios en la comunidad microbiana desde un consorcio que contenía principalmente productores de hidrógeno (*Clostridium butyricum*) a otro que contenía productores de hidrógeno (*Clostridium butyricum* y *Clostridium acidisoli*) y consumidores de hidrógeno o no productores de hidrógeno, tales como bacterias productoras de ácido propiónico (*Selenomonas noxia*) y bacterias productoras de ácido acético (*Bifidobacterium thermacidophilum*). Por lo tanto, el TRH puede modificar la comunidad microbiana del reactor pudiendo afectar al rendimiento de hidrógeno

#### **8.4. Respecto a la producción de hidrógeno a partir de lactosuero.**

- ❖ Los pellets de biosólido y la microflora indígena contenida en el lactosuero pudo ser utilizada para producir hidrógeno sin necesidad de aplicar un pre-tratamiento al sustrato.
- ❖ La producción continua de hidrógeno a partir de lactosuero fue llevada a cabo satisfactoriamente resultando adecuada la metodología aplicada para activar la microflora productora de hidrógeno presente en el inóculo (pellets de biosólido) y en el propio sustrato (lactosuero). Dicha metodología estuvo basada en la aplicación inicial de un periodo de

operación en discontinuo de 48 horas de duración y caracterizado por el control del pH mediante la adición de un suplemento de alcalinidad.

- ❖ El aumento de la velocidad de carga orgánica (VCO) provocado por la modificación del TRH (entre 3 y 1 d) o por la modificación de la concentración de DQO de la alimentación (entre 40 y 63 g DQO/L), redujo ligeramente la producción específica de hidrógeno e incrementó la producción volumétrica de hidrógeno.



*ANEXOS*

---



## A.I. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS RECOGIDOS EN EL CAPÍTULO 4.

Tabla A.1. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los datos de producción acumulativa de gas (mL) obtenidos en los sistemas que trabajaron a un mismo pH y con diferente masa de inóculo (4 , 8 y 12 gramos).

pH = 5,0					
Masa de inóculo (g)	N	Media	Varianza	Desviación estándar	
4	2	393,5	84,5	9,19	
8	2	412,5	112,5	10,61	
12	2	402,5	40,5	6,36	
Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	2	361,3	180,7	2,28	0,250
Dentro grupos	3	237,5	79,2		
Total	5	598,8			
pH = 7,0					
Masa de inóculo (g)	N	Media	Varianza	Desviación estándar	
4	2	443,5	144,5	12,02	
8	2	417,5	144,5	12,02	
12	2	428,5	84,5	9,19	
Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	2	681	341	2,74	0,211
Dentro grupos	3	374	125		
Total	5	1055			

Tabla A.2. Resultados del ajuste de los datos experimentales de producción de hidrógeno a la ecuación de Romero (4.2).

pH = 5,0			
Parámetro	Valor	Error	R <sup>2</sup>
P <sub>máx</sub>	95,60	1,718	0,99585
μ <sub>máx</sub>	0,05224	0,00462	
pH = 7,0			
Parámetro	Valor	Error	R <sup>2</sup>
P <sub>máx</sub>	120,58	11,297	0,94384
μ <sub>máx</sub>	0,03460	0,0116	

Tabla A.3. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los datos de producción acumulativa de hidrógeno (mL) obtenidos en los sistemas que trabajaron a diferente pH.

pH	N	Media	Varianza	Desviación estándar	
5,0	3	101,86	125,83	11,22	
7,0	3	126,80	230,54	15,18	
Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	1	933	933	5,23	0,084
Dentro grupos	4	713	178		
Total	5	1645			

## A.II. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS RECOGIDOS EN EL CAPÍTULO 5.

Tabla A.4. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los datos de consumo diario de solución alcalina (mL/d) obtenidos en los sistemas WR, MR, MR-1, MR-2 y MR-3.

Consumo diario de solución alcalina					
Sistema	N	Media	Varianza	Desviación estándar	
WR	35	1,1714	0,2786	0,5278	
MR	35	0,8286	0,2050	0,4528	
MR-1	35	0,5857	0,1983	0,4453	
MR-2	35	0,5571	0,1731	0,4161	
MR-3	28	1,3214	0,1706	0,4131	
Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	4	15,196	3,799	18,39	0,000
Dentro grupos	163	33,679	0,207		
Total	167	48,875			

**Tabla A.5. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los datos de producción específica de hidrógeno (mL H<sub>2</sub>/ g SV alimentado) obtenidos en los sistemas WR, MR, MR-1, MR-2 y MR-3.**

Producción específica de hidrógeno					
Sistema	N	Media	Varianza	Desviación estándar	
WR	11	29,152	25,933	5,092	
MR	11	30,462	28,395	5,329	
MR-1	11	26,225	53,394	7,307	
MR-2	11	33,678	136,409	11,679	
MR-3	9	24,747	22,652	4,759	
Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	4	512,0	128,0	2,34	0,068
Dentro grupos	48	2622,5	54,6		
Total	52	3134,5			

**Tabla A.6. Resultados del test de separación de medias de Tukey para comparar entre que sistemas existen diferencias significativas en el consumo diario de solución alcalina (mL/d) a un nivel de significación del 95% ( $\alpha=0,05$ ).**

Consumo diario de solución alcalina			
Sistema	N	Media	Grupo
WR	35	1,1714	B
MR	35	0,8286	A
MR-1	35	0,5857	A
MR-2	35	0,5571	A
MR-3	28	1,3214	B

### A.III. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS RECOGIDOS EN EL CAPÍTULO 6.

Tabla A.7. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los rendimientos volumétricos de hidrógeno ( $L\ H_2/L_{\text{reactor}} \cdot d$ ) obtenidos para cada TRH.

Rendimientos volumétricos de hidrógeno					
TRH	N	Media	Varianza	Desviación estándar	
2	5	0,232	0,002	0,048	
1	5	0,418	0,009	0,097	
0,75	6	0,442	0,006	0,075	
0,5	5	0,594	0,011	0,107	
Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	3	0,33082	0,11027	15,55	0,000
Dentro grupos	17	0,12056	0,00709		
Total	20	0,45138			

Tabla A.8. Resultados del test de separación de medias de Tukey para comparar entre que TRH existen diferencias significativas en el rendimiento volumétrico de hidrógeno ( $H_2/L_{\text{reactor}} \cdot d$ ) a un nivel de significación del 95% ( $\alpha=0,05$ ).

Rendimientos volumétricos de hidrógeno			
TRH	N	Media	Grupo
2	5	0,232	A
1	5	0,418	B
0,75	6	0,442	B
0,5	5	0,594	C

#### A.IV. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS RECOGIDOS EN EL CAPÍTULO 7.

Tabla A.9. Resultados del análisis simple de la varianza (one-way ANOVA) aplicado a los rendimientos volumétricos de hidrógeno ( $L_{H_2}/L_{reactor} \cdot d$ ) obtenidos para cada TRH.

Rendimientos volumétricos de hidrógeno					
TRH	N	Media	Varianza	Desviación estándar	
3	13	0,3338	0,0173	0,1317	
2	6	0,4033	0,0053	0,0726	
1	3	0,9000	0,0103	0,1015	
Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	2	0,7393	0,3696	27,54	0,000
Dentro grupos	19	0,2550	0,0134		
Total	21	0,9943			

Tabla A.10. Resultados del test de separación de medias de Tukey para comparar entre que TRH existen diferencias significativas en el rendimiento volumétrico de hidrógeno ( $H_2/L_{reactor} \cdot d$ ) a un nivel de significación del 95% ( $\alpha=0,05$ ).

Rendimientos volumétricos de hidrógeno			
TRH	N	Media	Grupo
3	13	0,3338	A
2	6	0,4033	A
1	3	0,9000	B