



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

EFFECTO DE LA RADIACIÓN LUMINOSA, CONCENTRACIÓN DE METALES
TRAZA Y ESCALAMIENTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A
TRAVÉS DE FOTO BACTERIAS INMOVILIZADAS

TESIS,
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
ALDO ANDRÉS DÍAZ JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL
Dr. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ, INSTITUTO DE INGENIERIA

COMITÉ TUTOR
DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGOMEZ, FACULTAD DE INGENIERÍA
DRA. GABRIELA ELEONORA MOELLER CHÁVEZ

QUERÉTARO, QRO. NOVIEMBRE 2016

Jurado Asignado:

Presidente: Dra. Moeller Chávez Gabriela Eleonora

Secretario: Dra. Valdéz Vázquez Idania

1er Vocal: Dra. Morales Ibarría Marcia G.

2do Vocal: Dra. Fernández Villagómez Georgina

3er Vocal: Dr. Buitrón Méndez Germán

Lugar donde se realizó la tesis:

INSTITUTO DE INGENIERÍA, UNAM. Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, Unidad Académica del Instituto de Ingeniería. Campus UNAM Juriquilla, QRO

Tutor de Tesis:

Dr. Germán Buitrón Méndez

Firma

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el proyecto CONACYT Ciencia Básica 251718

Se extiende un agradecimiento a la M.C. Gloria Moreno Rodríguez, al Dr. Isaac Monroy Chora, al Dr. Alejandro Vargas y al M.C. Jaime Pérez Trevilla por la asistencia técnica y los análisis brindados en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, Instituto de Ingeniería, Querétaro, Qro.

Resumen

Esta tesis aborda el efecto de la radiación luminosa y de la concentración de hierro y molibdeno sobre la producción de hidrógeno por fotofermentación usando un consorcio inmovilizado de bacterias púrpura no del azufre (BPNS), así como el escalamiento del proceso fotofermentativo a un fotobiorreactor con iluminación solar de 3 L bajo condiciones ambientales (intemperie). La experimentación se realizó a escala laboratorio (0.135 - 0.5 L) y el escalamiento en un fotobiorreactor de 3 L bajo condiciones ambientales y luz solar, usándose agua residual sintética como medio de cultivo. La estrategia de experimentación se dividió en 3 etapas. En la primera etapa se evaluó el efecto de la radiación luminosa sobre la producción de hidrógeno en condiciones de laboratorio, para ello se emplearon 2 tipos de luz artificial suministradas por lámparas fluorescentes e incandescentes. La luz fluorescente se caracteriza por tener un espectro de luz eficiente en el rango visible (545, 587 y 610 nm) mientras que la incandescente se caracteriza por poseer un rango amplio dentro del rango visible e infrarrojo. Posteriormente, se evaluó el impacto de los metales traza, hierro y molibdeno, sobre la producción de hidrógeno también en condiciones de laboratorio; por último se realizó el escalamiento a un reactor de 3 L, para la evaluación de la producción de hidrógeno en condiciones ambientales de luz y temperatura. Dentro de la evaluación de la radiación luminosa se encontró que la luz incandescente al proveer un amplio rango de luz (300 a 900 nm) permitió un mejor rendimiento de producción de hidrógeno, obteniendo una tasa de producción de hidrógeno de 96 mL/L/d, a una intensidad de 125 W/m² mientras que con lámparas fluorescentes al tener picos de iluminación altos en el área visible de luz y carecer de radiación infrarroja no logró excitar el sistema de obtención de energía y produjo a una tasa de 48 mL/L/d con la misma intensidad. Con base en ello se evaluaron tres intensidades con lámparas incandescentes, (333,500 y 600 W/m²). Se obtuvo la máxima tasa de producción (480 mL/L/d) a 500 W/m². Sin embargo, al incrementar la intensidad a 606 W/m², se observó una inhibición de la producción de hidrógeno. Se encontró que la reducción de 2336 µg/L a 7 µg/L en la concentración de hierro y de 300 a 10 µg/L de molibdeno afectó de manera positiva y significativa la producción de hidrógeno. Bajo las mejores condiciones las tasas de producción de hidrógeno fueron 237.6 mL/L/d a 340 mL/L/d. Por último se evaluó la

producción de hidrógeno en condiciones ambientales (intemperie) con el diseño un prototipo de fotobiorreactor tubular, con un índice de superficie/volumen alto (106 m^{-1}) para permitir una mayor radiación de luz al sistema y favorecer la tasa de producción de hidrógeno. Bajo estas condiciones, se consiguió una tasa de producción de 337.68 mL/L/d.

Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 1 |
| 1. Introducción..... | 10 |
| 2. Objetivos y Alcance | 11 |
| 2.1. Objetivo general..... | 11 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 11 |
| 2.3. Hipótesis | 12 |
| 2.4. Alcances | 13 |
| 3. Antecedentes | 13 |
| La energía a partir de hidrógeno. | 13 |
| 3.1 Bacterias púrpura..... | 16 |
| 3.1.1 Las bacterias púrpura del azufre..... | 16 |
| 3.1.2. Bacterias púrpura no del azufre..... | 17 |
| 3.2. Fotofermentación | 18 |
| 3.3. Bacterioclorofilas | 19 |
| 3.4. Hidrogenasas y Nitrogenasas | 22 |
| 3.4.1. Nitrogenasas | 22 |
| 3.4.2. Hidrogenasas | 28 |
| 3.5. Sistemas de cultivo inmovilizados | 29 |
| 3.6. Diseño de fotobiorreactores..... | 32 |
| 4. Metodología..... | 38 |
| 4.1 Medios de crecimiento | 39 |
| 4.1.1 Medio basal | 39 |
| 4.1.2 Medio de crecimiento | 39 |
| 4.1.3 Medio de producción de hidrógeno | 39 |
| 4.1.4 Medio de producción modificado (reducción en concentración de Fe y Mo) | 39 |

| | |
|---|----|
| 4.2. Diseño y construcción de los fotobiorreactores escala laboratorio | 40 |
| 4.3. Evaluación del tipo de luz e intensidad en la producción de hidrógeno | 41 |
| 4.4 Evaluación del efecto de los metales traza en la producción de hidrógeno..... | 43 |
| 4.5 Diseño del fotobiorreactor piloto (3 L) | 46 |
| 4.6 Procedimientos Analíticos | 47 |
| 4.6.1 Determinación de la composición de biogás..... | 47 |
| 4.6.2 Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles..... | 48 |
| 4.6.3 Demanda química de oxígeno (DQO)..... | 48 |
| 4.6.4 Sólidos suspendidos totales..... | 48 |
| 4.6.5 Determinación de proteína celular | 49 |
| 4.6.6 Determinación de espectro de luz | 49 |
| 5. Resultados y discusión | 50 |
| 5.1. Evaluación del tipo de luz e intensidad en la producción de hidrógeno | 50 |
| 5.1.1 Colonización del soporte | 50 |
| 5.1.2 Evaluación de la fuente de luz e intensidad luminosa sobre la producción de hidrógeno en reactores escala laboratorio | 51 |
| 5.2 Evaluación del efecto de los metales hierro y molibdeno sobre producción de hidrógeno | 57 |
| 5.3 Evaluación del desempeño del fotobiorreactor piloto en condiciones ambientales para la producción de hidrógeno | 65 |
| 6. Conclusiones | 75 |
| Recomendaciones para la continuidad del estudio | 76 |
| Productos generados | 77 |
| Referencias Bibliográficas | 78 |
| Anexos..... | 84 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Combustibles y su capacidad calorífica | 14 |
| Tabla 2. Ventajas de la producción de biohidrógeno frente a la producción convencional | 15 |
| Tabla 3. Tabla de Absorción de las Bacterioclorofilas | 20 |
| Tabla 4. Concentración de Fe y Mo en medio de cultivo de algunas investigaciones relacionadas a la fotofermentación | 24 |
| Tabla 5. Genes codificantes de enzimas nitrogenasas en la cepa Rhodobacter capsulatus SB 1003 | 26 |
| Tabla 5. Comparación de la producción de hidrógeno usando diferentes materiales de soporte | 30 |
| Tabla 6. Índice superficie/volumen | 33 |
| Tabla 7. Tipos de fotobiorreactores..... | 35 |
| Tabla 8. Modelos para el crecimiento específico dependientes de luz..... | 37 |
| Tabla 9. Condiciones de operación en lote del fotobiorreactor piloto | 42 |
| Tabla 10. Matriz del diseño experimental para análisis de la relación metales traza- Producción de hidrógeno | 43 |
| Tabla 11. Condiciones de operación para el análisis de la relación metales traza- producción de hidrógeno | 44 |
| Tabla 14. Comparación de tasas de producción y producción total | 52 |
| Tabla 15. Producción de hidrógeno en diferentes estudios utilizando BPNA inmovilizadas | 53 |
| Tabla 16. Análisis de varianza del efecto de los metales sobre la producción hidrógeno .. | 58 |
| Tabla 17. Tasas de producción por tratamiento utilizando el modelo de Gompertz | 60 |
| Tabla 18. Promedio de producción de mL de biogás por tratamiento y porcentaje promedio de hidrógeno por tratamiento | 62 |
| Tabla 19. Comparación del Índice S/V del FBR piloto frente a otras investigaciones..... | 66 |
| Tabla 20. Condiciones de operación y medición | 67 |
| Tabla 21. Ajuste de Gompertz de las tasas de producción por fotoperiodo | 71 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Categorías de la producción de biohidrógeno | 15 |
| Figura 2 Modelo del complejo de cosecha de luz en BPNA Fuente : Adaptada de Niederman, 2013 | 18 |
| Figura 3. Estratificación de microorganismos y Luz en cuerpos de agua | 20 |
| Figura 4. Rangos de absorción de las Bacterioclorofilas | 20 |
| Figura 5. Sistema de recolección de energía. | 21 |
| Figura 6. Parentesco entre clorofilas y bacterioclorofilas..... | 22 |
| Figura 7. Proceso de fijación de nitrógeno y expresión génica de las nitrogenasas | 27 |
| Figura 8. Biomasa expresada como mg de sólidos volátiles obtenidos en los diferentes soportes: Estropajo, varillas acrilico y cilindros de PE | 30 |
| Figura 16. Consorcio microbiano fotofermentativo | 31 |
| Figura 9. Escala de reactores | 32 |
| Figura 10. Mapas de iluminación en un fotobiorreactor tubular, Izq. Reactor sin ajuste de iluminación interna. Der. Reactor con ajuste de iluminación interna..... | 34 |
| Figura 11. Ejemplo de un fotobiorreactor..... | 34 |
| Figura 12. Metodología en diagrama de bloques..... | 38 |
| Figura 13. Tubo fotobiorreactor escala laboratorio (vista horizontal). La recuperación del biogás se realizó por la salida de 4mm | 40 |
| Figura 14. Muestra de uniones del tubo pyrex con coples PVC..... | 40 |
| Figura 15. Fotobiorreactores tubulares. Izq. Reactor solar escala laboratorio. Der. Reactor piloto laboratorio | 41 |
| Figura 17. Foto de los Reactores Fluorescente (izq.) e Incandescente (der.). Experimento de tipo de luz e intensidad | 42 |
| Figura 18. Fracción (1/4) de las botellas con diferentes concentraciones de metales traza en medio productor | 44 |
| Figura 19. Jeringa con reducciones neumáticas..... | 45 |
| Figura 20. Esquema del Fotobiorreactor piloto para condiciones ambientales (intemperie). Consta de 4 tubos de vidrio pyrex, bomba de alimentación y recirculación y 3 puntos de medición..... | 47 |
| Figura 21. lufa iniciando la colonización | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 22. lufa en proceso de colonización | 50 |
| Figura 23. Fibras de lufa en proceso de colonización | 50 |
| Figura 24. lufa densamente poblado | 50 |
| Figura 25. Producción acumulada de hidrógeno con 2 tipos de luz, Fluorescente (azul) e Incandescente (púrpura)..... | 51 |
| Figura 26. Variación de la producción de hidrógeno con intensidad luminosa (125, 333, 500 y 606 W/m ²) | 52 |
| Figura 27. Espectro de luz de lámparas fluorescentes utilizadas | 54 |
| Figura 28. Espectro de luz de lámparas incandescentes utilizadas en 4 voltajes diferentes | 54 |
| Figura 29. Acercamiento al espectro de 64 y 40 Volts | 55 |
| Figura 30. Pico de absorción de la Bacterioclorofila a (Bcha) | 55 |
| Figura 31. Generación de hidrógeno en cultivos altamente radiados. | 56 |
| Figura 32. Producción acumulada de hidrógeno por tratamiento. Experimento metales- producción..... | 57 |
| Figura 33. Diagrama de pareto para el efecto estandarizado de los metales en la producción de hidrógeno | 59 |
| Figura 34. Superficie de Respuesta para la producción de hidrógeno y el efecto otorgado por la concentración de metales traza. | 59 |
| Figura 35. Tasa de producción de hidrógeno por tratamiento calculadas con la ecuación de Gompertz..... | 60 |
| Figura 36. Concentración de sólidos suspendidos en los diferentes tratamientos (Fe y Mo). La mayor concentración se encontró en el tratamiento que contuvo 2366 µg/L de hierro y 10 µg/L de molibdeno | 61 |
| Figura 37. Porcentaje de consumo de ácidos grasos volátiles (AGV) por tratamiento | 61 |
| Figura 38. Tasas de producción de hidrógeno (gris), Concentración de hierro (azul) y molibdeno (naranja) de los diferentes tratamientos | 62 |
| Figura 39. Conceptualización gráfica del genoma de Rhodopseudomonas palutris donde se resaltan sus metabolismos y proteínas características. | 64 |
| Figura 40. Operon para la regulación de las nitrogenasas. anfA corresponde al gen para la hierro-nitrogenasas. mop corresponde al gen para la molibdeno-nitrogenasa | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 41. Reacciones ilustradas de las 3 diferentes nitrogenasas - Metaloproteínas de Fe, Mo, V | 65 |
| Figura 42. Fotobiorreactor piloto utilizado para evaluar el desempeño de la producción de hidrógeno en condiciones ambientales. | 67 |
| Figura 43. Cambio de pH en el periodo de inmovilización coincidió con la presencia de microalgas en el cultivo..... | 68 |
| Figura 44. Cultivo en producción sin contaminación (izq.). Inspección por microscopia de cultivo contaminado (central). Cultivo contaminado por microalgas (der.) | 69 |
| Figura 45. Fragmento del periodo de colonización en enero- febrero (80 h) donde se observa el cambio de temperatura y pH tras remover el control de temperatura a las 60 h (azul)..... | 70 |
| Figura 46. Cinética de producción de hidrógeno en reactor piloto bajo condiciones ambientales (marzo-abril) | 70 |
| Figura 47. Comportamiento del pH y temperatura en los días 10-14 de marzo. Con estabilidad 7.5 | 71 |
| Figura 48. Comportamiento del pH y temperatura del cultivo en los días 24-27 de marzo. El pH se elevó a un valor de 9 y se observó proliferación de microalgas | 72 |
| Figura 49. Comparación de las tasas de producción de hidrógeno (TPH) de los reactores escala laboratorio vs el reactor piloto (solar)..... | 73 |
| Figura 50. Comparación de los 3 estudios, reactores escala laboratorio FBR a diferentes intensidades, los tratamientos en botellas y el reactor piloto (solar) además de otras investigaciones. | 74 |

Índice de Ecuaciones

| | |
|---|----|
| Ecuación 1. Producción de hidrógeno en presencia de dinitrógeno | 22 |
| Ecuación 2. Producción de hidrógeno en ausencia de dinitrógeno | 22 |
| Ecuación 3. Actividad de la deshidrogenasa | 28 |
| Ecuación 4. Índice Superficie / Volumen..... | 36 |
| Ecuación 5. Ecuación de Gompertz utilizada para la descripción de la producción acumulada de biogás | 45 |
| Ecuación 6. Producción de hidrógeno y concentración de metales traza. Donde H: Producción de hidrógeno y Hmax: 3944.99 | 58 |

1. Introducción

Durante los últimos años el consumo de combustibles fósiles ha ido en aumento, comienza a escasear la explotación de petróleo a bajas profundidades y se ha retomado la iniciativa de buscar fuentes de energía alterna. Es de conocimiento general que existen energías verdes como la energía eólica, hidrotérmica, hidroeléctrica, solar, fotovoltaica entre otras; sin embargo la mayoría de estas energías tienen el inconveniente de depender del emplazamiento y ambiente donde se encuentre o instale la fuente proveedora, puesto que no en todos los lugares del planeta se pueden utilizar eficientemente, en relación, costo-beneficio; Las celdas fotovoltaicas son un ejemplo. Bajo la premisa que las energías renovables dependen de área geográfica para su aplicación es que se retoman los procesos de fermentación de compuestos biodegradables para producir biocombustibles gaseosos, los cuales a su vez serán utilizados para su combustión, uso y producción de energía, o en algunos casos almacenamiento.

El hidrógeno al ser un vector energético y poseer una gran energía en su combustión y no generar gases de efecto invernadero se presenta como una fuerte alternativa energética para el futuro. Se han propuesto los procesos biológicos fermentativos para la producción de hidrógeno y metano, que se clasifican en procesos de fermentación oscura y los procesos de fermentación luminosa o también conocidos como procesos de fotofermentación. En los procesos de fermentación oscura se han logrado altos rendimientos de producción de biogás que incluyen gases como metano e hidrógeno principalmente, sin embargo la fermentación oscura reduce la carga orgánica sólo un 10-15% y deja materia orgánica aprovechable para otros bioprocesos, de aquí se desprende la posibilidad de acoplar la fotofermentación a la fermentación oscura ya que el efluente de la fermentación oscura contiene ácidos grasos útiles para la fotofermentación además de que dicho acoplamiento reduciría la carga orgánica de estas aguas, solucionando dos problemas, la producción de energía a través de vectores energéticos, hidrógeno y metano, y el tratamiento de aguas residuales ricas en compuestos de carbono como los ácidos grasos de cadena corta. En esta tesis se explora el proceso de la fotofermentación y su potencial.

2. Objetivos y Alcance

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la radiación luminosa, la concentración de metales traza y escalamiento sobre la producción de hidrógeno a partir de ácido acético, propiónico y butírico utilizando un consorcio inmovilizado de fotobacterias púrpuras no del azufre

2.2. Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto de la luz fluorescente e incandescente a diferentes intensidades a través de la medición de la producción de hidrógeno en reactores escala laboratorio
- 2) Evaluar el efecto de la concentración de hierro y molibdeno a través sobre la producción de hidrógeno planteando un diseño estadístico de experimentos
- 3) Diseñar y construir un fotobiorreactor solar escala piloto con un índice superficie/volumen alto
- 4) Evaluar el desempeño del fotobiorreactor piloto en condiciones ambientales en función de la producción de hidrógeno

2.3. Hipótesis

Para la realización de este trabajo de investigación se plantearon 3 diferentes hipótesis, en función de los objetivos

Evaluación del efecto de la radiación luminosa en la producción de hidrógeno

1. La producción de hidrógeno es mayor en los cultivos fotofermentativos con bacterias púrpura no del azufre al incrementar la intensidad luminosa.
2. La producción de hidrógeno es mayor en cultivo con radiación luminosa de lámparas fluorescentes (con picos luminosos en 545, 590 y 610 nm) que con radiación luminosa de lámparas incandescentes (300 a 900 nm), por estimular adecuadamente el sistema recolector de luz.

2. Evaluar el efecto de la concentración de metales traza en la producción de hidrógeno

1. El incremento de metales traza en el medio de cultivo permitirá un mayor desempeño en la producción de hidrógeno por proveer los metales necesarios para la producción de las metaloproteínas.

3. Evaluación del desempeño del fotobiorreactor piloto en condiciones ambientales (intemperie) para la producción de hidrógeno

1. Un diseño tubular de un fotobiorreactor con bacterias fotofermentativas inmovilizadas con un índice superficie/volumen alto permite tasas de producción de hidrógeno similares a las encontradas en ambientes controlado, ya que permitirá una alta recolección de luz logrando estimular el sistema productor de hidrógeno

2.4. Alcances

Para cumplir con los objetivos planteados en este proyecto de investigación, se diseñará un reactor tubular de escala laboratorio (0.5 L), en el cual se empleará el consorcio bacteriano caracterizado anteriormente por Guevara-López y Buitrón (2015), constituido principalmente por *Rhodopseudomonas palustris*. Se utilizará agua residual sintética que contiene una mezcla de ácidos grasos volátiles (butírico, propiónico y acético), y se determinarán las mejores condiciones luminosas para la producción de hidrógeno.

Posteriormente se utilizará el consorcio microbiano en pruebas de laboratorio, en botellas para realizar la investigación del efecto de los metales hierro y molibdeno en concentraciones traza sobre la producción de hidrógeno. Por último se escalará el sistema a un reactor piloto (3 L) para evaluar su desempeño en la producción de hidrógeno en condiciones ambientales. Para realizar el monitoreo se analizará la composición del biogás producido por medio de cromatografía de gases y la cuantificación del volumen producido de biogás se realizará por desplazamiento de agua, se analizará el consumo de ácidos grasos volátiles (AGV) por medio de cromatografía y el crecimiento se determinará por medio de sólidos suspendidos volátiles (SSV).

3. Antecedentes

Se ha realizado un esfuerzo significativo para desarrollar biocombustibles como complemento de los combustibles fósiles no renovables. Entre los más atractivos está el hidrógeno por su alta eficiencia energética. Existen también una gran variedad de tecnologías para la producción biológica de hidrógeno. Sin embargo, entre las mejores opciones se encuentra en la fotofermentación, por la capacidad de producir hidrógeno y lograr una remoción de carga orgánica superior al 90%, siendo una alternativa efectiva para el tratamiento de aguas residuales (Hallenbeck y Ghosh 2009).

La energía a partir de hidrógeno.

La energía a partir de hidrógeno se considera como renovable. En los últimos años los diferentes grupos de investigación de todo el mundo han enfocado su atención en el hidrógeno por considerarse una alternativa eficiente y limpia, ya que sólo se genera CO₂ en su producción y no en la combustión (Kargi y Argun 2011). En comparación con otros combustibles, el hidrógeno presenta una mayor capacidad calorífica (Tabla 1)

Tabla 1. Combustibles y su capacidad calorífica

| Tipo de combustible | Estructura química | Contenido de carbón (%) | Fuente de obtención | Energía por unidad de masa (J/Kg) | Emisiones Carbón (KgC/kg combustible) |
|---------------------|---|-------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Hidrógeno | H ₂ | 0 | Gas natural, metanol, electrolisis de agua | 141.90 | 0.00 |
| Etanol | C ₂ H ₅ OH | 52 | Maíz, Granos, Celulosa | 29.90 | 0.50 |
| Biodiesel | Metil-esteres de C ₁₂ a C ₂₂ de ácidos grasos | 77 | Grasas y aceites | 37.00 | 0.50 |
| Metanol | CH ₃ OH | 37.5 | Gas natural, carbón, biomasa leñosa | 22.30 | 0.50 |
| Gas natural | CH ₄ | 75 | Reservas subterráneas | 50.00 | 0.46 |
| Gasolina | C ₄ a C ₁₂ | 74 | Crudo | 47.40 | 0.86 |

(Debabrata Das, Namita Khanna, y Chitralkha Nag Dasgupta 2014)

De la producción global de hidrógeno, el 48% proviene de la reformación de gas metano, 30% por reformación de naftas, 18% gasificación y 4% por electrólisis de agua (Baghchehsaraee et al. 2010). Esto implica que el 96% del hidrógeno aún se obtiene a partir del procesamiento de compuestos fósiles. Sin embargo, ya que para su obtención se genera una cantidad considerable de gases de efecto invernadero. La razón principal por la que todavía se genere a partir de estas vías es porque las alternativas biológicas todavía no son capaces de cubrir la demanda actual para competir con los procesos convencionales. Los procesos de producción de hidrógeno más utilizados y estudiados hasta ahora son: i) Los procesos térmicos que utilizan oxidación parcial (POx) o gasificación, ii) los procesos electrolíticos que utilizan agua y una corriente eléctrica para separar la molécula del oxígeno e hidrógeno y iii) los procesos fermentativos que consisten en la generación de hidrógeno a partir de residuos con el uso de microorganismos capaces de fermentar la materia orgánica, tales como algunas microalgas, bacterias y fotobacterias (Debabrata Das, Namita Khanna, y Chitralkha Nag Dasgupta 2014). La producción de hidrógeno por

fermentación tiene una serie de ventajas, una de ellas es que permite manipular las variables mostradas en la Tabla 2 dependiendo del microorganismo que se utilice.

Los procesos biológicos presentan muchas ventajas en comparación a los procesos tradicionales (Tabla 2). Sin embargo estos procesos presentan varios retos y desventajas que deben ser atendidas para competir con la rapidez de producción requerida. Los procesos de producción de biohidrógeno se dividen en 2 grandes categorías, fermentación y biofotólisis (Figura 1).

Tabla 2. Ventajas de la producción de biohidrógeno frente a la producción convencional

| Ventajas del biohidrógeno | Razón |
|---------------------------|--|
| Versatilidad | Puede ser producido por medio de sustratos de diferente naturaleza, como aguas residuales |
| Sustentabilidad | Debido a que el agua residual puede ser su alimento y se encuentra en grandes cantidades . |
| Costo | Es un proceso mucho menos costoso que los métodos fósiles |
| Eficiencia | La combustión en automobiles presenta 50% mayor eficiencia que la gasolina. |

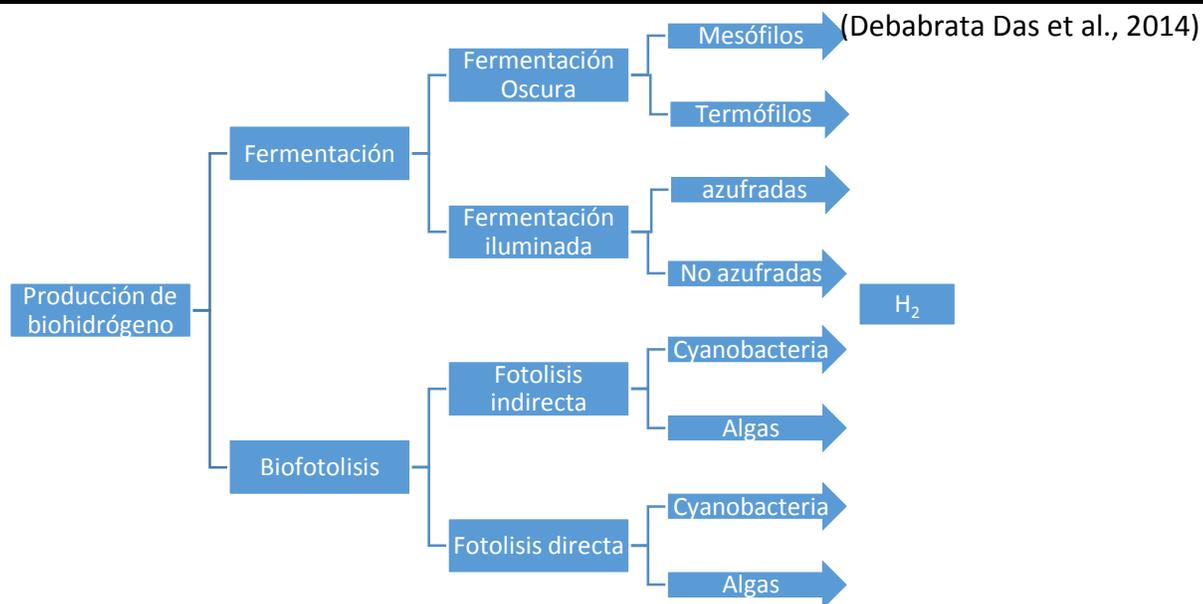


Figura 1. Categorías de la producción de biohidrógeno
Fuente: (Debabrata Das, Namita Khanna, y Chitralekha Nag Dasgupta 2014)

Según Debabrata Das, 2014 para poder afrontar los retos que presentan los sistemas biológicos, se deben hacer esfuerzos dedicados a superar los cuellos de botella que se han detectado. Entre los más importantes están:

1. La producción de hidrógeno de cualquiera de los procesos biológicos está por debajo de la necesaria para una aplicación comercial. Las rutas de la producción de hidrógeno no han sido totalmente identificadas y la reacción permanece energéticamente desfavorable
2. No hay un microorganismo identificado con la capacidad de ser metabólicamente modificado para producir más de 4mL H₂/mol de glucosa, lo cual permitiría acercarse a un proceso energéticamente favorable
3. Los diseños de biorreactores aún no están en un punto de escalamiento industrial ya que son difíciles de operar, alimentar, aclimatar y recuperar gases a largo plazo.

Las investigaciones se han dirigido principalmente a los procesos fermentativos, la fermentación oscura ya presenta altas producciones hidrógeno y debido a que el efluente de ésta puede usarse como sustrato en el proceso fotofermentativo se ha intentado realizar este acoplamiento. El proceso fotofermentativo se puede realizar por varios microorganismos entre los que sobresalen las bacterias púrpura del azufre y no del azufre (Debabrata Das, Namita Khanna, y Chitralekha Nag Dasgupta 2014).

3.1 Bacterias púrpura

3.1.1 Las bacterias púrpura del azufre

Las bacterias púrpura del azufre son un grupo de proteobacterias anaerobias, y son encontradas normalmente en fuentes de agua calientes, en sitios oscuros y algunas especies presentan actividad quimiolitotróficas y/o quimioorganoheterotróficas las cuales pueden crecer en presencia de oxígeno. La evolución hacia la producción de H₂ se desarrolló a la par de su capacidad para usar compuestos sulfurosos en lugar de oxígeno. Los electrones en esta ruta metabólica se transfieren hacia la nitrogenasa utilizando ferredoxina y ATP (Veziroglu 2012). Tienen la capacidad de fijar N₂ en amonio y es de suma importancia

medir las concentraciones de amonio ya que bajo la inanición de nitrógeno la mayoría de las bacterias son capaces de producir hidrógeno.

3.1.2. Bacterias púrpura no del azufre

Las bacterias púrpuras no del azufre han sido estudiadas por su capacidad de producción de hidrógeno. Tienen la propiedad de una respiración anaerobia en crecimiento fotoautotrófico. La producción de hidrógeno no se presencia en medio aerobio ya que el oxígeno actúa como aceptor de electrones en lugar de protones. En el proceso fotofermentativo las bacterias tienen la capacidad de utilizar ácidos grasos volátiles (AGV) como donadores de electrones y utilizando la energía luminosa del sol o alguna fuente de iluminación artificial. Esto presenta la posibilidad de utilizar el efluente de la fermentación oscura que produce H₂ para seguir produciéndolo en mayor cantidad en un proceso acoplado, así como reducir la DQO que la fermentación oscura no ha sido capaz de degradar. De esta forma, se tendría un sistema no sólo de tratamiento de aguas sino una alternativa de producción de biocombustibles (Basak et al. 2014; Basak y Das 2007; Wu et al. 2012).

Existen varias bacterias púrpura no del azufre (BPNA) que participan en la producción de hidrógeno por medio de fotofermentación como, *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001, *Rhodobacter sphaeroides* RV, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sulfidophilus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum* etc. Entre ellas, *R. sphaeroides* permanece como una de las bacterias más prometedoras en cuanto a la producción de hidrógeno. La producción de hidrógeno se lleva a cabo en un amplio espectro de luz, se han reportado longitudes de onda entre 522-860 nm. La absorción de la luz se lleva a cabo en la membrana celular en el complejo cosechador de luz que utiliza bacterioclorofilas (Figura 2), posteriormente los fotones captados aumentan el estado energético de los electrones que pasan a una piscina de quinonas y permite generar un gradiente en el centro de reacción y así obtener energía a través de la luz. En el centro de reacción de las bacterias están presentes 2 tipos de enzimas, las nitrogenasas e hidrogenasas las cuales están activas en condiciones anaerobias (Niederman 2013; Wu et al. 2012).

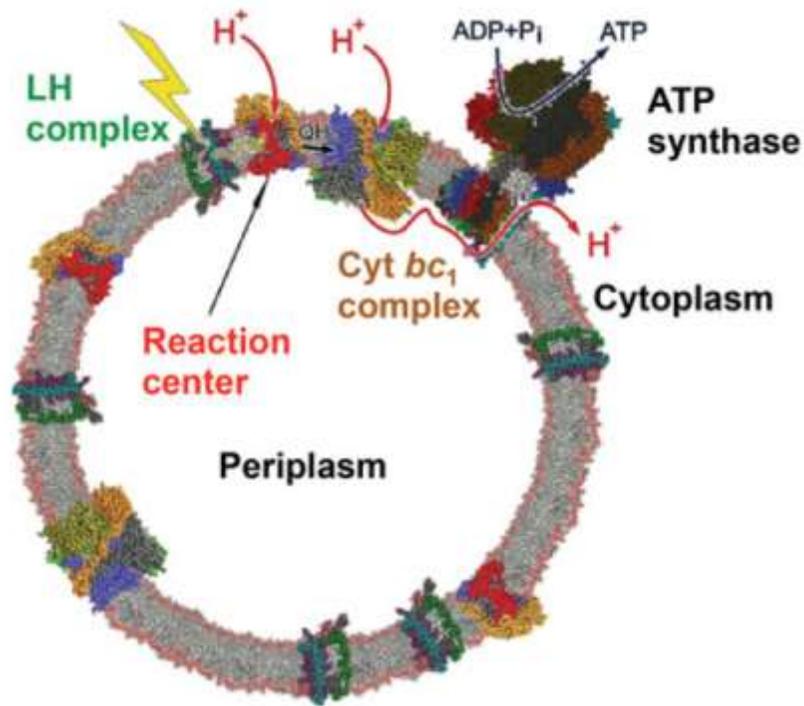


Figura 2 Modelo del complejo de cosecha de luz en BPNA
Fuente : Adaptada de Niederman, 2013

En inanición o falta de nitrógeno se observa la capacidad de formar hidrógeno. Otra ventaja de éstas bacterias fotofermentativas es la capacidad de utilizar aguas residuales como fuente de carbono bajo procesos fotofermentativos (Wu et al. 2012).

3.2. Fotofermentación

La fotofermentación consiste en utilizar bacterias que son capaces de emplear luz como fuente de energía para iniciar procesos metabólicos como la producción de hidrógeno. El proceso fue estudiado por primera vez en 1977 (Benemann 1977) donde se evidenció la capacidad de algunos microorganismos para separar el agua en sus dos elementos. Los grupos de bacterias se separaron en bacterias verdes y púrpura. Las bacterias púrpura como ya se ha descrito anteriormente, se dividieron –del azufre- y –no del azufre- (sulfur y non sulfur) mientras que las verdes se dividieron en –no del azufre- y –deslizantes- (gliders). Estos grupos de bacterias evolucionaron con maquinarias capaces de utilizar luz y convertirla en energía química por medio de fotofosforilación. Las bacterias púrpuras, contienen un fotosistema llamado PSII como sistema de reacción central, el cual es incapaz de reducir la ferredoxina pero puede generar ATP por medio de un flujo cíclico de

electrones. La bacterioclorofila una vez reducida es excitada y libera electrones que reducen la bacteriofeofitina (BPH). Una vez reducida la Bph, reduce varias quinonas (Q), para finalmente tener un abasto de electrones que son transportados del suministro de quinonas a través de una serie de proteínas hierro-azufradas (FeS) y citocromos (Cyt) de regreso la reacción central, donde el citocromo bC_1 interactúa con el suministro de quinonas durante el flujo fotosintético de electrones como un motor de fuerza protónica usado para la derivación de ATP y su síntesis (CRD Lancaster 2013; Michel y Deisenhofer 1988; Chochois et al. 2010).

La capacidad de estas bacterias se acerca mucho a la reacción teórica, lo que nos advierte de una eficiencia biológica sin embargo debe estar en condiciones adecuadas para su crecimiento. La importancia de la producción de biohidrógeno reside en utilizar un cultivo que no se encuentren en fase de crecimiento. La reacción es catalizada por una enzima dependiente de ATP capaz de reducir protones a hidrógeno molecular. Dentro de las investigaciones algunas de ellas se centran en la optimización de procesos en cuanto a ciclos de luz, ya que mantener lámparas encendidas 24 h representa un alto costo energético y monetario. Uno de los descubrimientos en las investigaciones dirigidas por Ela Eroglu, advierte que si bien no hay diferencia significativa en la tasa de producción del biohidrógeno en los ciclos continuos o periodos luz/oscuridad 12/12, el periodo de crecimiento es retardado en los ciclos 12/12 (Eroglu et al. 2010; Adessi y De Philippis 2014)

3.3. Bacterioclorofilas

Las bacterioclorofilas son pigmentos encontrados en las bacterias fotosintéticas, la diferencia principal radica en que las (Bchl f) no producen oxígeno y utilizan longitudes de onda para la fotosíntesis que no son aprovechadas por las plantas o microalgas ni cianobacterias (Figura 3). Sus rangos de absorción van desde los 600 a 900 nm, existen 5 Bchl f conocidas que fueron definidas como Bchl a , b , c , d y e . La Figura 3 representa los rangos de absorción eluidos en una columna HPLC C_{18} con un solvente que contenía metanol, acetonitrilo, etil acetato y agua en diferentes proporciones (Frigaard, Larsen, y Cox 1996)



Figura 3. Estratificación de microorganismos y Luz en cuerpos de agua
Fuente : (Anón. 2016)

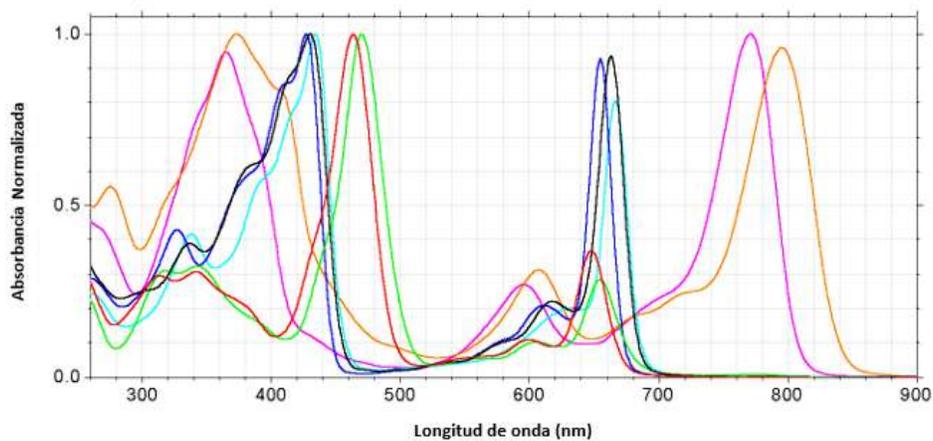


Figura 4. Rangos de absorción de las Bacterioclorofilas

Tabla 3. Tabla de Absorción de las Bacterioclorofilas

| Pigmento | <u>Chl a</u> | <u>Chl b</u> | <u>BChl a</u> | <u>BChl b</u> | <u>BChl c</u> | <u>BChl d</u> | <u>BChl e</u> |
|---|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Color en la gráfica | Negro | rojo | magenta | naranja | cyan | Azul | verde |
| Absorción máxima (nm) | 430, 663 | 463, 648 | 364, 770 | 373, 795 | 434,666 | 427,655 | 469, 654 |
| Absorción máxima (nm) correspondiente a feofitina (nm) | 408, 664 | ND | 357, 746 | 367, 776 | 412, 666 | 406, 657 | 435, 665 |

Se pueden observar en todos los pigmentos dos picos de absorción (Tabla 3). El primer pico en cada pigmento corresponde a los compuestos carotenos, mientras que el segundo pico

corresponde a la longitud de onda de absorción máxima para el centro de reacción. En el caso de las Bacterioclorofilas, todos están por encima de los 600 nm (Figura 4). Por lo que la luz provista debe estar en el rango de 600 a 900nm para obtener su mayor aprovechamiento y producción de hidrógeno.

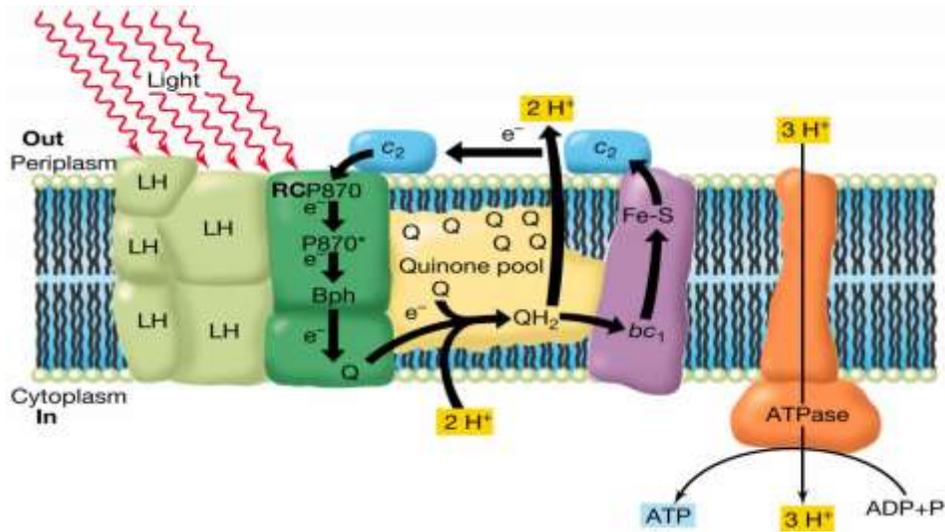


Figura 5. Sistema de recolección de energía.

La captura energía luminosa se realiza con el compuesto de cosechador de luz (LH, Light Harvesting complex) que permite llevar a cabo las reacciones necesarias en el centro de reacción (RC, Reaction Center) que genera un flujo de electrones en una alberca de quinonas (Quinone pool. Posteriormente el flujo de electrones pasa por el complejo Bc1 y a la ATPsintasa que produce ATP con el flujo de protones

Fuente : Adaptada de (Frigaard, Larsen, y Cox 1996)

Las Bacterioclorofilas poseen una enorme similitud con las clorofilas, por lo que se pudo identificar rápidamente su función, como ya se ha explicado anteriormente, las Bacterioclorofilas realizan su actividad en el complejo LH.

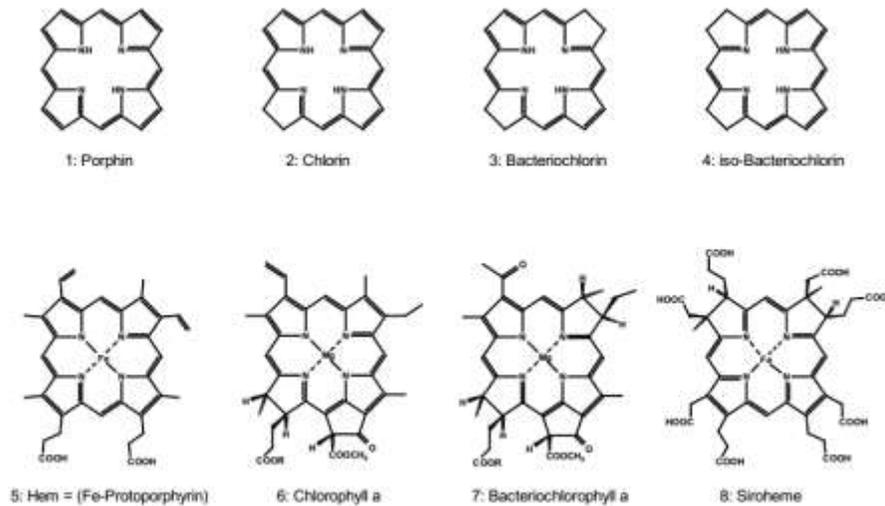
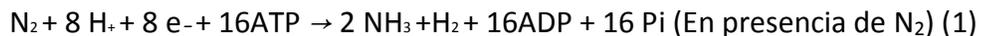


Figura 6. Parentesco entre clorofilas y bacterioclorofilas

3.4. Hidrogenasas y Nitrogenasas

3.4.1. Nitrogenasas

Para analizar el metabolismo productor de hidrógeno hay que considerar a las hidrogenasas y las nitrogenasas. Estas enzimas son altamente susceptibles a la presencia de oxígeno para mantener una actividad productora de hidrógeno por lo que es necesario mantener un medio anaerobio para conseguir una actividad enzimática óptima (Fernando A.Lopes Pinto, Peter Lindblad, y Olga Troshina 2002). El hidrógeno se produce al fijar el N_2 a NH_3 por medio de la reacción:



Producción de hidrógeno en presencia de dinitrógeno



Producción de hidrógeno en ausencia de dinitrógeno

Debido a que la operación eficiente de la nitrogenasa requiere grandes cantidades de ATP y poder de reducción, la actividad y síntesis depende de varios factores regulatorios. En primer lugar como ya se mencionó está el oxígeno y en segundo lugar se encuentra la

concentración de amonio, ya que la enzima nitrogenasa se encarga de fijar el nitrógeno molecular al hallar una concentración alta de esta sal, inhibiendo la producción de la enzima y por lo tanto reduciendo la actividad metabólica (Koku et al. 2002). Concentraciones tan bajas como 20 μ M han logrado inhibir rápidamente las nitrogenasas activas existentes en *R. Sphaeroides*. Cabe resaltar que la inhibición se prolonga hasta los compuestos nitrogenados no provenientes del amonio y que la inhibición permanece hasta que el nitrógeno es consumido, siendo algunos ejemplos de otras fuentes de nitrógeno, el lactato y el glutamato (Koku et al. 2002).

El nitrógeno molecular es el sustrato natural de la nitrogenasa que, inhibe la producción de hidrógeno y concentra su actividad a la fijación (). La síntesis de nitrogenasa está fuertemente estimulada por la luz, resultando en una gran producción de esta enzima en sistemas continuamente iluminados. El mecanismo de regulación incluye una inactivación reversible por la unión de la proteína-Fe tras la liberación de una de sus subunidades (Yves Jouanneau, Blandine Wong, y Paulette M. Vignais 1985). En trabajos previos se ha demostrado que la estimulación de la actividad enzimática se debe a la iluminación de novo así como a la activación de la nitrogenasa por la reestructuración de la proteína-Fe. Se puede alcanzar un 40% de las proteínas totales dentro de los microorganismos fotosintéticos tras altas tasas de radiación, siendo entonces la concentración de la nitrogenasa dependiente de la luz. Es conocido ya que la actividad de la nitrogenasa con molibdeno es hasta 9 veces menor que la nitrogenasa con núcleo de hierro. Sin embargo, esta nitrogenasa ha sido muy poco estudiada y se ha buscado principalmente evitar su inhibición para tener dos nitrogenasas activas y así generar un flujo mayor de biogás (Yang et al. 2015)

La producción de hidrógeno es un metabolismo relacionado a la fijación de nitrógeno (Figura 7), compuesto útil para las bacterias y para la producción de nuevas enzimas. La cantidad de genes variantes (Tabla 5) demuestra la viabilidad de este metabolismo anaerobio ya que no depende de una sola nitrogenasa, pues como se puede observar hay nitrogenasas de por lo menos 2 metales, hierro y molibdeno, y en recientes investigaciones se muestra la actividad de una tercera nitrogenasa de zinc (Burns y Hardy 2012).

En otras investigaciones relacionadas a la producción de hidrógeno por bacterias púrpuras no del azufre podemos identificar gran variabilidad en los medios de cultivo, en cuanto a la cantidad de metales traza. La mayoría de los medios de cultivo utilizan hierro y molibdeno además de otros metales (Tabla 4), como el estaño. Sin embargo, para el estudio de las hidrogenasas y nitrogenasas se propone realizar estudios únicamente realizando variaciones en las concentraciones de hierro y molibdeno, metales que se encuentran en el centro de reacción de éstas enzimas y que según las propuestas hasta el momento, son esenciales para maximizar o minimizar la actividad de ellas.

Tabla 4. Concentración de Fe y Mo en medio de cultivo de algunas investigaciones relacionadas a la fotofermentación

| Tipo de FBR | Organismo | Fuente de luz e intensidad | Volumen útil (l) | Compuesto de molibdeno | Mo (µg/L) | Compuesto de Fe | Fe (µg/L) | TPH (mL/L/d) | Referencia |
|-------------------------|------------------------|--|------------------|--|-----------|--|-----------|--------------|-----------------------|
| Tubular | <i>Consortio</i> | 333.33 w m ⁻² | 0.135 | Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O : 0.188g/L : 4 mL | 300 | FeSO ₄ ·7H ₂ O : 2.336 g/L | 2336 | 528 | Este estudio |
| Tubular Vertical | <i>Rb. sphaeroides</i> | Lámpara de tungsteno 200 W m ⁻² | 0.4 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 480 | (Eroglu et al. 2010) |
| Tipo fermentador | | | | | | | | | |
| | <i>Rs. rubrum</i> | Lámpara de tungsteno 500 lux | 2 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·2H ₂ O : 0.02g/L :1 mL | 11 | C ₆ H ₅ FeO ₇ : 0.01 g/L :1 mL | 2. | 2568 | (Ismail et al. 2008) |
| Con fibras ópticas | <i>Rp. palustris</i> | Luz solar + Lámpara de tungsteno | 1.8 | NaMoO ₄ *2H ₂ O 40 mg/L :1 mL | 17 | C ₆ H ₅ FeO ₇ : 1 g/L : 5 mL | 1139 | 544 | (C. Chen et al. 2008) |
| Otras geometrías | <i>Rb. Sphaeroides</i> | Luminaria tubular light 15 W/m ² | 1 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·2H ₂ O : 0.40mg/L: 1 mL | 0.2 | C ₆ H ₅ FeO ₇ : 1 g/L : 5 mL | 1139 | 156 | (Das y Basak 2009) |

Tabla 4. Concentración de Fe y Mo en medio de cultivo de algunas investigaciones relacionadas a la fotofermentación

| Biofilm | | | | | | | | | |
|--|---------------------|-------------------------|-------|--|------|--|------|------|---------------------|
| Láminas de vidrio cubiertas | <i>Rp.</i> | LED (590 nm) | 0.072 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | 646 | (Kondo et al. 2002) |
| | <i>palustris</i> | 5000 lux | | | | | | | |
| Tipo Groove (pequeñas incisiones) | <i>Rp.</i> | LED (590 nm) | 0.1 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O : | 543 | FeSO ₄ *7H ₂ O : | 8376 | 2073 | (Zhang et al. 2010) |
| | <i>palustris</i> | 6.75 W/m ² | | 0.02 g/L | | 0.0417 g/L | | | |
| | <i>Rp.</i> | Lámpara de metalehalide | 0.125 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O : | 543 | FeSO ₄ *7H ₂ O : | 8376 | 940 | (Guo et al. 2011) |
| | <i>palustris</i> | 12 W/m ² | | 0.001g/L | | 0.0417 g/L | | | |
| | <i>Rp.</i> | LED (590 nm) | 1.2 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O : | 543 | FeSO ₄ *7H ₂ O : | 361 | 934 | (Tian et al. 2010) |
| | <i>palustris</i> | 6.75 W/m ² | | 0.001g/L | | 0.0018 g/L | | | |
| Sistemas innovadores de inmovilización | | | | | | | | | |
| Látex | <i>Rp.</i> | Lámpara de tungsteno | 0.01 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O : | 107 | FeSO ₄ *7H ₂ O : | 309 | 4838 | (Gosse et al. 2007) |
| | <i>palustris</i> | 34 uE | | 198mg/L :1 mL | | 1.54 g/L :1 mL | | | |
| Arcilla + Fibras ópticas | <i>Rp.</i> | Halogeno + Tungsteno | 0.8 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O : | 543 | FeSO ₄ *7H ₂ O : | 8376 | 1051 | (Liao et al. 2010) |
| | <i>palustris</i> | | | 0.001g/L | | 0.0417 g/L | | | |
| PVA + Carraginata + alginato | <i>Rp.</i> | LED (590 nm) | 0.8 | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O : | 543 | FeSO ₄ *7H ₂ O : | 8436 | 1401 | (Wang et al. 2013) |
| | <i>palustris</i> | 100 W/m ² | | 0.001g/L | | 0.042 g/L | | | |
| Fibras de carbón activado | <i>Rp. faecalis</i> | Lámpara de tungsteno | 0.08 | n.a. | n.a. | FeSO ₄ *7H ₂ O : | 505 | 790 | (Xie et al. 2012) |
| | | 50 W/m ² | | | | 0.012 g/L + FeCl ₂ *4H ₂ O | | | |
| | | | | | | 1.8 g :1 mL | | | |

Tabla 5. Genes codificantes de enzimas nitrogenasas en la cepa *Rhodobacter capsulatus* SB 1003

| Número | Enzima | Descripción | Locus |
|--------|---------------|---|-------------|
| 1 | anfD | Proteína hierro-hierro nitrogenasa subunidad alfa | NC_014034.1 |
| 2 | nifD | Proteína molibdeno-hierro nitrogenasa subunidad alfa | NC_014034.1 |
| 3 | Nifk | Proteína molibdeno-hierro nitrogenasa subunidad beta | NC_014034.1 |
| 4 | nifN | Proteína molibdeno-hierro cofactor de biosíntesis nitrogenasa | NC_014034.1 |
| 5 | anfK | Proteína hierro-hierro nitrogenasa subunidad beta | NC_014034.1 |
| 6 | nifH2 | Proteína hierro nitrogenasa | NC_014034.1 |
| 7 | RCAP_rcc02235 | Oxidoreductasa/nitrogenasa subunidad 1 | NC_014034.1 |
| 8 | RCAP_rcc02234 | Oxidoreductasa/nitrogenasa subunidad 1 | NC_014034.1 |
| 9 | anfH | Proteína hierro nitrogenasa | NC_014034.1 |
| 10 | nifH1 | Proteína hierro nitrogenasa | NC_014034.1 |
| 11 | nifE | Proteína molibdeno-hierro de biosíntesis nitrogenasa | NC_014034.1 |
| 12 | nifB2 | Proteína cofactor de biosíntesis nitrogenasa | NC_014034.1 |
| 13 | anfO | Proteína accesorio hierro-hierro nitrogenasa | NC_014034.1 |
| 14 | anfG | Proteína hierro-hierro nitrogenasa subunidad delta | NC_014034.1 |
| 15 | nifB1 | Proteína cofactor de biosíntesis nitrogenasa | NC_014034.1 |

(National Center for information Biotechnology et al. 2016)

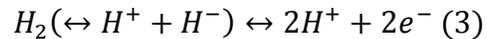


Figura 7. Proceso de fijación de nitrógeno y expresión génica de las nitrogenasas

El estudio de las nitrogenasas se ha intensificado por su rol metabólico, interesando a los investigadores a tratar de comprender más su mecanismo de acción. Una de las propuestas es que las proteínas de hierro en su estado reducido ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$) temporalmente se asocian con la proteína MoFe como paso inicial de transformación y un electrón de cada proteína-Fe es transferido a la correspondiente unidad catalítica. La relativa lejana distancia ($>10 \text{ \AA}$) entre el sitio de ensamble de nucleótido y el complejo proteico habla de un mecanismo interruptor dentro de la matriz de la proteína que inicia la hidrólisis de dos moléculas MgATP por electrón transportado. A pesar de los estudios realizados la actividad del interruptor de la proteína-Fe permanece poco clara (Rolff y Tuczek 2013). Después de que el Adenosin trifosfato (ATP) es hidrolizado, la proteína-Fe está en su estado oxidado ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$) con dos equivalentes del MgADP y la disociación de la proteína-Fe ocurre para facilitar la siguiente transferencia de electrones. Posteriormente las dos moléculas de MgADP son intercambiadas por dos MgATP, siendo aún asunto de investigación, qué sucede primero. La proteína-Fe es el único agente reductor de la proteína-MoFe que induce la formación de amonio, indicando que la proteína dispara alteraciones en la estructura después de la hidrólisis de ATP (Rolff y Tuczek 2013).

3.4.2. Hidrogenasas

El otro grupo importante de enzimas son las hidrogenasas. Las hidrogenasas son metaloenzimas dedicadas a realizar la separación del dihidrógeno () en protones y electrones, y la reacción contraria.



Actividad de la deshidrogenasa

La reacción se lleva a cabo en un centro metálico especializado que incrementa dramáticamente la acidez del dihidrógeno y lo dirige a la heterólisis separando la molécula. La reacción contraria, heterogénesis de dihidrógeno involucra la unión de H^+ y H^- . Estos han sido estudiados por medio del intercambio de isótopos $H_2 + D_2 \rightleftharpoons OHD + HDO$. Las hidrogenasas están distribuidas ampliamente en la naturaleza, existen en los reinos bacteria, archa y eukarya. Pueden ser clasificadas por la composición de iones en los sitios activos [NiFe], [FeFe] y [Fe] y existen tres formas generales reportadas de uso en el metabolismo de los microorganismos, en la membrana para la producción de energía y regulación del potencial redox en forma de regulación de genes para la expresión de proteínas, y por último las hidrogenasas solubles que están dentro del citoplasma para reducir a SH y NAD^+ . Las hidrogenasas [NiFe] son frecuentemente más activas en la oxidación de H_2 y las hidrogenasas [FeFe] se destinan normalmente más en la producción de H_2 . Las hidrogenasas son enzimas muy activas que en temperatura ambiente pueden alcanzar a generar $\sim 10^4$ moléculas de H_2 por segundo (Lubitz et al. 2014).

A partir de su descubrimiento inicial en 1931 como bacterias del colon (Stephenson y Stickland 1931) , las hidrogenasas han sido identificadas en todos los reinos de vida. Las 3 hidrogenasas son filogenéticamente distintas pero comparten cualidades que las unen en forma de proteínas con ion metálico en su centro de reacción. Las estructuras presentes en los estudios de rayos X han determinado su estructura, donde la hidrogenasa-Fe fue extraída de *Methanocaldococcus jannaschi*, la hidrogenasa-NiFe de *Desulfovibrio gigas*, *D. fructosovorans*, *D. desulfuricans* y de bacterias fotosintéticas como *Allochromatium vinosum*, la hidrogenasa-NiFeSe de *Desulfomicrobium Baculatum* y por último la hidrogenasa-FeFe de bacterias anaerobias como *Clostridium pasteurianum* (Mulder et al. 2011).

3.5. Sistemas de cultivo inmovilizados

Existen dos formas principales de realizar un cultivo microbiano, en forma suspendida o inmóvil. Los cultivos suspendidos son los más utilizados, los cuales consisten en un caldo nutritivo e inoculado con las bacterias deseadas, en un medio previamente enriquecido con las sustancias necesarias y muchas veces óptimas para el crecimiento de las bacterias o microorganismos deseados. La otra manera no menos común, es el cultivo de microorganismos en medio sólido. como son los cultivos en caja Petri. (Bitton 2005; Cowan y Talaro 2009).

Existen varias razones para utilizar cultivos inmovilizados como son, otorgar mayor resistencia al lavado en el sistema, resistencia a los cambios bruscos de temperatura, resistencia a la introducción de nuevos microorganismos, resistencia a sustancias tóxicas por mencionar algunos de los más importantes (Gallazzi et al. 2015; Tuğba Keskin, Giusti, y Azbar 2012; Chu et al. 2011). Además de otorgar resistencia a inhibidores, también se puede encontrar una mayor cantidad de microorganismos en un sistema inmovilizado al aumentar la superficie por unidad de volumen a la que los microorganismos puedan fijarse (Tuğba Keskin, Abo-Hashesh, y Hallenbeck 2011). Este caso se repite muchas veces en la investigación, los sistemas fotofermentativos también son objeto de esta tecnología, para reducir el tamaño de los reactores y aumentar la eficiencia de la producción de algunos metabolitos y biogases. Algunos soportes llegan a tener costos elevados y la eficiencia de producción no combate este problema por lo que nuevas soluciones a los sistemas de inmovilización se han utilizado. Se han utilizado bolas de cerámica, varillas de acrílico, soportes de polietileno, y entre los más novedosos, la lufa o estropajo. Este último soporte por su origen natural es menos costoso, y haber realizado tras pruebas de laboratorio resultó ser una gran opción debido a los resultados de producción (Tabla 6) obtenidos así como la cantidad de microorganismos fijos sobre éste (Figura 8) (Guevara-López y Buitrón 2015).

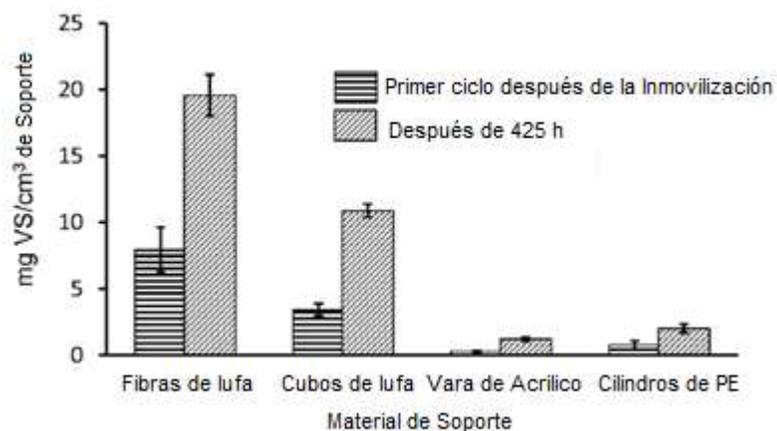


Figura 8. Biomasa expresada como mg de sólidos volátiles obtenidos en los diferentes soportes: Estropajo, varillas acrilico y cilindros de PE

Fuente : (Guevara-López y Buitrón 2015)

Tabla 6. Comparación de la producción de hidrógeno usando diferentes materiales de soporte

| Bacteria | Soporte | R _{H2} (mL/L _{cult} /h) | H _{max} (L/L _{cult}) | Referencia |
|-----------------------|----------------------------|--|--|--------------------------------|
| <i>R. sphaeroides</i> | Filtro de vidrio poroso | 7.4-59 | 0.7-1.4 | (Zagrodnik et al. 2013) |
| <i>R. palustris</i> | Barro | 38 | 1.54 | (C.-Y. Chen et al. 2008) |
| | Gel Silica | 35 | 1.79 | |
| <i>R. palustris</i> | Carbón activado | 29 | 1.37 | (C.-Y. Chen et al. 2008) |
| | Barro | 39 | 3.19 | |
| <i>R. faecalis</i> | Fibras de carbón activado | 33 | 3.45 | (Liu et al. 2009) |
| Consortio bacteriano | Fibras de estropajo (lufa) | 17 | 4.88 | (Guevara-López y Buitrón 2015) |

3.6 Consorcio microbiano

Las fotofermentaciones fueron realizadas por un consorcio microbiano utilizado anteriormente y caracterizado por (Guevara-López y Buitrón 2015) (Figura 9), en donde se observa que la especie predominante es *Rhodopseudomonas palustris*.

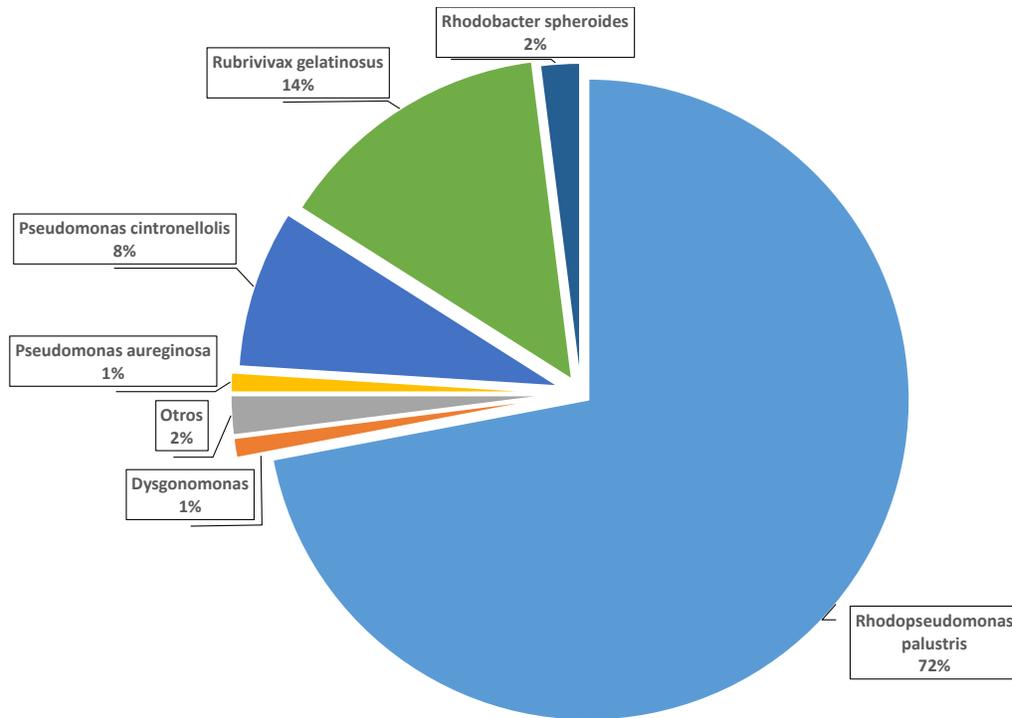


Figura 9. Consorcio microbiano fotofermentativo
Fuente : (Guevara-López y Buitrón 2015)

3.6. Diseño de fotobiorreactores

Existe una gran variedad configuraciones de fotobiorreactor (

Tabla 8) entre los que se incluyen los tubulares, paneles planos, reactores con biopelículas y/o con agentes inmovilizantes. Respecto a la fuente lumínica se ha utilizado una gran variedad de fuentes de iluminación tales como: lámparas de LED, tungsteno, fluorescentes, y por supuesto, luz solar. Con esta última se ha hecho uso de fibras ópticas para redirigir la luz solar en los que destacan los de tipo tubular y de tipo panel, debido a la capacidad de escalamiento que tienen. Por definición, un fotobiorreactor es un sistema donde la luz lo atraviesa y ocurren procesos dentro de él debido a la luz provista (Boran et al. 2010).

En el caso de los fotobiorreactores para producción de hidrógeno a partir de procesos fermentativos se necesita evitar el intercambio de gases y permitir una transferencia de masa adecuada (Boran et al. 2012).

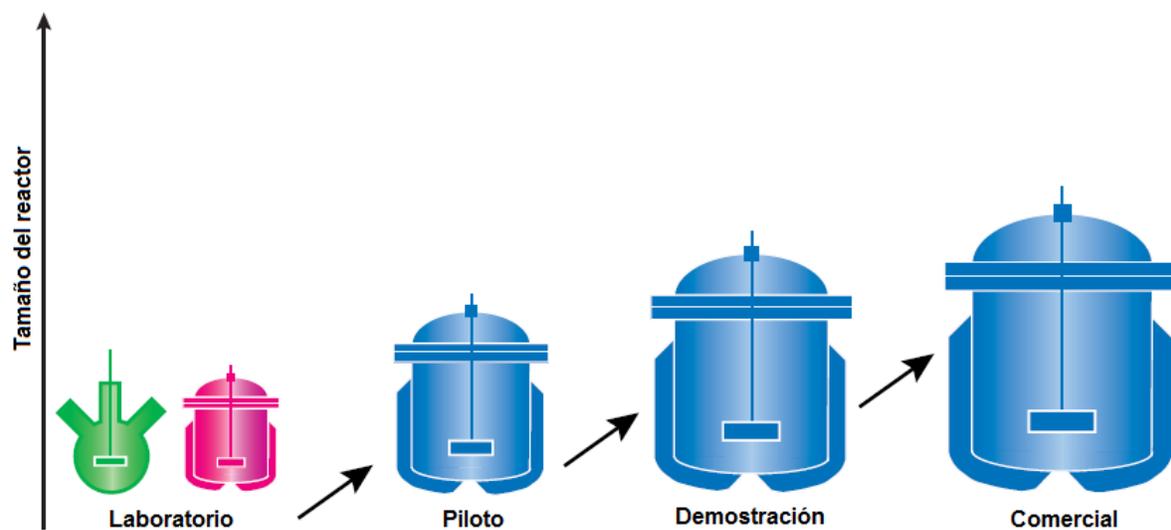


Figura 10. Escala de reactores

Fuente : Adaptado de (David Edwards, P. Eng 2015)

Según David Edwards (2015), el escalamiento de procesos en el estudio de biocombustibles se divide en escala laboratorio (<1000 mL), que incluyen reactores comerciales, la mayor característica de esta escala es la alta automatización y control que presentan, después de analizar el proceso deseado se tiende a escala a plantas piloto (1 a 100 L), escala en la cual se suelen agregar efluentes reciclados y condiciones de operación menos controladas, utilizando procesos más robustos. El siguiente escalamiento es la de las plantas

demostración (100 a 1000 L ó 10000 a 40000 L). A diferencia de las plantas piloto, la maquinaria utilizada en ellas es más parecida a la escala comercial, donde las bombas, mangueras y volúmenes son más grandes. El último escalamiento es la planta comercial (40000 L en adelante) la cual está se caracteriza por utilizar sólo la maquinaria indispensable para el control del proceso realizado (David Edwards 2012) .

Para la construcción de un fotobiorreactor se deben de considerar algunos aspectos para su posible escalamiento; la relación superficie-volumen es una de las más importantes ya que declara la capacidad de irradiar el sistema de la mayor forma posible, y donde se busca obtener un valor alto para este índice (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En el caso específico de los reactores tubulares (Figura 12) este factor se ve afectado directamente por el diámetro del tubo, ya que al modificarlo, se produce un cambio en el volumen y puede sufrir de otros fenómenos como es el generar zonas oscuras al centro del

| Tipo de FBR | Volumen (L) | Superficie/volumen (m ⁻¹) | Referencia |
|-------------|-------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| Tubular | 50 | 30.45 | (Adessi et al., 2012) |
| Tubular | 8 | 121.8 | (Giannelli and Torzillo, 2012) |
| Tubular | 80 | 25 | (Boran et al., 2010) |
| Tubular | 100 | 13.85 | (Gebicki et al., 2010) |

tubo, ya que la luz no llega a penetrar por la densidad del fluido.

Tabla 7. Índice superficie/volumen

Con la finalidad de lograr una radiación luminosa más homogénea se han adoptado algunas estrategias como: i) El reducir el diámetro del tubo, ii) Incrementar la radiación de luz e intensidad y; de entre las más novedosas se encuentran iii) redireccionar la luz con fibra óptica, lámparas sumergibles y lámparas activadas con electricidad inalámbrica que funcionen con campos magnéticos y ladrones de carga (Heining et al. 2015).

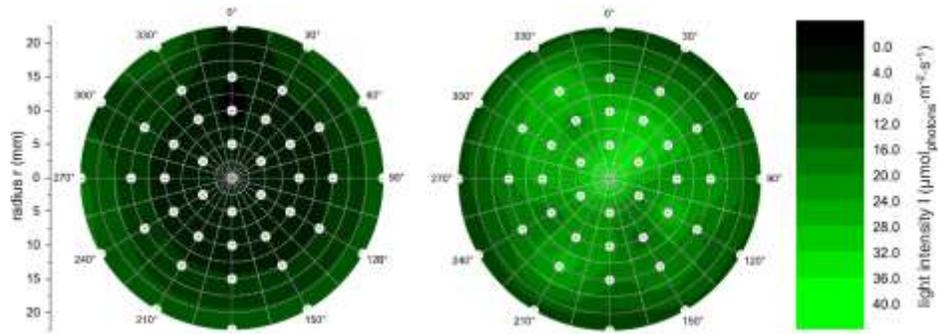


Figura 11. Mapas de iluminación en un fotobiorreactor tubular, Izq. Reactor sin ajuste de iluminación interna. Der. Reactor con ajuste de iluminación interna
Fuente : Adaptada de (Heining et al. 2015)



Figura 12. Ejemplo de un fotobiorreactor
Fuente : Adaptada de (Boran et al. 2012)

Tabla 8. Tipos de fotobiorreactores

| Tipo de FBR | Fuente de luz | Volumen del reactor (l) | TPH (mL L ⁻¹ H ⁻¹) | Referencia |
|------------------------------------|--|-------------------------|---|------------|
| Tubular (vertical) | Lámpara de tungsteno 200 W | 0.4 | 20.0 | |
| Rocoso | Lámpara de tungsteno 10.25 W | 1.0 | 11 | |
| Flotante con luz inducida | Lámpara de halógeno | 6.0 | 10.0 a 12 | |
| Doble capa | Lámpara de tungsteno 500 W | 0.2+0.2 | 3640 mL m ⁻² h ⁻¹ | |
| Multicapa | Lámpara de tungsteno 300 W | 0.8 | 2000 mL m ⁻² h ⁻¹ | |
| Inclinado 30° | Luz solar | 6.5 | 10.0 | |
| 30° con malla sombra | Luz solar | 1.0 | 0.87 | |
| Vertical | Luz solar | 25.0 x 4 | 8.0 | |
| Con fibras ópticas | Luz solar y lámparas de tungsteno | 1.8 | 22.7 | |
| Anular triple enchaquetado | Luminina tubular 15 W | 1.0 | 6.5 | |
| Filminas de vidrio | LED (590nm) 5000 lux | 0.072 | 26.9 | |
| Del tipo con Ranuras | LED (590nm) 6.75 W | 01 | 86.46 | |
| Superficie rugosa y fibras ópticas | Halogenuros metálicos 12 W | 0.125 | 39.2 | |
| Perlas de vidrio | LED (590nm) 6.75 W | 1.2 | 38.9 | |
| Látex | Lámpara de tungsteno 34 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-2}$ | 0.01 | 201.6 | |
| Barro y fibras ópticas | Lámparas de Halógeno y tungsteno 95 W | 0.8 | 4.3 | |
| PVA y Carragininina + alginato | LED (590nm) 6000 lux | 0.8 | 58.4 | |
| Carbón activado | Lámparas incandescentes 150 W | 0.08 | 32,9 | |

Fuente : Adaptada de (Adessi y De Philippis 2014)

Otro factor a considerar es el nivel de radiación soportada por el cultivo. A pesar de que anteriormente se mencionó que se busca un alto índice superficie/volumen (Argun y Kargi 2010). Algunos investigadores han reportado fotoinhibición en la producción de hidrógeno a altas intensidades lumínicas. Aunque el cultivo pueda soportar altas intensidades, puede existir inhibición en la producción de hidrógeno por arriba de los 500 W/m² (Kargi y Argun 2011). A partir de lo anterior se derivó otra pregunta para considerar en la construcción y operación de prototipos solares, ya que hay momentos del día donde la radiación solar está al máximo y en lugares como Querétaro (sitio de estudio) la radiación solar llega a rebasar los 1000 W/m² (J.A.L. Cruz-Abeyro et al. 2005).

$$\frac{I_s}{v} = \frac{\text{Superficie iluminada}}{\text{Volumen del reactor}} = m^{-1} \quad (4)$$

Índice Superficie / Volumen

Se han observado que, los de mejores resultados en fotobiorreactores en cuanto a la producción de hidrógeno y biomasa, se encuentran en sistemas verticales tubulares, ya que la incidencia del flujo de fotones sobre la superficie es menor. La mayoría de estos fotobiorreactores han sido probados con cultivos algales, y recientemente se han empezado a utilizar en cultivos bacterianos fotosintéticos (Vree et al. 2015).

En los esfuerzos por escalar los fotobiorreactores bacterianos, investigadores han buscado la manera de extrapolar los resultados encontrados en los sistemas con microalgas y otros microorganismos fotosintéticos, encontrando resultados similares. En Italia los investigadores corroboraron que los sistemas verticales tienen mejores eficiencias de producción debido a la disminución de la densidad de fotones justo como en los sistemas algales. Sin embargo hace falta realizar estudios acerca de los sistemas bacterianos inmovilizados en reactores solares y condiciones climáticas no controlables (Adessi et al. 2012).

El motivo de conocer estos aspectos de diseño es para caracterizar el comportamiento del sistema biológico. A partir del diseño se pueden relacionar las dimensiones y capacidades del cultivo a tratar, ya que las necesidades lumínicas varían entre los diferentes microorganismos. En los cultivos fotosintéticos se han generado ecuaciones para expresar el crecimiento a partir de la luz entrante (Tabla 9), donde la tasa de crecimiento (μ) está

gobernada por la cantidad de luz recibida. Generalmente éstas expresan que al incrementar la intensidad de la luz se alcanza la tasa máxima; sin embargo, los estudios posteriores demostraron el fenómeno de la fotoinhibición, encontrado primero como ya se ha mencionado en cultivos algales y posteriormente en cultivos bacterianos fotosintéticos.

En la tabla siguiente las ecuaciones 1-3 y 6 no toman en cuenta la fotoinhibición y sólo las ecuaciones 4 y 5 consideran los excesos de luz (Grima et al. 1999).

Tabla 9. Modelos para el crecimiento específico dependientes de luz

| Ecuación | Referencia |
|--|---------------------|
| 1. $\mu = \frac{\alpha\mu_{max}I}{\mu_{max} + \alpha I}$ | (Burlew 1976) |
| 2. $\mu = \mu_{max} \left(1 - e^{-\frac{1}{I_{max}}} \right)$ | (van Oorschot 1955) |
| 3. $\mu = \frac{\mu_{max}I}{I_{max}} e^{\left(1 - \frac{I}{I_{max}}\right)}$ | (J.H. Steele 1977) |
| 4. $\mu = \frac{\mu_{max}I}{(K_i^m + I^m)^{\frac{1}{m}}}$ | (Bannister 1979) |
| 5. $\mu = \frac{\mu_{max}I}{K_s + I + \frac{I^2}{K_i}}$ | (Aiba 1982) |
| 6. $\mu = \frac{\mu_{max}I^n}{I_k^n + I^n}$ | (Grima et al. 1994) |

En los reactores tubulares que son los que han presentado mejores resultados, así como mayor facilidad de construcción y manejo, se han utilizado condiciones de iluminación artificial. A pesar de que son un parámetro importante de comparación, debe aún hacerse el estudio en condiciones exteriores, buscar la manera de contrarrestar los efectos negativos del clima, y amplificar aquellas condiciones que se desee conservar, siendo la iluminación y la temperatura los factores climáticos determinantes (Fernández-Sevilla, Ación-Fernández, y Molina-Grima 2014). En la actualidad no se han reportado reactores tubulares con microorganismos inmovilizados. Sin embargo, como la tasa de crecimiento de las bacterias púrpura es baja comparada con otras bacterias, es de esperarse una mejora en la producción en sistemas continuos con bacterias inmovilizadas.

4. Metodología

La metodología que se siguió se durante el desarrollo de esta investigación que se dividió en 3 etapas, las cuales se observan en el siguiente diagrama de bloques (Figura 13).

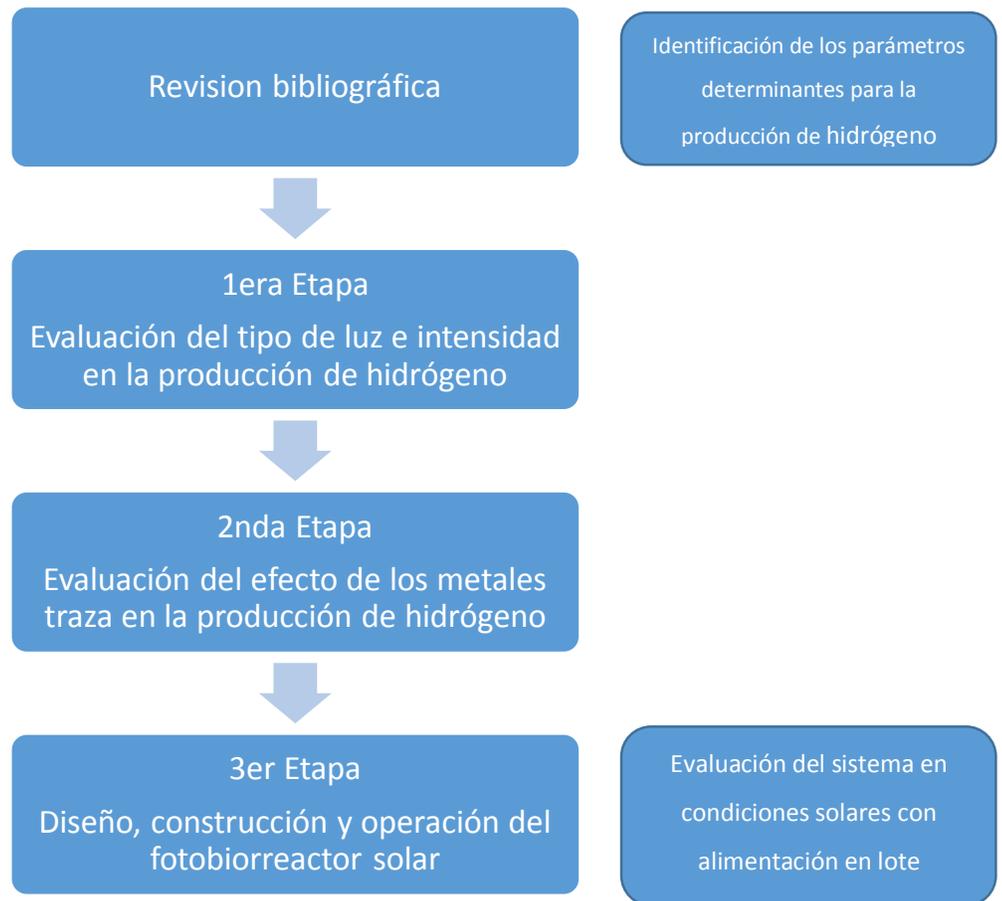


Figura 13. Metodología en diagrama de bloques

4.1 Medios de crecimiento

4.1.1 Medio basal

El medio basal utilizado (Ying Li et al., 2008) estuvo compuesto por una mezcla de soluciones aforada a un 1 L conteniendo solución de fosfatos: 20 mL; solución de magnesio: 4mL; solución de metales traza: 4 mL; solución de hierro: 5mL; solución de vitaminas: 5mL. La solución de fosfatos estuvo compuesta por 37.5 g/L K_2HPO_4 y 42.5 g/L KH_2PO_4 . La solución de magnesio estuvo compuesta por 59 g/L $MgSO_4$, La solución de metales traza estuvo compuesta por 0.7 g/L H_3BO_3 , 0.188 g/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.06g/L $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.53 g/L $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ y 0.188 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. La solución de hierro estuvo compuesta por 2.336 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. La solución de vitaminas estuvo compuesta por 0.756 g/L Vitamina B1 o Timina, 0.714 g/L Biotina y 1.296 g/L Nicotidamina.

4.1.2 Medio de crecimiento

Para el medio crecimiento se utilizó acetato de sodio y butirato de sodio como fuente de carbono y como fuente de nitrógeno glutamato de sodio, La relación C/N fue 80 (Yingli, Zhang, y Fang 2008) para esta etapa se mantuvo una proporción del doble de carbono de butirato con respecto al acetato

4.1.3 Medio de producción de hidrógeno

La relación C/N en el medio de producción de hidrógeno fue de 16 (Lazaro et al. 2012). Las concentraciones estándar para las pruebas de selección de inóculo fueron 2.46 g/L de acetato de sodio y 3.30 g/L de butirato de sodio como fuente de carbono, y 0.37 g/L glutamato de sodio como fuente de nitrógeno. Se ajustó pH a 6.8.

4.1.4 Medio de producción modificado (reducción en concentración de Fe y Mo)

Para el medio de producción modificado, reducido en hierro y molibdeno, se preparó un medio basal sin compuestos $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Se prepararon soluciones por separado conteniendo 300, 155 y 10 $\mu\text{g/L}$ de molibdeno, así como soluciones conteniendo 2336, 1171 y 7.7 $\mu\text{g/L}$ de hierro.

4.2. Diseño y construcción de los fotobiorreactores escala laboratorio

Para realizar los ensayos correspondientes a la evaluación de la fuente de luz e intensidad luminosa se diseñó un fotobiorreactor tubular utilizando un tubo de pyrex de 1mm de grosor y 1 pulgada de diámetro exterior. Al cual se le acoplaron reducciones de PVC de $\frac{3}{4}$ " con cuerda interna de $\frac{1}{2}$ " para poder realizar la construcción del sistema (Figura 15). Posteriormente se realizaron las conexiones necesarias para mantener el diseño sin fugas utilizando racores de $\frac{1}{2}$ " y salida de 10mm. Para las conexiones de manguera y el espacio de cabeza se utilizaron reducciones hasta llegar a 4mm y así evitar la acumulación de biogás en las mangueras.

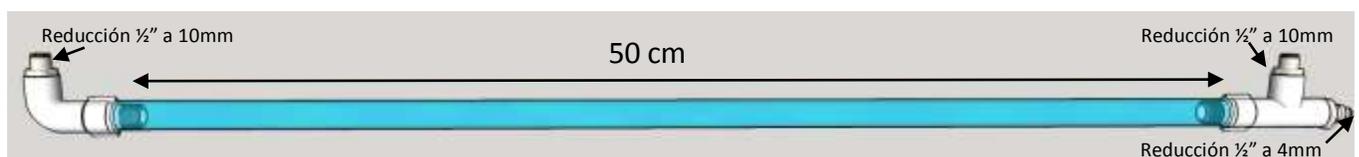


Figura 14. Tubo fotobiorreactor escala laboratorio (vista horizontal). La recuperación del biogás se realizó por la salida de 4mm



Figura 15. Muestra de uniones del tubo pyrex con coples PVC



Figura 16. Fotobiorreactores tubulares. Izq. Reactor solar escala laboratorio. Der. Reactor piloto laboratorio

4.3. Evaluación del tipo de luz e intensidad en la producción de hidrógeno

Esta etapa experimental se llevó a cabo utilizando el fotobiorreactor tubular piloto (Figura 16) descrito anteriormente. Se utilizaron 2 tipos de lámpara, incandescente (300 a 900 nm) y fluorescente y cuyas características se presentan en la tabla 9. Se utilizó lufa para inmovilizar al consorcio donde se empleó una concentración de 300mg/L de inóculo para iniciar el proceso de inmovilización con medio de cultivo basal.

Las condiciones de operación para realizar el análisis exploratorio se muestran en la Tabla 10, Dicho análisis consistió en realizar las fotofermentaciones con dos fuentes de luz distintas, fluorescentes e incandescentes, operando la misma intensidad luminosa.

Tabla 10. Condiciones de operación en lote del fotobiorreactor piloto

| Parámetro de operación | Lámparas | Lámparas |
|--------------------------------|------------------|------------------|
| | Fluorescentes | incandescentes |
| Intensidad (W/m ²) | 125 | 125 |
| Temperatura °C | 31 | 31 |
| Periodos Luz/Oscuridad (h) | 12/12 | 12/12 |
| Material de soporte | Lufa (Estropajo) | Lufa (Estropajo) |

La duración del lote se determinó por el consumo de los AGV y al detenerse la producción de biogás. Se utilizaron 2 reactores (Figura 17) para realizar la experimentación. En el reactor incandescente por tener rápido incremento temperatura se acopló un control de encendido/apagado por medio del uso de un microcontrolador Arduino y un ventilador debido que existió un rápido incremento de temperatura

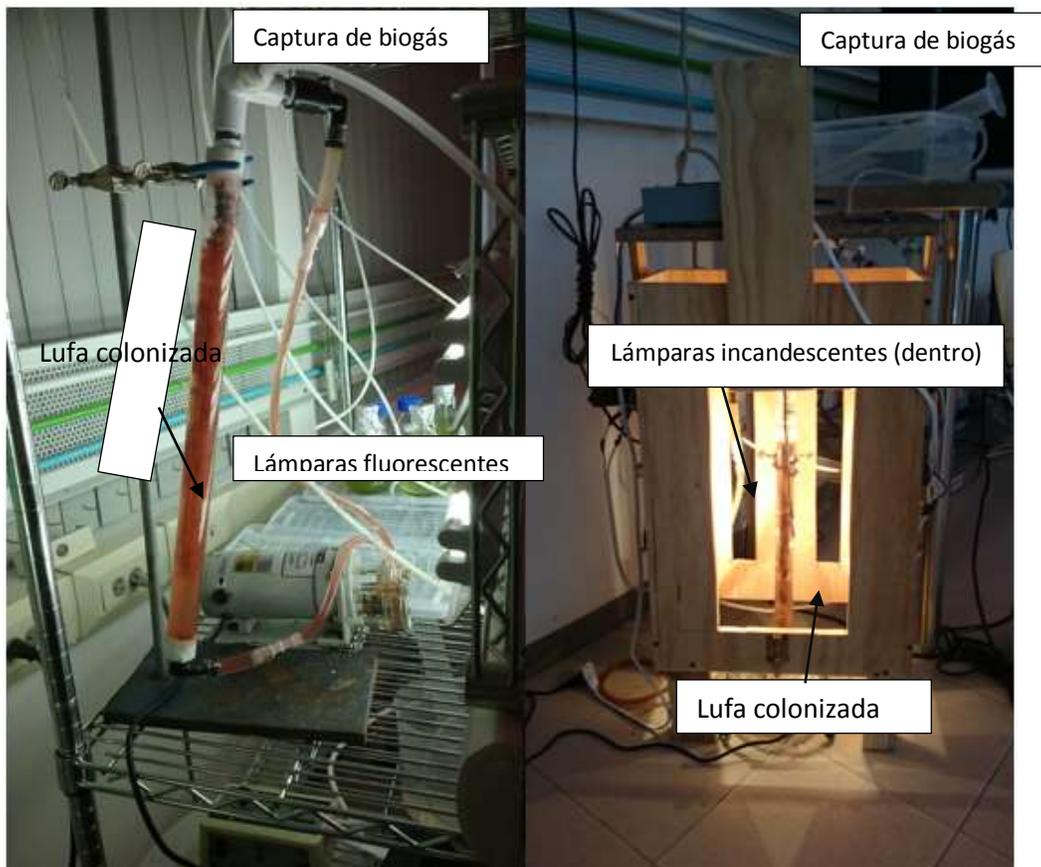


Figura 17. Foto de los Reactores Fluorescente (izq.) e Incandescente (der.). Experimento de tipo de luz e intensidad

La inoculación del sistema se realizó dentro del tubo con lufa limpia (sin colonizar) con medio de crecimiento. Posteriormente se iniciaron los ciclos de estudio utilizando medio productor. El volumen del hidrógeno producido se cuantificó por desplazamiento de agua, y la concentración de gases se determinó cromatografía de gases cuya técnica está descrita posteriormente en el área de metodología. Debido a la larga duración del proceso fotofermentativo, cada intensidad se probó una sola vez.

4.4 Evaluación del efecto de los metales traza en la producción de hidrógeno

Para realizar el análisis del efecto de la concentración de hierro y molibdeno sobre la producción de hidrógeno, se realizó un diseño experimental 2^k con 4 puntos centrales y con un duplicado. Se seleccionaron las concentraciones 2336 $\mu\text{g/L}$ y 7.7 $\mu\text{g/L}$ como niveles alto y bajo respectivamente para el hierro y 330 $\mu\text{g/L}$ y 11 $\mu\text{g/L}$ para el molibdeno. En el análisis bibliográfico (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se encontró una tendencia a incrementarse la producción de hidrógeno a medida que las concentraciones de estos metales traza disminuyen. Debido a lo anterior se planteó el siguiente diseño experimental.

Tabla 11. Matriz del diseño experimental para análisis de la relación metales traza-
Producción de hidrógeno

| Matriz | | | | |
|-----------|----------------------------|-------------------------------|---------|-----|
| Replica | Concentraciones | | Niveles | |
| Corrida | Hierro ($\mu\text{g/L}$) | Molibdeno ($\mu\text{g/L}$) | Fe | Mo |
| 1 | 7.7 | 300 | - | + |
| 1 | 7.7 | 10 | - | - |
| 1 | 2336 | 10 | + | - |
| 1 | 2336 | 330 | + | + |
| 1 | 1171 | 155 | 1/2 | 1/2 |
| 1 | 1171 | 155 | 1/2 | 1/2 |
| 1 | 1171 | 155 | 1/2 | 1/2 |
| 1 | 1171 | 155 | 1/2 | 1/2 |
| 2 | 7.7 | 300 | - | + |
| 2 | 7.7 | 10 | - | - |
| 2 | 2336 | 10 | + | - |
| 2 | 2336 | 300 | + | + |
| 2 | 1171 | 155 | 1/2 | 1/2 |
| 2 | 1171 | 155 | 1/2 | 1/2 |
| 2 | 1171 | 155 | 1/2 | 1/2 |
| 2 | 1171 | 155 | 1/2 | 1/2 |
| | Nivel alto (+) | Nivel bajo (-) | medio | |
| Hierro | 2336 | 7.7 | 1171 | |
| Molibdeno | 300 | 10 | 155 | |

El diseño experimental se llevó a cabo utilizando botellas con medio de cultivo productor (iError! Marcador no definido.) con un volumen máximo de 160 mL y un volumen útil de 135 mL. Se agregaron 125 mL de medio de cultivo a cada botella con sus respectivas concentraciones de metales traza. Posteriormente, se inocularon 10 mL para conseguir una concentración de 300mg/L de biomasa cuantificada como SSV. Las condiciones de operación fueron las mismas para las 16 botellas (Tabla 12).



Figura 18. Fracción (1/4) de las botellas con diferentes concentraciones de metales traza en medio productor

Tabla 12. Condiciones de operación para el análisis de la relación metales traza-producción de hidrógeno

| Parámetro | Valor |
|----------------------------------|-----------------------|
| Temperatura (°C) | 30-32 |
| Iluminación (W/m ²) | 333 |
| Tipo de iluminación | Lámparas de tungsteno |
| Agitación | Ninguna |
| Inóculo | [300mg/L] |
| Periodo de iluminación | Continua |

Los datos de la producción de biogás acumulado se ajustaron a la ecuación de Gompertz (), la cual describe la acumulación progresiva de biogás en un proceso por lote.

$$H(t) = P * \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m * e}{p} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} (5)$$

Ecuación de Gompertz utilizada para la descripción de la producción acumulada de biogás

Donde P es la producción máxima de hidrógeno, R_m es la tasa máxima de producción y λ es tiempo de latencia.

La medición de biogás se realizó en continuo por medio del desplazamiento de agua, haciendo uso de un una válvula de 3 vías conectada a una aguja de jeringa y final de manguera (*Figura 19*). Es importante hacer uso de mangueras y conexiones neumáticas para reducir al máximo el escape de hidrógeno, de la misma manera es recomendable utilizar una probeta de vidrio para la recolección ya que la permeabilidad es menor en este material.



Figura 19. Jeringa con reducciones neumáticas

Una vez realizada la foto fermentación se midió el consumo de ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases y se calculó la remoción de ácido propiónico, acético y butírico (%) y la tasa de producción de hidrógeno por día y hora $\text{mLH}_2/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ y/o $\text{mLH}_2/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{h}$). Se realizó el análisis estadístico por medio del software Statgraphics Centurion XV, y con el mismo se obtuvieron análisis de varianza y los gráficos para describir los resultados encontrados.

4.5 Diseño del fotobiorreactor piloto (3 L)

La construcción del fotobiorreactor piloto tuvo como objetivo principal generar un diseño basado en el índice superficie/volumen, con el objetivo de proporcionar incidencias de luz uniformes. Éste índice debe ser alto para evitar las zonas oscuras. Sin embargo, hay que tener en cuenta el posible efecto de fotoinhibición al incrementar demasiado el índice. El volumen del reactor se incrementó con el aumento de la longitud de los tubos en comparación a los utilizados en escala laboratorio de 0.4m a 1.0 metro de longitud (*Figura 20*).

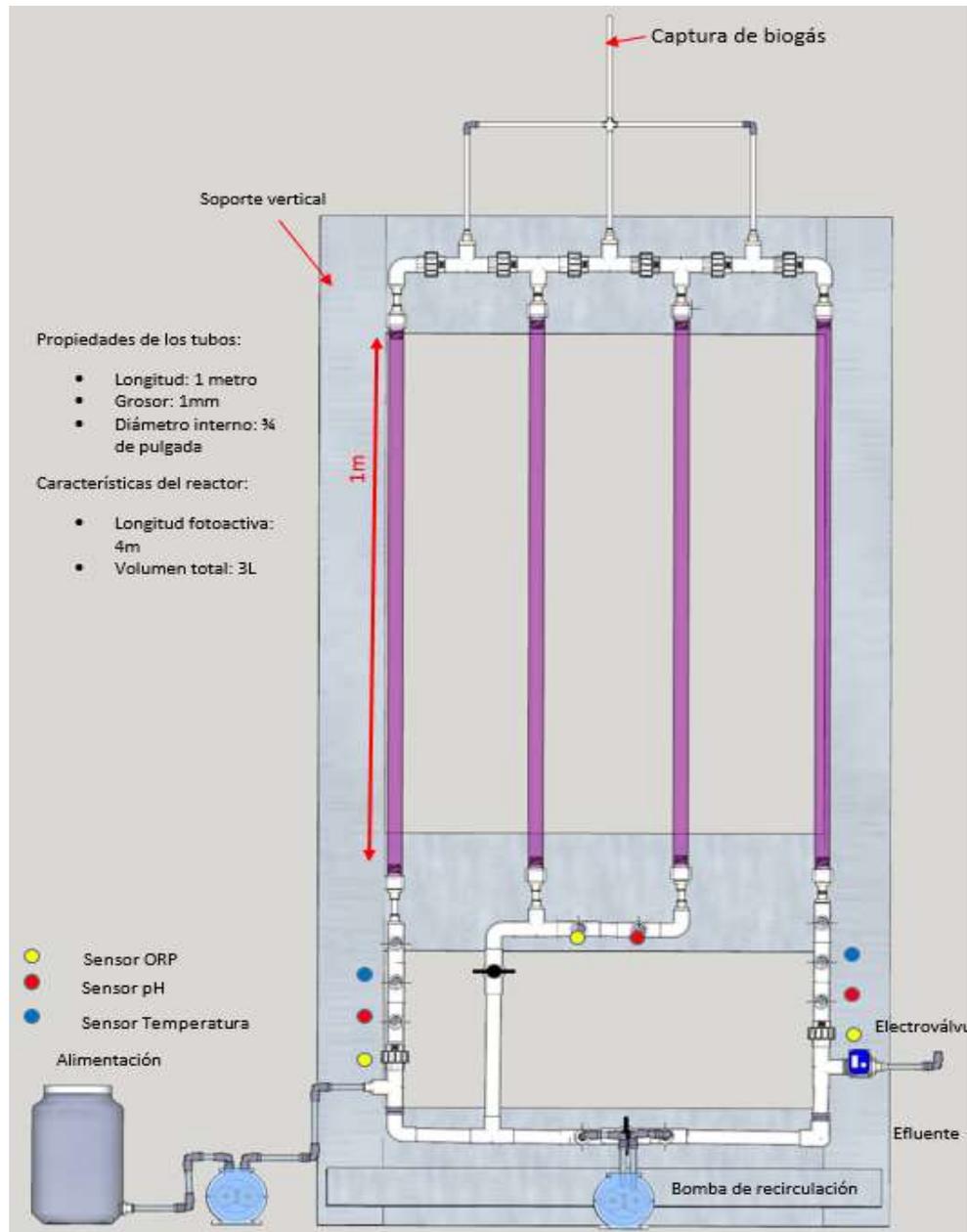


Figura 20. Esquema del Fotobiorreactor piloto para condiciones ambientales (intemperie). Consta de 4 tubos de vidrio pyrex, bomba de alimentación y recirculación y 3 puntos de medición.

Después de realizar pruebas preliminares se decidió mantener el fotobiorreactor en posición vertical para evitar el efecto de la fotoinhibición en las horas de mayor radiación solar. El fotobiorreactor consta de 4 tubos de 1 m de longitud, los cuales poseen 1mm de grosor y un diámetro interno de $\frac{3}{4}$ de pulgada aproximadamente. El volumen del reactor fue de 3L. El diseño consta de 3 puntos de muestreo para sondas de medición de pH, temperatura y ORP. La alimentación del reactor se realizó mediante una bomba peristáltica, así como con recirculación. El diseño del reactor permite una captura de biogás por una sola salida, la cual permite la conexión para la medición de volumen de gas generado por el método de desplazamiento de agua.

4.6 Procedimientos Analíticos

4.6.1 Determinación de la composición de biogás

La muestra de biogás se tomó utilizando una jeringa unida a una llave de 3 vías. Debido a que la muestra de biogás se encuentra dentro de una probeta, se debe llegar hasta ella con una manguera. La primera succión se elimina por completo cambiando la vía de salida con la llave, esto con el objetivo de eliminar el aire retenido en la manguera, posteriormente se succiona y desplaza el gas para homogenizar la muestra por lo menos un par de veces dentro de la botella. Ya homogenizado se toman 10 mL de muestra e inmediatamente se inyectan al cromatógrafo de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases (SRI 8610C) provisto con un detector de conductividad térmica y una columna de sílica gel de 1.82 m en serie con una columna de tamiz molecular de 13x de 1.82 m y un diámetro de 3.175 mm que operó durante 4 minutos a 40 °C y después se calentó a 110°C con un incremento de 20 °C/min. El gas portador utilizado fue nitrógeno con un flujo de 20 mL/min. La temperatura del inyector fue de 90 °C y del detector de 150 °C. Los datos de área obtenidos fueron comparados con la curva patrón realizada para cada gas para lograr determinar de esta manera la composición y proporciones del biogás.

4.6.2 Determinación de la concentración de ácidos grasos volátiles

Para el análisis de ácidos grasos volátiles (AGV) se tomó 1 mL de muestra previamente centrifugada durante 20 min a 3500 rpm. Para la determinación cuantitativa de los AGV y solventes se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilen Tech 6890N, VARIAN 3300 C) equipado con un detector de ionización de flama FID y una columna capilar de sílice Zebron ZB-FFPA de 0.53 (mm) de diámetro, 15 m de largo y 1 μ m de espesor de película, con las siguientes condiciones de operación: Temperatura inicial de horno en 55°C, se mantiene 3 min aumentándose a 135 °C a una tasa de 45°C/min; temperatura del inyector 190°C; temperatura del detector, 210°C; nitrógeno como gas portador.

4.6.3 Demanda química de oxígeno (DQO)

Para la determinación de la DQO se utilizaron tubos HACH con dicromato de potasio y ácido sulfúrico para cuantificaciones en un rango de 0 – 1500 mg DQO/L. A cada vial se le adicionaron 2 mL de la muestra utilizando una dilución de 1 en 100 y 1 en 1000. Dado que la reacción es exotérmica es importante mezclar cuidadosamente de lado a lado del tubo para evitar así un calentamiento local en el fondo de la celda y una posible reacción explosiva. Se colocaron los tubos dentro del reactor HACH precalentado a una temperatura de 150°C, se efectuó la digestión por 2 horas. Después de las 2 horas se apagó el reactor y los tubos se dejaron enfriar por 20 minutos. De nuevo se mezcló la solución, invirtiendo los tubos cuidadosamente y se leyeron en el espectrofotómetro HACH a 620 nm. Se tomaron muestras por triplicado y se utilizó un blanco agregando a un tubo HACH 2 mL de agua destilada. El resultado se reporta en unidades de mgO₂/L.

4.6.4 Sólidos suspendidos totales

Para la determinación de los sólidos suspendidos totales, volátiles y fijos se preparó el filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/A), enjuagándolo con agua destilada y aplicando vacío en el embudo de filtración, hasta eliminar totalmente el agua en exceso. Se dejó secar en estufa a 103-105 °C por 1 hora, se dejó enfriar en el desecador por 15 min y luego se pesó en la balanza analítica. Una vez que se obtuvo el peso constante del filtro, se colocó en el embudo de filtración y se mojó el filtro con una pequeña cantidad de agua destilada. Se tomó un volumen de 5 mL de la muestra homogeneizada, vertiendo el volumen en el embudo de filtración y se aplicó vacío hasta eliminar totalmente el exceso de agua. Usando

un soporte de aluminio se llevó a secar a la estufa a 105 °C por 1 hora, se dejó enfriar en el desecador durante 15 min y se registró su peso, obteniendo así los datos para el cálculo de los sólidos suspendidos totales.

4.6.5 Determinación de proteína celular

Para la determinación de la biomasa fijada al soporte se utilizó la técnica de determinación de proteínas por el método modificado de Lowry (Lowry et al. 1951). Para la cuantificación de proteínas en la biomasa fija, se tomaron muestras del soportes, se colocarán en tubos Falcon con 10 mL de buffer de fosfatos y sonicaron (Hernández 2011). Se utilizó un ultrasonicador (High Intensity Ultrasonic Processor, Autotune Series). El tiempo de sonicación se determinó de acuerdo al desprendimiento de la biopelícula. Se tomaron muestras a distintos tiempos y se evaluó la variación de la concentración de proteína medida a distintos tiempos. Se agregó 1 mL del sobrenadante obtenido después de la sonicación y se colocaron en un tubo HACH. Se agregó 1 mL de reactivo de formación de complejo (Solución conteniendo $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Tartrato de Sodio y Potasio y SDS) recién preparada, se agitaró y dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min. Se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Folin, se agitó con vórtex y dejó reposar por 45 min a temperatura ambiente en una bolsa negra. Se leyó la absorbancia a 750 nm. Posteriormente se utilizaron las lecturas para realizar una curva de calibración de sólidos suspendidos volátiles (SSV) y poder realizar lecturas de biomasa a través de esta curva.

4.6.6 Determinación de espectro de luz

Para realizar el análisis de los espectros de luz se utilizó el USB UV/VIS 4000 de Ocean optics, el cual utiliza una sonda de fibra óptica, la cual se debe fijar a una distancia definida por el usuario y aislada de cualquier otra fuente de luz aparte de la que sea desea analizar. Para la captura de datos y análisis de ellos se utilizó el software Ocean optics spectrometer provisto por los mismos fabricantes el cual permite importar datos a Excel para ser analizados con mayor detalle.

5. Resultados y discusión

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante las diferentes etapas experimentales llevadas a cabo en este proyecto de investigación.

5.1. Evaluación del tipo de luz e intensidad en la producción de hidrógeno

5.1.1 Colonización del soporte

Para realizar la fotofermentación, el primer paso es la preparación del inóculo, y en el caso de cultivos inmovilizados como en el presente trabajo, se debe realizar la colonización del soporte. La colonización de la lufa (estropajo) se realizó durante un periodo de 8 días, con el medio basal. Posteriormente, se tomaron muestras de secciones del soporte sin colonizar, en proceso de colonización y completamente colonizadas, a las que se les realizó una microscopia de barrido, tal como se muestra en las siguientes figuras.

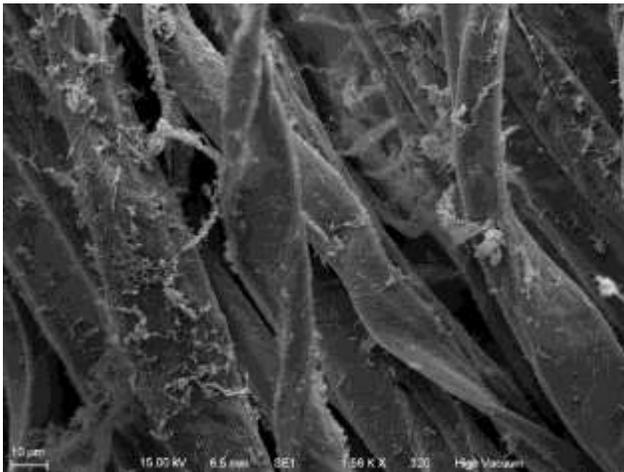


Figura 22. lufa en proceso de colonización

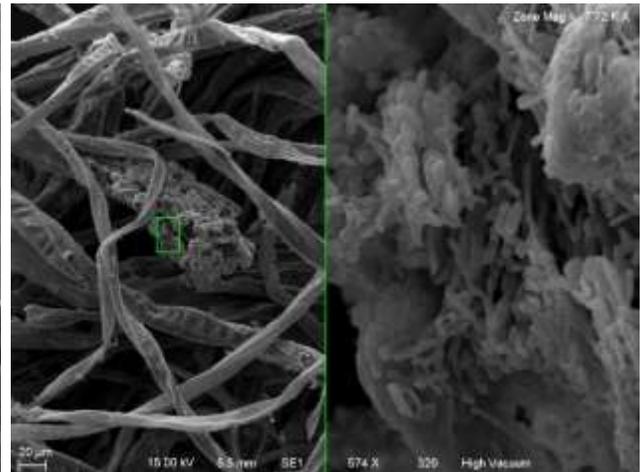


Figura 21. lufa iniciando la colonización

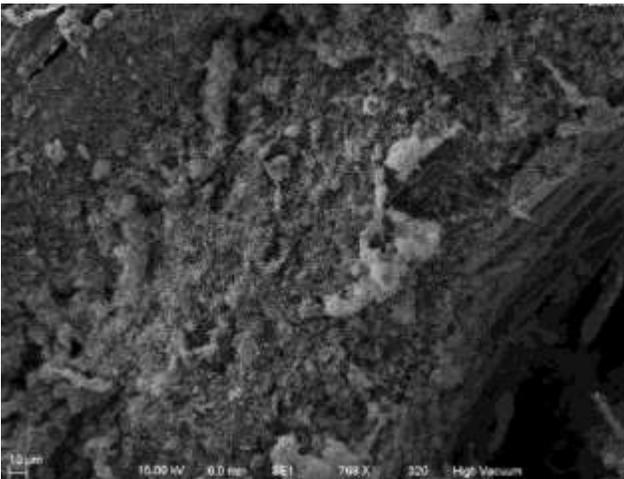


Figura 24. lufa densamente poblado

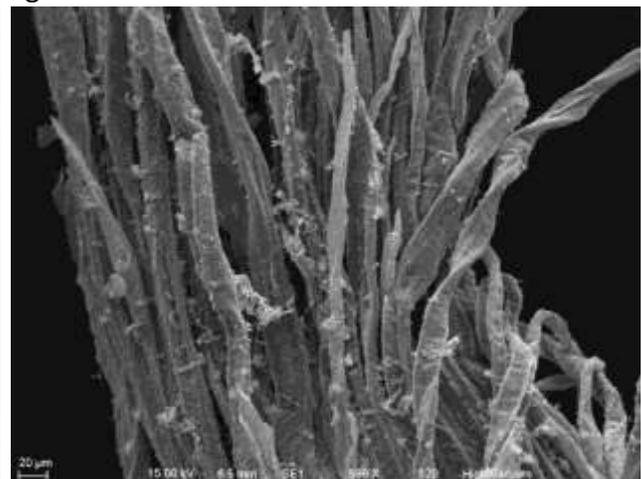


Figura 23. Fibras de lufa en proceso de colonización

5.1.2 Evaluación de la fuente de luz e intensidad luminosa sobre la producción de hidrógeno en reactores escala laboratorio

Durante las fotofermentaciones realizadas variando el tipo de luz y la intensidad luminosa, se determinaron los porcentajes de remoción de ácidos grasos, así como la tasa de producción de hidrógeno y la producción acumulada. Para evaluar el efecto de la fuente de luz, se realizaron dos fotofermentaciones con dos diferentes tipos de luz artificial: fluorescente e incandescente, a la misma intensidad luminosa de 125 W/m^2 (Figura 25). A partir los resultados obtenidos de esta primer intensidad encontramos que la tasa de producción de hidrógeno fue mayor (96 mL/L/d) en el reactor con luz incandescente (línea púrpura) y permitió una mayor remoción de DQO en el medio por encima del 85%, mientras que en el reactor con luz fluorescente (línea azul) se observó una tasa de (48 mL/L/d) y una remoción de 75% de DQO. Debido a los resultados mencionados anteriormente, se decidió seguir la experimentación únicamente con el uso de lámparas incandescentes a diferentes intensidades

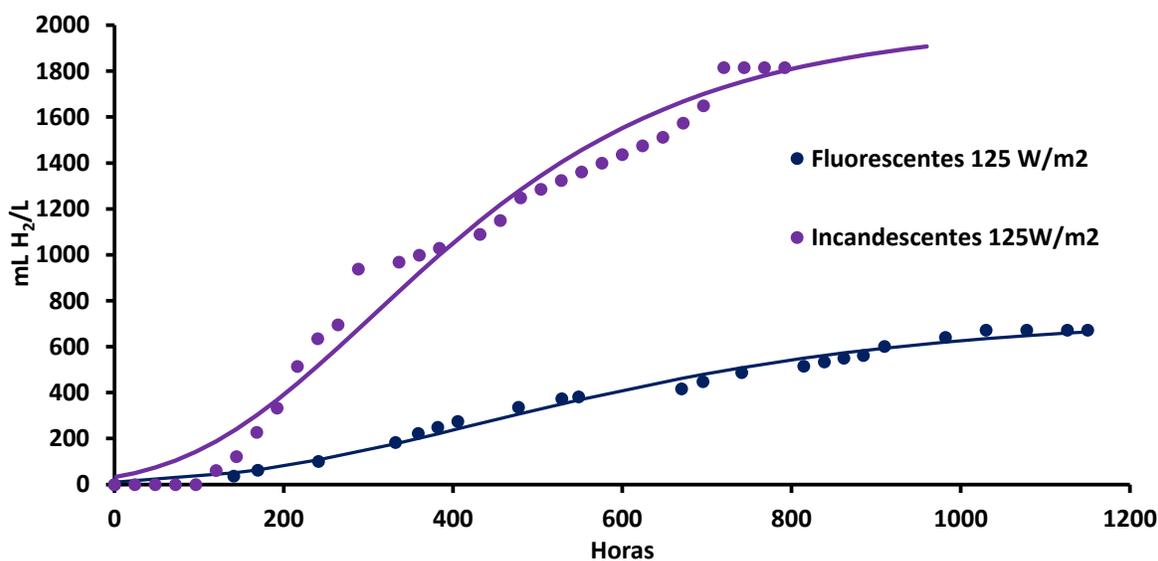


Figura 25. Producción acumulada de hidrógeno con 2 tipos de luz, Fluorescente (azul) e Incandescente (púrpura).

Debido a los resultados se decidió continuar analizando las producciones con las intensidades 333 W/m^2 , 500 W/m^2 y 606 W/m^2 con lámparas incandescentes (Figura 26). En ellos se encontró que la producción de hidrógeno aumenta con la intensidad luminosa. Sin embargo también podemos ver que comienza a aparecer el fenómeno de fotoinhibición a partir de la intensidad de 500 W/m^2 (línea roja) ya que presenta la mayor tasa de

producción pero se reduce la producción acumulada, y finalmente con la mayor intensidad utilizada se observa una completa inhibición en los 606 W/m² con 0 mL de hidrógeno producido (línea negra).

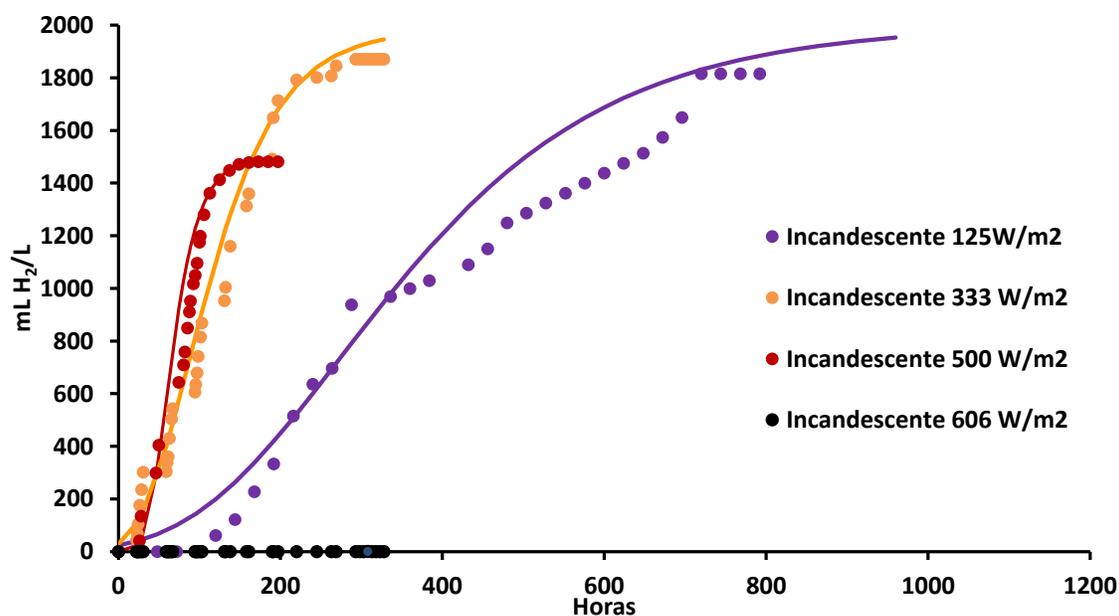


Figura 26. Variación de la producción de hidrógeno con intensidad luminosa (125, 333, 500 y 606 W/m²)

Se puede observar en la figura 24 que la mayor producción de hidrógeno se obtuvo a la intensidad de 333 W/m². Sin embargo, la cinética más rápida se obtuvo a una intensidad de 500 W/m² como se puede observar la tabla de las tasas de producción (Tabla 14).

Tabla 13. Comparación de tasas de producción y producción total

| Intensidad (W/m ²) | Producción total (mLH ₂ /L) | Tasa de producción por fotoperiodo (mLH ₂ /L/d)* |
|--------------------------------|--|---|
| 125 | 1815 | 96 |
| 333 | 1870 | 288 |
| 500 | 1480 | 528 |
| 606 | 0 | 0 |

Se observa también el fenómeno de fotoinhibición, que se advierte en la fotofermentación llevada a cabo a la intensidad de 500 W/m², donde a pesar de tener la mayor tasa de producción, alcanzó menor producción total. Posteriormente el fenómeno de fotoinhibición es evidente a la intensidad de 606 W/m² ya que la producción de hidrógeno no fue cuantificable, este fenómeno se menciona por otros autores y se considera en algunas de las ecuaciones antes mencionadas. En comparación con otros estudios, los resultados obtenidos contrastan con la información encontrada en algunas investigaciones donde se reportan altas producciones de hidrógeno utilizando lámparas fluorescentes (Wen-Hsing Chen 2006; Miyake, Miyake, y Asada 1999; Özgür y Peksel 2013).

Tabla 14. Producción de hidrógeno en diferentes estudios utilizando BPNA inmovilizadas

| Bacteria | Soporte | TPH (mL/L _{cult} /d) | Referencia |
|-----------------------------|---------------------------|-------------------------------|--|
| <i>R. sphaeroides</i> | Filtros de vidrio poroso | 168 - 1419 | (Zagrodnik et al. 2013) |
| <i>R. palustris</i> | Barro | 912 | (C.-Y. Chen y Chang 2006) |
| | Gel Silica | 840 | |
| | Carbón activado | 629 | |
| <i>R. palustris</i> | Barro | 936 | (C.-Y. Chen et al. 2008) |
| <i>R. faecalis</i> | Fibras de carbón activado | 792 | (Xie et al. 2012) |
| <i>Consortio bacteriano</i> | Fibras de estropajo/lufa | 528 | Éste estudio (Optimizado en luz e intensidad) |

Para realizar el análisis de resultados se analizó el espectro de luz emitido por las lámparas incandescentes (Figura 27) y fluorescentes (Figura 28) utilizadas y se comparó con el espectro de absorción reportado (Figura 4). Cabe mencionar que se realizó el análisis del espectro en varios voltajes con las lámparas incandescentes para descartar cualquier efecto de éste sobre el espectro de absorción, sin embargo al realizar un acercamiento en los espectros obtenidos a 63 y 40 volts (Figura 29) se observó que las lámparas emiten luz en el mismo rango pero con menor intensidad relativa.

Con la información anterior acerca de los espectros emitidos por las lámparas y los picos de absorción máxima para las bacterioclorofilas, se puede inferir por qué las lámparas fluorescentes no resultaron efectivas para la producción de hidrógeno, ya que el rango de absorción de las bacterioclorofilas oscila entre los 700 y 900 nm, y en el caso específico de la bacterioclorofila a, presenta un pico de absorción a 791 nm (Figura 30).

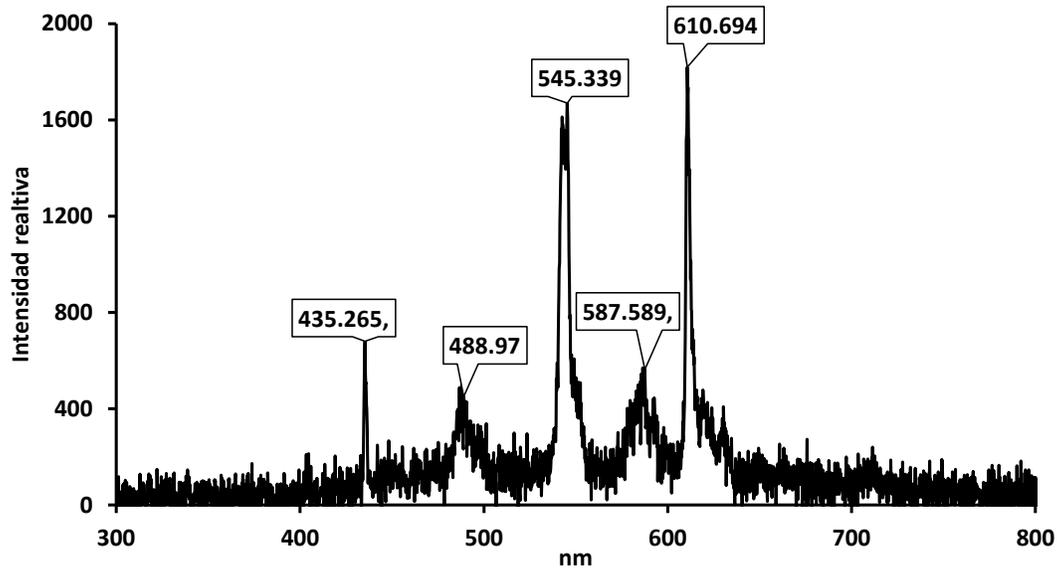


Figura 27. Espectro de luz de lámparas fluorescentes utilizadas

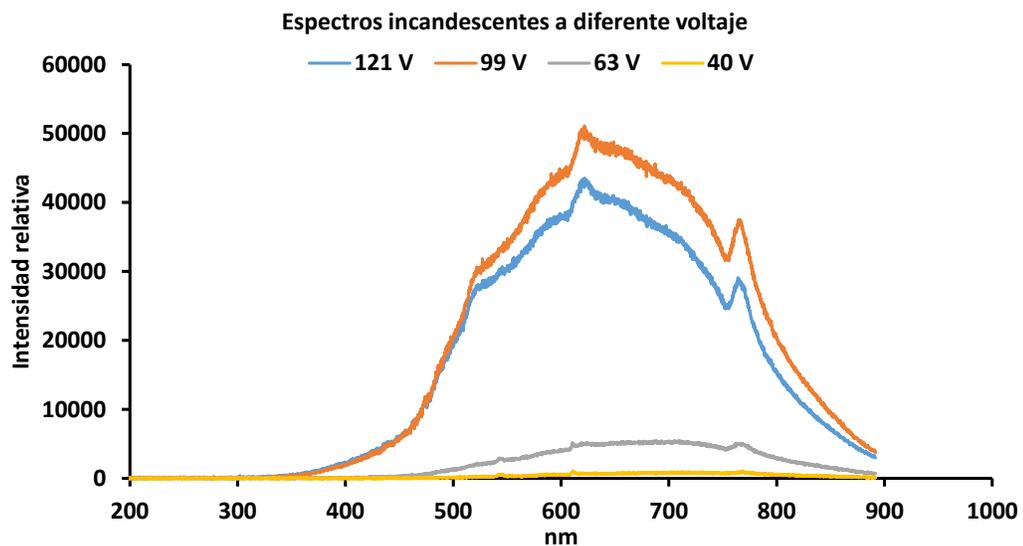


Figura 28. Espectro de luz de lámparas incandescentes utilizadas en 4 voltajes diferentes

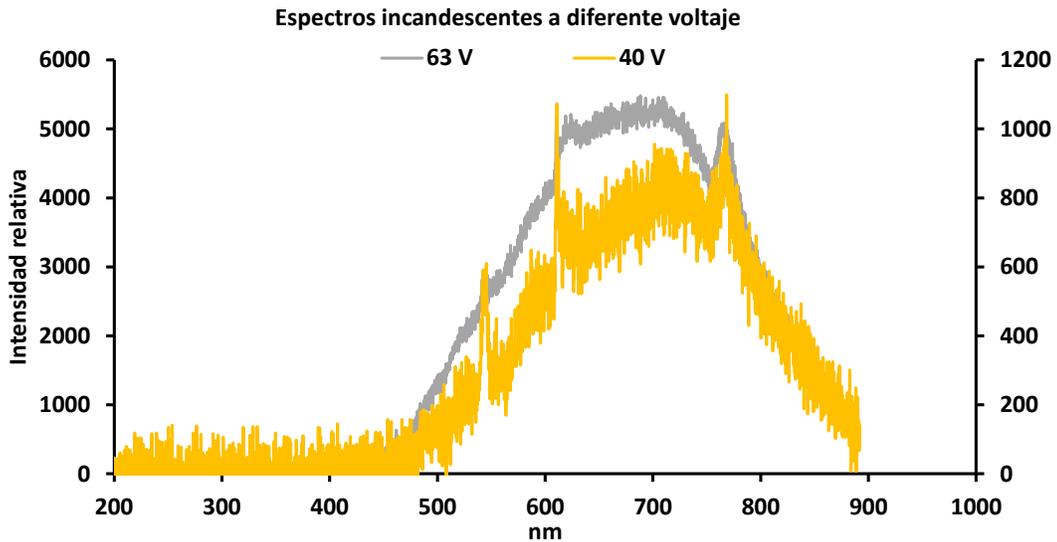


Figura 29. Acercamiento al espectro de 64 y 40 Volts

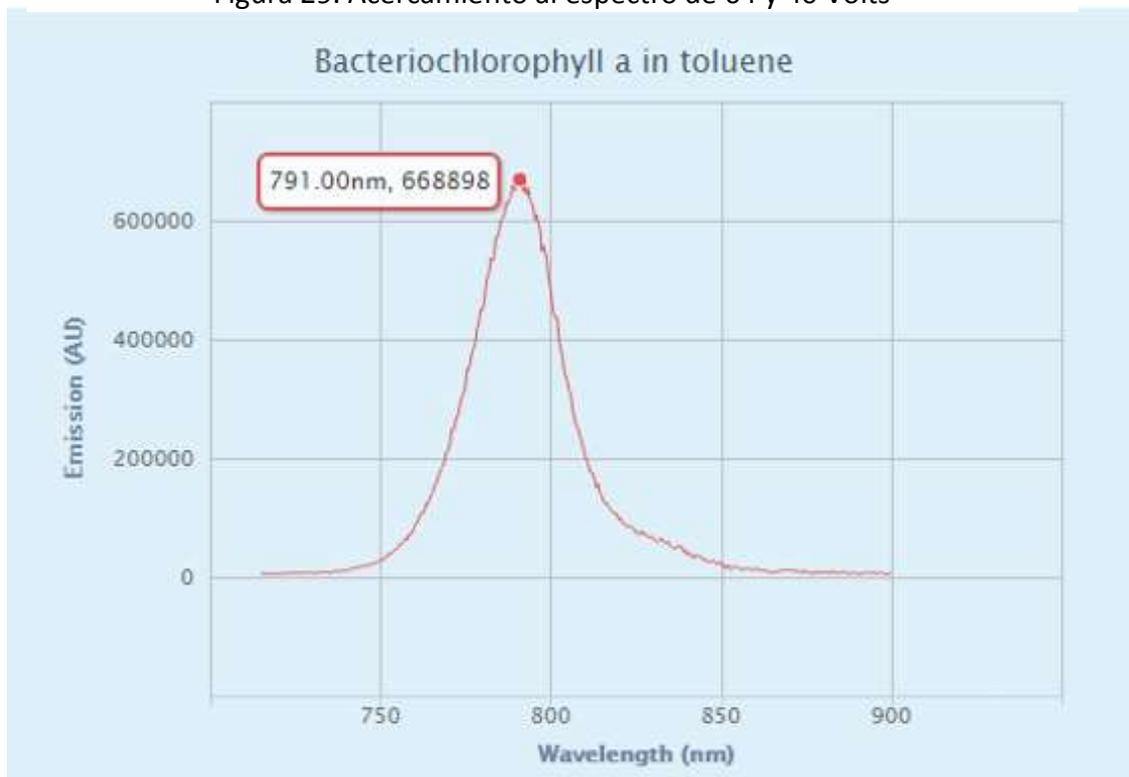


Figura 30. Pico de absorción de la Bacterioclorofila a (Bcha)
Fuente : adaptada de(Gottstein y Scheer 1983)

La capacidad de absorber luz a longitudes de onda de 700 a 900 nm (infrarroja), según algunos autores responde a la necesidad de adaptación, ya que este tipo de luz penetra un poco más profundo que la del espectro visible, permite el crecimiento sin competir con microalgas ni cianobacterias. (Frigaard, Larsen, y Cox 1996; Hayashi, Miyao, y Morita 1982). Este argumento justifica el fenómeno de fotoinhibición ya que los consorcios no están

comúnmente expuestos a radiaciones tan altas como las emitidas y por periodos tan prolongados como en laboratorios por lo que puede afectar su capacidad de respuesta. En los casos mencionados anteriormente pudimos observar el efecto de la fotoinhibición en la producción de hidrógeno, sin embargo el cultivo presentó crecimiento en el soporte desde 70 mg SV/cm³ a 180 mg SV/cm³. A su vez fue posible encontrar poca producción de hidrógeno (Figura 31).



Figura 31. Generación de hidrógeno en cultivos altamente radiados.

También es posible que la temperatura disminuya la actividad de la enzima nitrogenasa ya que las lámparas incandescentes y la luz infrarroja se caracterizan por incrementar la temperatura. Está reportado que por encima de los 30°C la nitrogenasa empieza a perder

su actividad, dependiendo del organismo en el que se encuentre (Waughman 1977). Algunas investigaciones han probado bajo sistema in-vivo e in-vitro las actividades de ciertas enzimas productoras de hidrógeno, reportando que a bajas temperaturas ésta tiene mejores eficiencias, sin embargo, la actividad in-vivo varía dependiendo del organismo (Prévost, Antoun, y Bordeleau 1987; RAO 1977).

5.2 Evaluación del efecto de los metales hierro y molibdeno sobre producción de hidrógeno

Durante la evaluación del efecto de los metales hierro y molibdeno en la producción de hidrógeno se utilizaron medios de cultivo modificados. Con reducciones en las concentraciones de metales traza se obtuvieron porcentajes de remoción de AGV, por encima del 90%. Los mejores resultados para la remoción de AGV se obtuvieron en el tratamiento de menores concentraciones de metales traza (- -) así como también se la mayor producción de hidrógeno se obtuvo en el mismo tratamiento (

Figura 32).

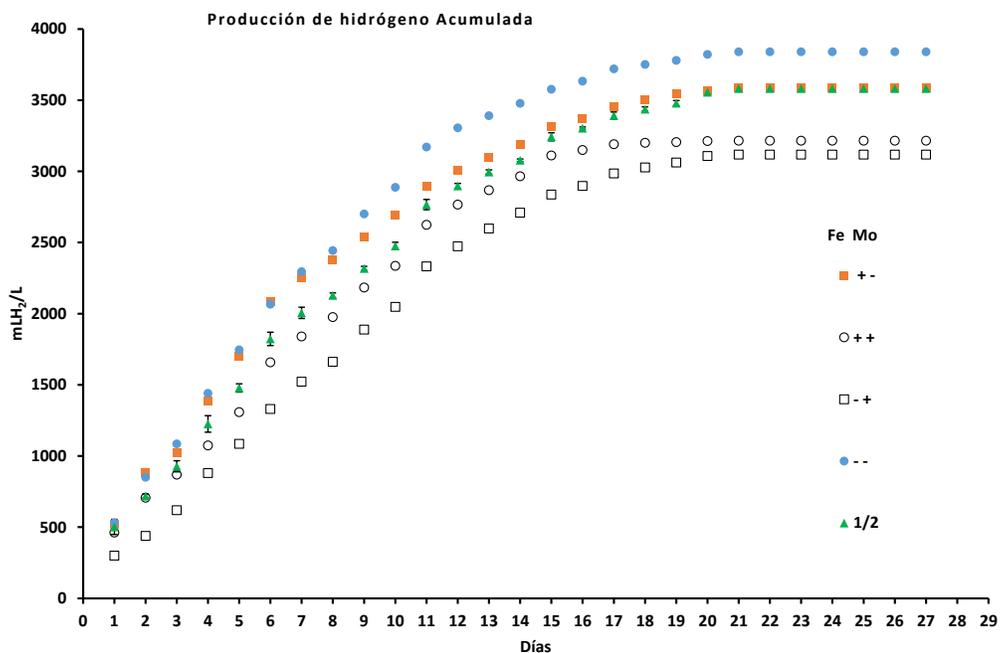


Figura 32. Producción acumulada de hidrógeno por tratamiento. Experimento metales-
producción

Se realizó el análisis con un intervalo de confianza del 95%, el cual arrojó la ecuación () para la producción de hidrógeno en función de la concentración de metales traza.

$$H^{\circ} = H_{\max} - 867.187*[Mo] - 326.738*[Fe] + 501.705*[Mo]*[Fe] \quad (6)$$

La ecuación anterior describe que la producción de hidrógeno es afectada negativamente principalmente por la concentración del molibdeno con un valor de -867.187, mientras que el valor para el efecto del hierro es de -367.738 y la interacción del ambos metales fue de 501.70. Esta ecuación sobre los efectos contrasta con el diagrama de Pareto que muestra que la única variable que afecta significativamente la producción de hidrógeno es la concentración de hierro.

Tabla 15. Análisis de varianza del efecto de los metales sobre la producción hidrógeno

| Factor | Suma de Cuadrados | GL | Valor cuadrático medio | F-coef | P-valor |
|---------------|--------------------|--------|------------------------|---------------|------------------|
| A:Hierro | 630746. | 1 | 630746. | 32.81 | 0.0012 |
| B:Molibdeno | 15872.3 | 1 | 15872.3 | 0.83 | 0.3986 |
| AB blocks | 69426.6 275774. | 1 1 | 69426.6 275774. | 3.61 14.35 | 0.1061 0.0091 |
| Lack-of-fit | 188967. | 5 | 37793.5 | 1.97 | 0.2172 |
| Pure error | 115344. | 6 | 19224.1 | | |
| Total (corr.) | 1.29613E6 | 15 | | | |

Lo anterior se puede corroborar con diagrama de Pareto (Figura 33) donde se puede observar claramente el efecto negativo que tiene el hierro sobre la producción de hidrógeno en nuestro sistema. A pesar que el molibdeno también posee un efecto negativo, éste no llega a ser estadísticamente significativo. En contraparte se puede observar el efecto positivo de ambos metales en conjunto, sin embargo tampoco llega a ser un factor significativo.

Diagrama de Pareto efecto estandarizado

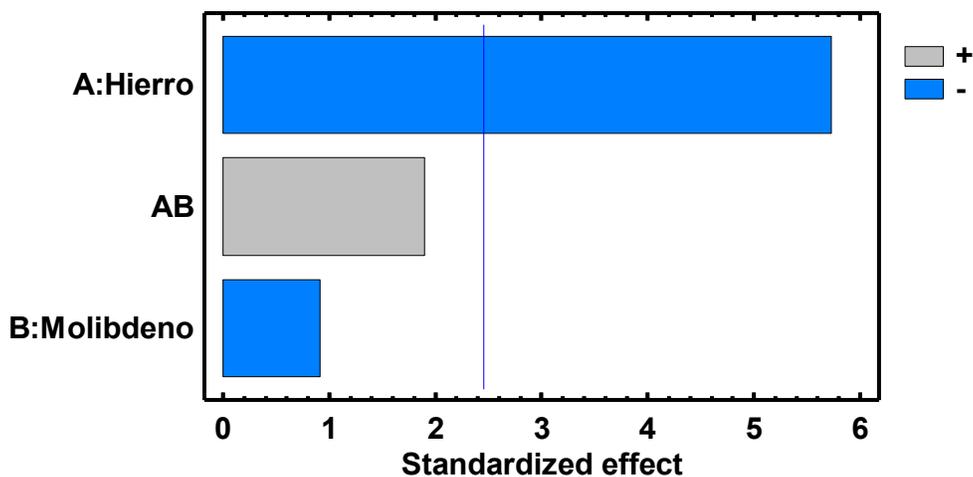


Figura 33. Diagrama de Pareto para el efecto estandarizado de los metales en la producción de hidrógeno

Al analizar la superficie de respuesta obtenida por el software confirma que la reducción en la concentración de los metales hierro y molibdeno provoca una mayor producción de hidrógeno. Sin embargo, como se puede observar en la superficie de respuesta, no se obtuvo el valor óptimo de ninguno de los metales puesto que no presenta curvatura.

Superficie de respuesta

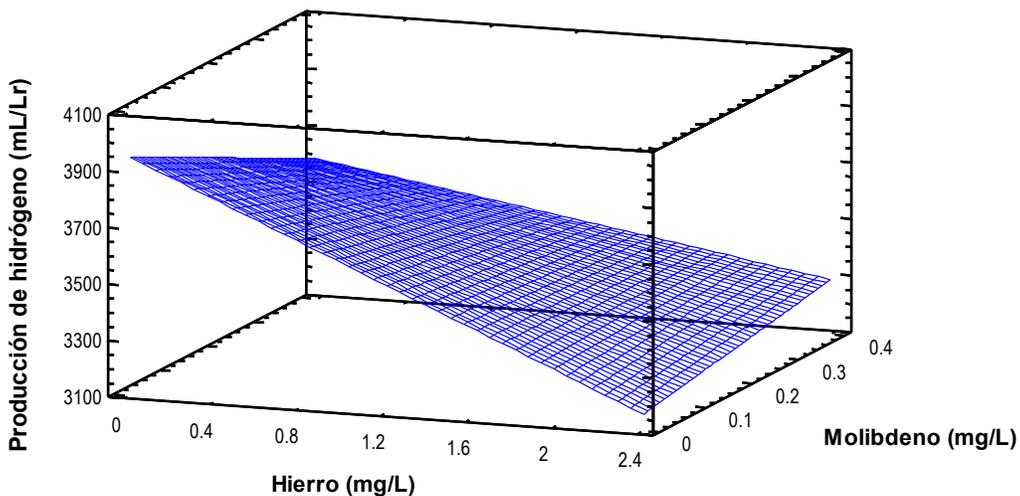


Figura 34. Superficie de Respuesta para la producción de hidrógeno y el efecto otorgado por la concentración de metales traza.

Posteriormente se realizó el ajuste con la ecuación de Gompertz para comparar los resultados obtenidos en la producción de hidrógeno (Tabla 16), donde se observa la mayor

tasa de producción corresponde al tratamiento con las menores concentraciones de hierro y molibdeno

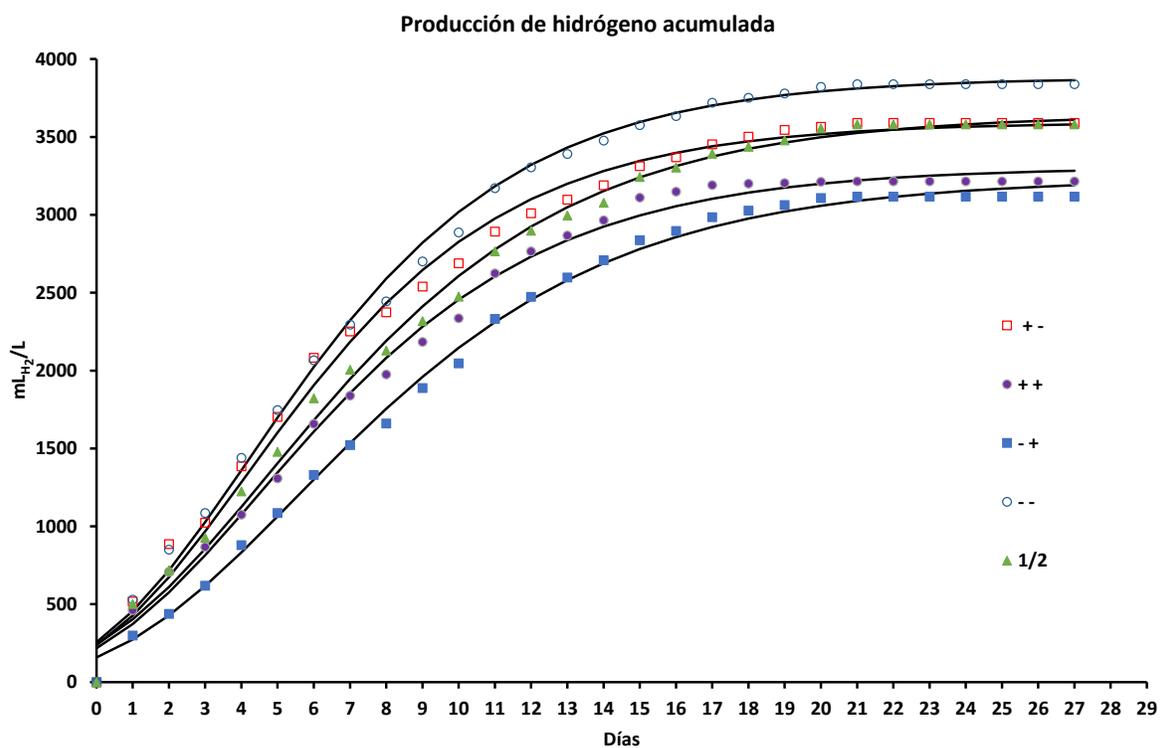


Figura 35. Tasa de producción de hidrógeno por tratamiento calculadas con la ecuación de Gompertz

Tabla 16. Tasas de producción por tratamiento utilizando el modelo de Gompertz

| Tratamiento | Hmax | λ | m | TPH (mL/L/d) |
|-------------|------|-----------|-----|--------------|
| - + | 3234 | 0.5 | 237 | 237 |
| + + | 3307 | 0 | 269 | 269 |
| 1/2 | 3645 | 0 | 280 | 280 |
| + - | 3594 | 0 | 320 | 320 |
| -- | 3881 | 0 | 340 | 340 |

*TPH (Tasa de producción de hidrógeno)

Al mismo tiempo observamos otros aspectos importantes como fueron el consumo de AGV y la producción de SSV. En la producción de sólidos suspendidos volátiles (Figura 36) se puede observar que los cultivos que generaron más biomasa fueron los del tratamiento con concentraciones altas de hierro (2336 $\mu\text{g/L}$) y bajas concentraciones de molibdeno (10 $\mu\text{g/L}$).

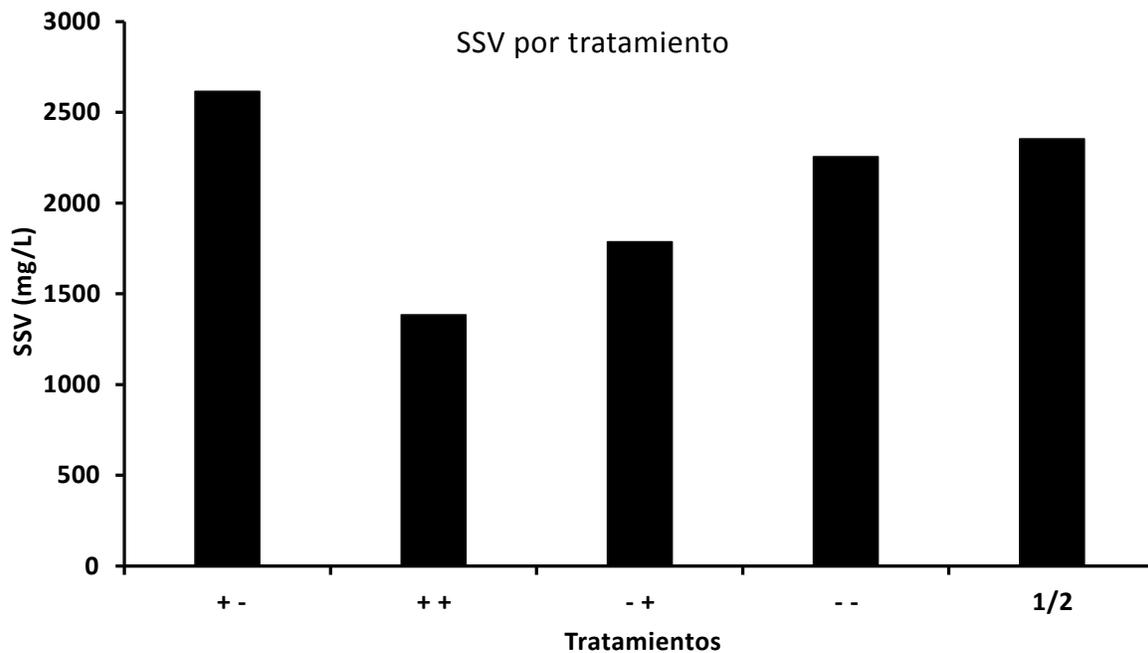


Figura 36. Concentración de sólidos suspendidos en los diferentes tratamientos (Fe y Mo). La mayor concentración se encontró en el tratamiento que contuvo 2366 $\mu\text{g/L}$ de hierro y 10 $\mu\text{g/L}$ de molibdeno

Por la parte del consumo de sustrato se encontró que en todos los tratamientos hubo un consumo equitativo. Los ácidos grasos fueron consumidos por encima del 90% siendo el

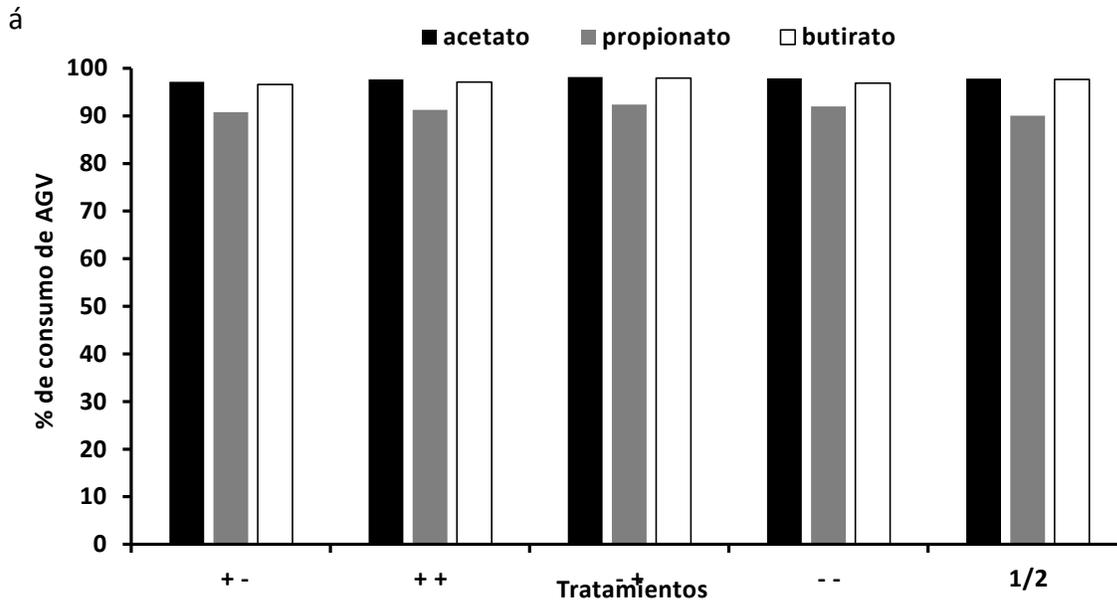


Figura 37. Porcentaje de consumo de ácidos grasos volátiles (AGV) por tratamiento

Los cultivos de los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas en la producción de hidrógeno, diferencia que se observó estadísticamente. Sin embargo la

producción de biogás fue similar y la diferencia en las producciones se generó debido a la proporción de hidrógeno encontrado en los diferentes tratamientos (Tabla 17).

| Tratamientos | mL/L de biogás | % de H ₂ |
|--------------|----------------|---------------------|
| + - | 6229.62 | 77 |
| + + | 6170.37 | 66 |
| - + | 6362.96 | 67 |
| - - | 6770.37 | 75 |
| 1/2 | 6516.6 | 75 |

Tabla 17. Promedio de producción de mL de biogás por tratamiento y porcentaje promedio de hidrógeno por tratamiento

Como se puede observar en la tabla anterior, la mayor producción de hidrógeno corresponde al tratamiento con la menor concentración de metales (- -), pero la mayor proporción de hidrógeno en el biogás corresponde al tratamiento (+ -), que como se ha observado en el experimento, es el tratamiento más competitivo.

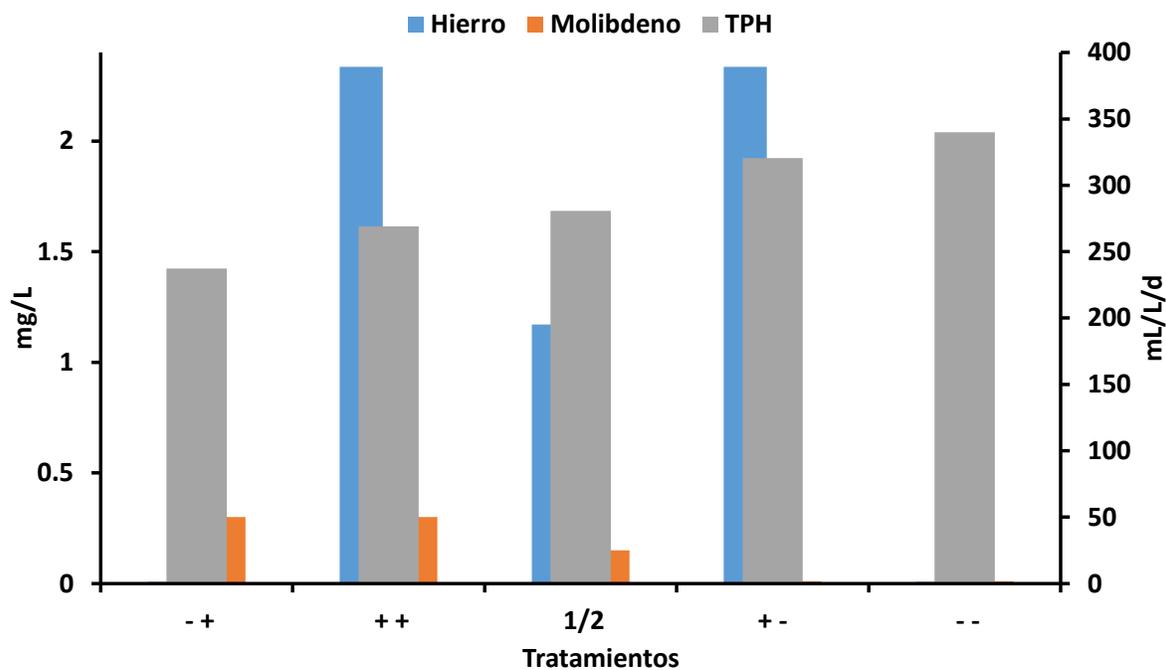


Figura 38. Tasas de producción de hidrógeno (gris), Concentración de hierro (azul) y molibdeno (naranja) de los diferentes tratamientos

Como se observa en las tasas de producción de hidrógeno en función de la concentración de metales (Figura 38), se encuentra una relación directa con la concentración de molibdeno especialmente. Como se mencionó anteriormente que la ecuación que describe el efecto de los metales traza en la producción, demostró que el efecto significativo corresponde al hierro, pero el coeficiente más alto corresponde al molibdeno. La justificación de esto reside en la naturaleza de los microorganismos involucrados en el proceso y se explica a continuación.

Tomando como referencia al microorganismo *Rhodospseudomonas palustris*, se puede observar que tienen una gran capacidad de adaptación. Por el análisis de su genoma (Figura 39) se pudieron resaltar aspectos que revelan su capacidad de adaptación a diferentes ambientes a través de los metabolismos presentes, como son la capacidad de degradación de varios compuestos, incluyendo los ácidos grasos volátiles (verde), así como las 3 nitrogenasas encontradas en su genoma (naranja).

Como es bien sabido las bacterias presentan un único cromosoma y hacen uso de plásmidos para recombinar y compartir secuencias de ADN, debido a estos mecanismos la regulación genética de las bacterias es un poco diferente, y en algunos aspectos más sencilla. El clásico ejemplo de un operon es el Lac-operon, cuya expresión está regulada por la presencia de lactosa, mientras haya lactosa en el medio la expresión de la lactasa será promovida.

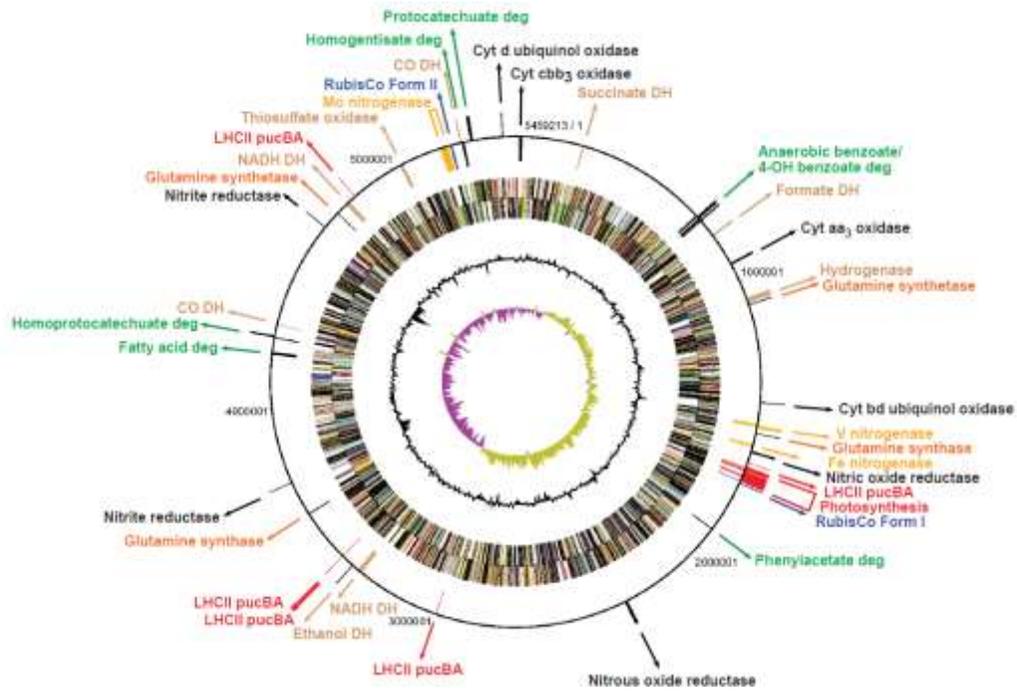


Figura 39. Conceptualización gráfica del genoma de *Rhodospseudomonas palustris* donde se resaltan sus metabolismos y proteínas características.

Dentro del genoma de *R. palustris* se encuentran 2 operones (Larimer et al. 2004), donde 1 de ellos es el de la expresión para las diferentes nitrogenasas. El operón fue descrito como *mopA-modABC* y se refiere a la represión de Fe-nitrogenasa por molibdeno. La transcripción del gen *anfA* es reprimida por dos reguladores, MopA y MopB, que son estructuralmente similares al ModE en *E. coli*.

Los reguladores tipo ModE, que consisten en una C-terminal molibdato y un N-Terminal para el dominio de unión de ADN, actúan como un solo componente regulador, sensando y respondiendo al estatus de Mo.

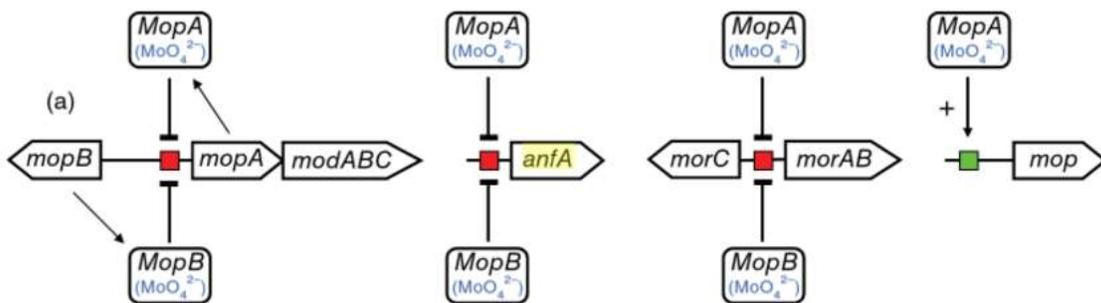


Figura 40. Operon para la regulación de las nitrogenasas. *anfA* corresponde al gen para la hierro-nitrogenasas. *mop* corresponde al gen para la molibdeno-nitrogenasa

Al observar los resultados se puede evidenciar exactamente la función de este operón. En los niveles altos de molibdeno (- + y +) se tienen las menores tasas de producción de hidrógeno, por lo que se puede inferir que la producción de la enzima Mo-nitrogenasa está en mayor proporción que la Fe-nitrogenasa. Esta hipótesis se basa en el hecho de que las 3 nitrogenasas presentan diferentes tasas de producción (Figura 41), siendo la Fe-nitrogenasa la de mayor tasa, 9 veces mayor que la Mo-nitrogenasa.

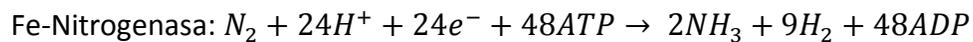
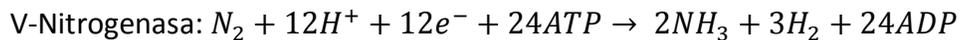
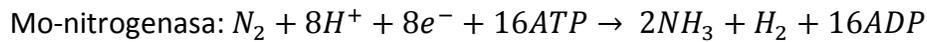


Figura 41. Reacciones ilustradas de las 3 diferentes nitrogenasas - Metaloproteínas de Fe, Mo, V

Algunos investigadores han estipulado que la Fe-nitrogenasa es una proteína reliquia, vestigio de una tierra en la que las condiciones ambientales eran muy diferentes a las actuales, mencionan también que la preferencia por esta enzima desde el punto de vista metabólico, es debido a que la enzima Mo-nitrogenasa es capaz de reducir más rápido el N_2 (Smith, Richards, y Newton 2004). Entonces, la pregunta obligada es, por qué si genera más protones la Fe-nitrogenasa existe una preferencia metabólica hacia la Mo-nitrogenasa. La respuesta obtenida hasta el momento es que la reducción de sustratos como el N_2 requiere muchos procesos metabólicos previos, en los cuales la producción de ciertos cofactores determinarán la presencia de una u otra enzima, junto con los operones reguladores (Smith, Richards, y Newton 2004). Debido a que la experimentación realizada solo permitió identificar estos fenómenos indirectamente, es necesario hacer mención que se necesitan analizar estos aspectos bajo nuevos experimentos bajo la directa observación de la producción de las diferentes nitrogenasas y sus actividades dentro del consorcio.

5.3 Evaluación del desempeño del fotobiorreactor piloto en condiciones ambientales para la producción de hidrógeno

El fotobiorreactor piloto (Figura 42) se construyó bajo la guía del diseño descrito anteriormente (Figura 20). El cual fue operado en lotes. Se utilizó el mismo consorcio en las etapas previas. Asimismo, se empleó estropajo o lufa como soporte para fijar a los

microorganismos. Se utilizó el medio optimizado (reducido en concentración de metales traza) con el objetivo de obtener las mayores tasas de producción fuera de laboratorio y poder comparar con los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio.

Como se ha mencionado anteriormente, el criterio diseño fue el índice superficie/volumen (m^{-1}), el cual es directamente proporcional a la radiación luminosa que es capaz de absorber. El fotobiorreactor diseñado presenta un índice de 106.39 m^{-1} siendo únicamente superado por Gianelli en el 2012 (Tabla 18).

Tabla 18. Comparación del Índice S/V del FBR piloto frente a otras investigaciones

| Tipo de FBR | Volumen (L) | Superficie/volumen (m^{-1}) | Referencia |
|-------------|-------------|--|-----------------------|
| Tubular | 3 | 106.3 | Este estudio |
| Tubular | 50 | 30.4 | (Adessi et al, 2012) |
| Tubular | 8 | 121.8 | (Gianelli, 2012) |
| Tubular | 80 | 25 | (Boran et al, 2010) |
| Tubular | 100 | 13.8 | (Gebicki et al, 2010) |

El fotobiorreactor se operó (Tabla 19) en los meses de noviembre-diciembre de 2015 y de enero-abril de 2016, con un total de 150 días bajo condiciones ambientales. Se observó en el mes diciembre dificultad para iniciar la fermentación debido a las bajas temperaturas reportadas en esos meses ($5 -15 \text{ }^\circ\text{C}$), condiciones que tras un breve tiempo de producción de hidrógeno condujeron a la proliferación de otros microorganismos como las microalgas (Figura 44).



Figura 42. Fotobiorreactor piloto utilizado para evaluar el desempeño de la producción de hidrógeno en condiciones ambientales.

Tabla 19. Condiciones de operación y medición

| | |
|------------------------|--|
| Temperatura (°C) | Ambiental (10-35) |
| Recirculación (mL/min) | 4 |
| Iluminación | Solar |
| Medio | Medio productor - optimizado (reducido hierro y molibdeno) |
| Parámetros de medición | pH, Temperatura, ORP |
| Recolección gas | Probeta invertida |
| Inóculo (mg/L) | 300 |

La proliferación de microorganismos indeseables como microalgas produjo un incremento en el pH, de un valor de 7.5 a 9.4 (Figura 43), comportamiento que se observó 3 veces en 3 meses. Esto fue debido a que las microalgas consumen el bicarbonato del medio generando una elevación del pH. En este periodo observamos que la temperatura y radiación luminosa diaria podría estar afectando a las bacterias ya que no lograban competir con las microalgas. Debido a esto se instaló un control de temperatura en el sistema para observar el efecto resultante. El control de temperatura consistió en un espiral de manguera sumergida en agua dentro de un termo, que a su vez contenía un calentador de alta potencia para responder rápidamente a los cambios de temperatura por la noche. El calentamiento ocurrió al recorrer el espiral sumergido en agua caliente, transfiriendo el calor al sistema, logrando así mantener un rango de 20-30 °C

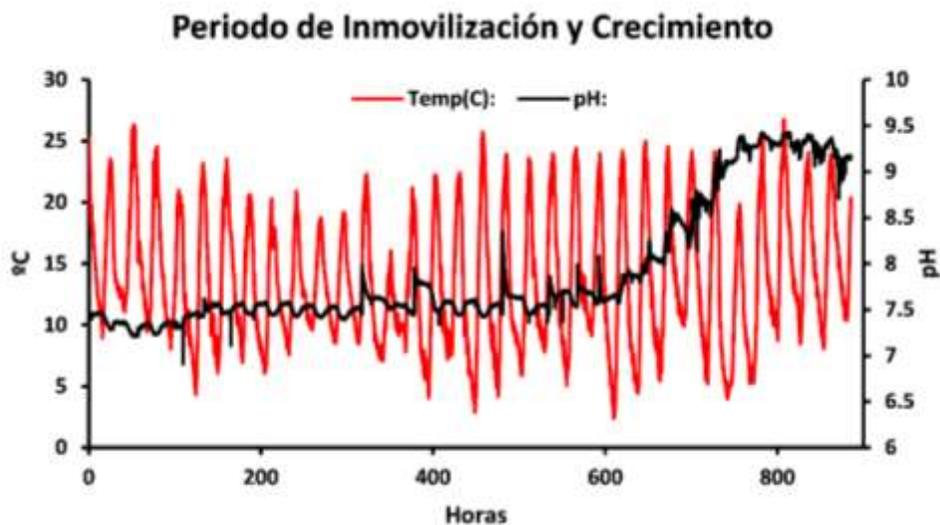


Figura 43. Cambio de pH en el periodo de inmovilización coincidió con la presencia de microalgas en el cultivo

El control de temperatura permitió el desarrollo del cultivo (Enero-febrero), sin embargo no se observó producción durante ese periodo, fenómeno que se adjudica a la baja-

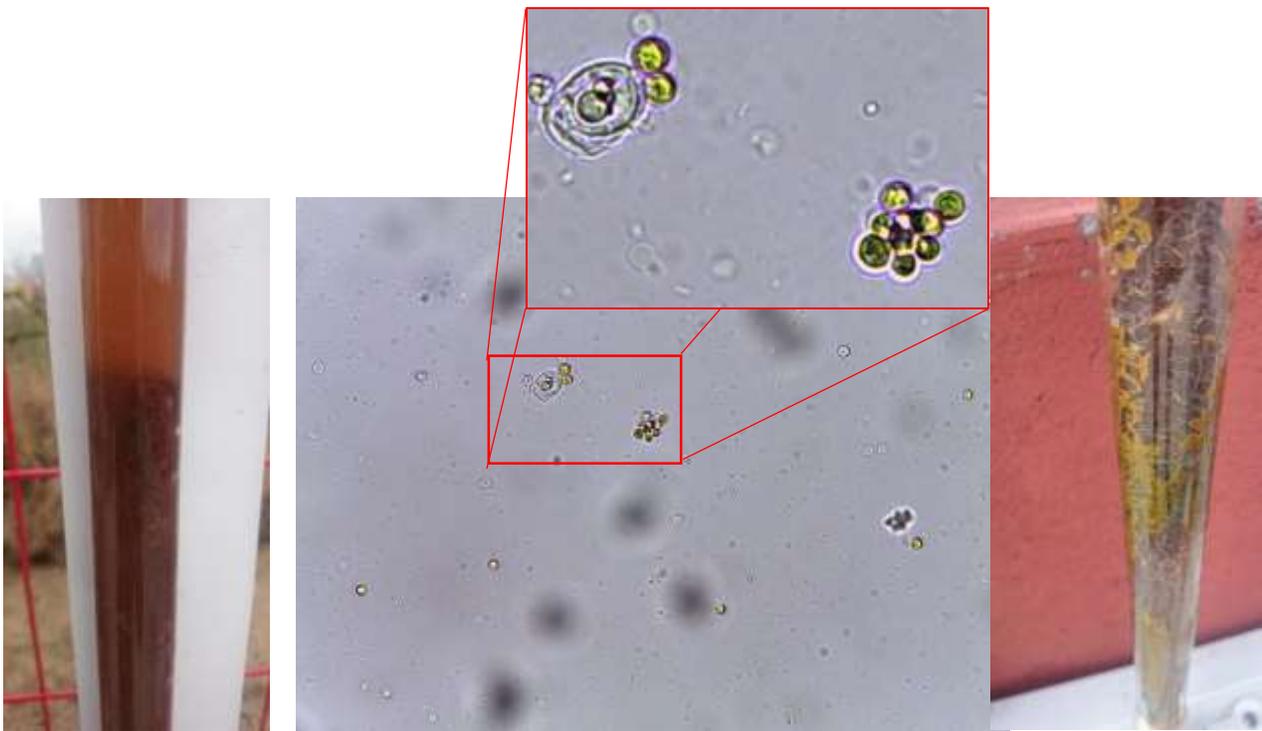


Figura 44. Cultivo en producción sin contaminación (izq.). Inspección por microscopia de cultivo contaminado (central). Cultivo contaminado por microalgas (der.)

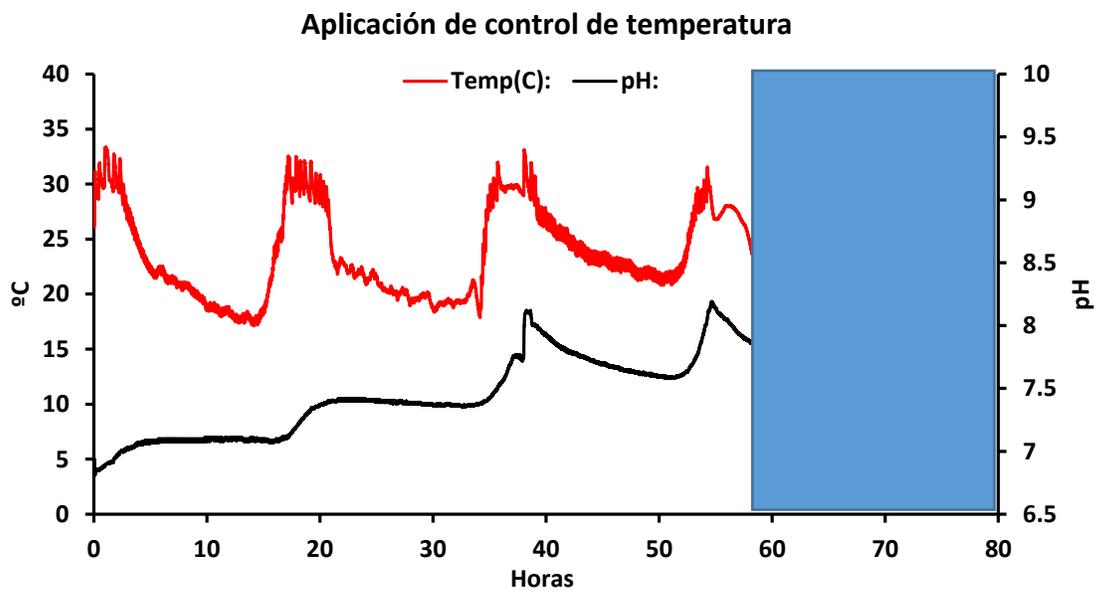


Figura 45. Fragmento del periodo de colonización en enero- febrero (80 h) donde se observa el cambio de temperatura y pH tras remover el control de temperatura a las 60 h (azul)

-intensidad de radiación luminosa de los meses invernales. Dentro de ese periodo se registró un periodo de 72 h (Figura 45), durante el cual se puede observar el impacto que la temperatura tiene sobre el crecimiento de las bacterias púrpura, ya que la colonización se realizó con éxito y no se observó predominio de microalgas con el control de temperatura dentro del sistema.

Se pudo observar que en los días con control de temperatura, el pH se mantiene en un rango de 7-7.5. Sin embargo, en las primeras horas después de remover el control de temperatura el cultivo presenta un incremento en el pH con tendencia a establecerse en un valor de 9. Es por ello que se determinó necesario mantener un rango de temperatura de 20-35 °C para permitir el crecimiento bacteriano. Posterior al proceso de colonización y con el inicio de marzo, se observó un incremento en la radiación solar y se logró el proceso fotofermentativo con éxito, obteniendo una cinética de producción estable (Figura 46). Para analizar los resultados se realizó un ajuste de Gompertz.

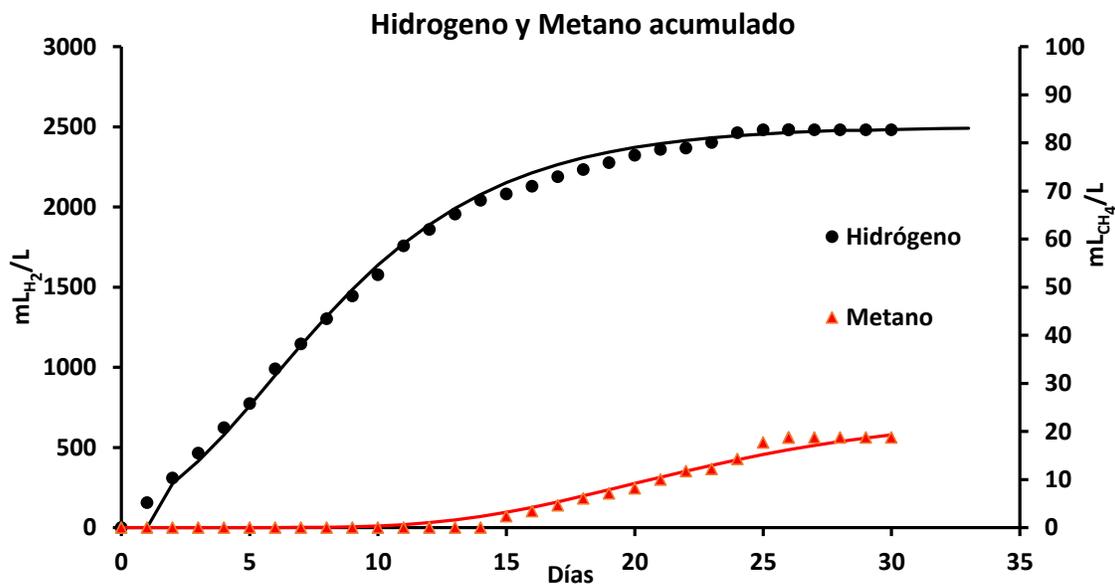


Figura 46. Cinética de producción de hidrógeno en reactor piloto bajo condiciones ambientales (marzo-abril)

Tal como se mencionó anteriormente, la radiación solar en el mes de marzo permitió la fotofermentación, lo cual nos permitió además conocer el comportamiento del consorcio

en condiciones ambientales. En los días 10-14, en la curva ascendente de la producción de hidrógeno (Figura 47), se observó que el pH es bastante estable con un valor de 7.5, siendo congruente con las observaciones anteriores. Bajo estas condiciones se promueve un ambiente favorable para la producción de hidrógeno, y no se permite la predominancia de microalgas. Por el contrario a lo observado, al final del proceso el pH se elevó a un valor de 9 y se observó presencia de microalgas nuevamente.

Tabla 20. Ajuste de Gompertz de las tasas de producción por fotoperiodo natural en condiciones de irradiancia solar

| Gas | Tasas de producción (mL/L/d) |
|-----------|------------------------------|
| Hidrógeno | 337 |
| Metano | 2 |

*La tasa de producción consideró 13.5 horas de luz

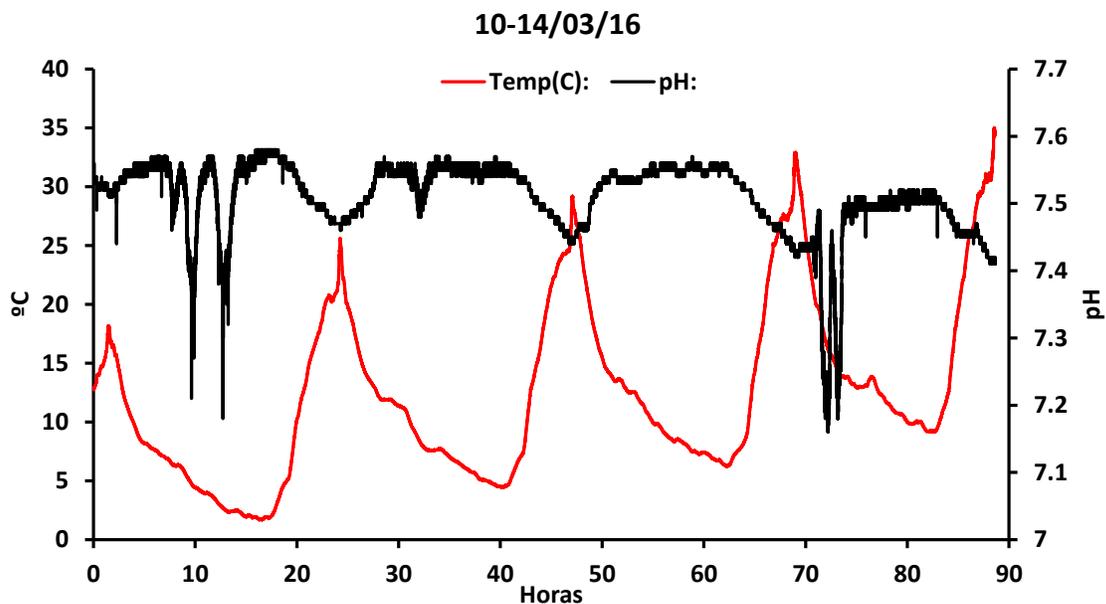


Figura 47. Comportamiento del pH y temperatura en los días 10-14 de marzo. Con estabilidad 7.5

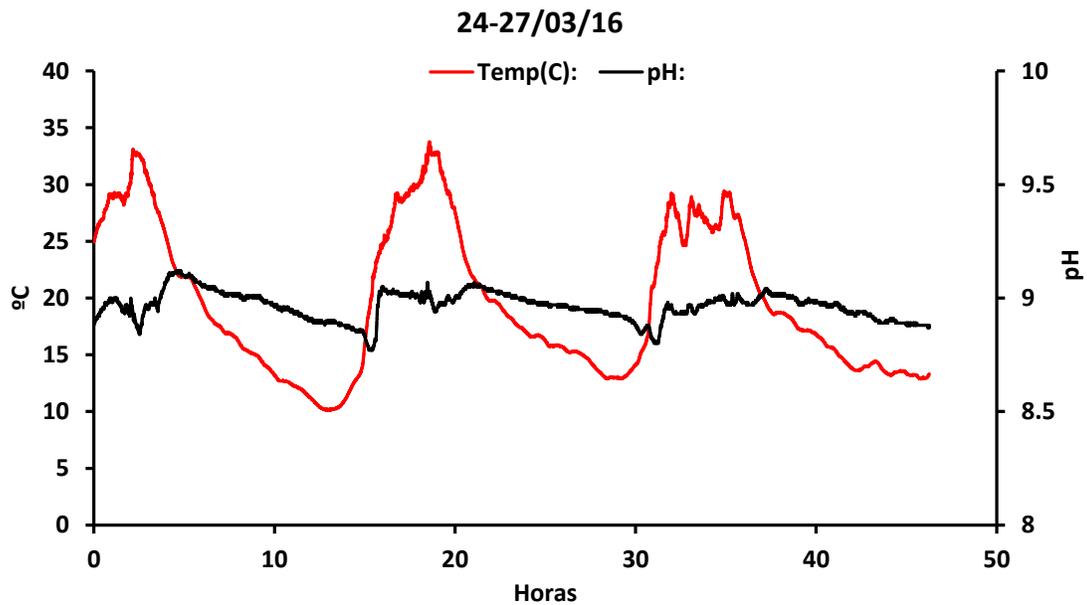


Figura 48. Comportamiento del pH y temperatura del cultivo en los días 24-27 de marzo. El pH se elevó a un valor de 9 y se observó proliferación de microalgas

Los fenómenos observados en la evaluación del reactor piloto pueden deberse a flexibilidad metabólica que presentan las bacterias púrpura, en especial la *Rhodospseudomonas palustris*. Algunos investigadores han reportado que la capacidad de fijar nitrógeno molecular se extiende no únicamente al uso del nitrógeno molecular, sino también a fuentes de nitrógeno como el glutamato, por lo que se podrá encontrar nitrógeno amoniacal a medida que el cultivo mantenga la producción de hidrógeno. Al alimentar nitrógeno amoniacal al sistema, se empieza a crear un ambiente favorable para las microalgas; para el momento en que las bacterias se ven reducidas en sustrato las microalgas poseen ya un ambiente rico en amonio y pH favorable para su crecimiento y comienza la proliferación.

Algunas investigaciones sobre el impacto del pH en la producción de hidrógeno se puede observar que el mejor rango para fotofermentación se encuentra entre 7-7.5, sin embargo, los estudios se han realizado con cepas puras, por lo que se puede esperar un poco de variación en cultivos con consorcio como el nuestro (Zagrodnik y Laniecki 2015).

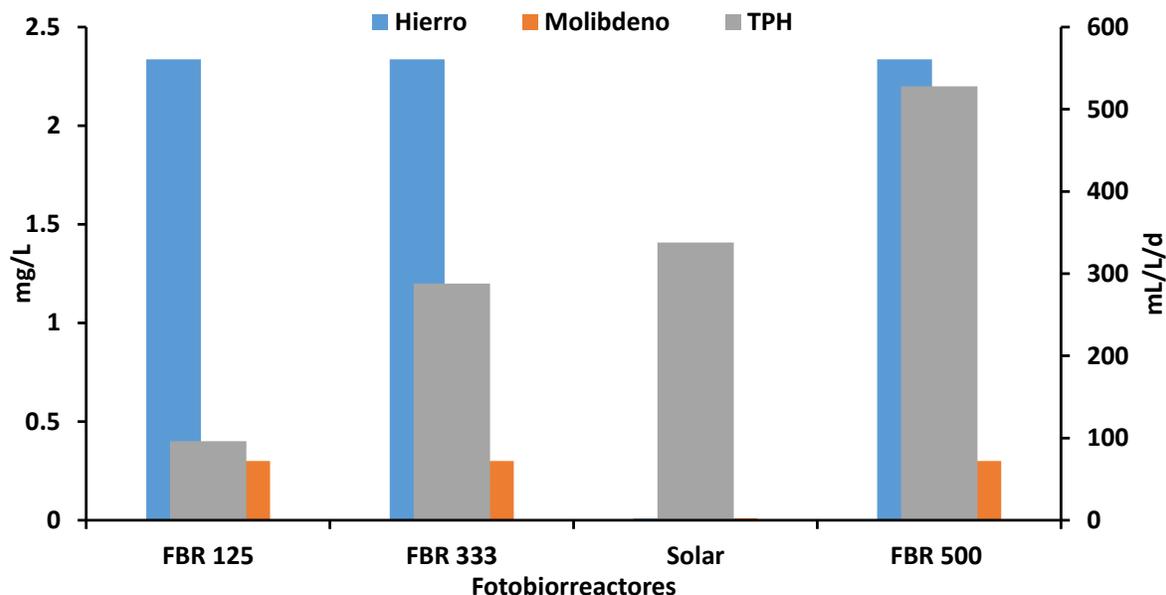


Figura 49. Comparación de las tasas de producción de hidrógeno (TPH) de los reactores escala laboratorio vs el reactor piloto (solar).

El reactor piloto en condiciones ambientales presentó una tasa de producción superior (Figura 49) al reactor escala laboratorio utilizando lámparas incandescentes iluminado a una intensidad de 333 W/m² (FBR 333). Sin embargo el reactor piloto en condiciones ambientales fue optimizado en cuanto a las concentraciones de hierro y molibdeno (reducción), a diferencia del FBR 333, que utilizó el medio de cultivo con altas concentraciones de los metales.

Por último se compararon las tasas de producción de hidrógeno de los 3 experimentos realizados, que incluyen los fotobiorreactores utilizando lámparas incandescentes y fluorescentes a 3 intensidades 125, 333, 500 W/m² (FBR 125, FBR333 y FBR500), también se incluyen las fotofermentaciones en botella con sus etiquetas correspondientes (++, --, +-, -+) en función a la concentración de metales, y el reactor piloto (Solar) además se agregaron un par de experimentos de otras investigaciones y se etiquetó la concentración de hierro y molibdeno en mg/L (Figura 50). En esta comparación de resultados podemos observar que el reactor solar tiene una tasa de producción similar al tratamiento (- -) que se realizó a 333 W/m², lo que presenta congruencia con los resultados ya que ambos están optimizados en concentraciones de metales traza y ambos se sometieron a periodos de luz

similares 12/12 para el tratamiento (--) y 13.5/10.5 para el reactor piloto que es el promedio de luz solar en Querétaro en los meses de Abril-Mayo.

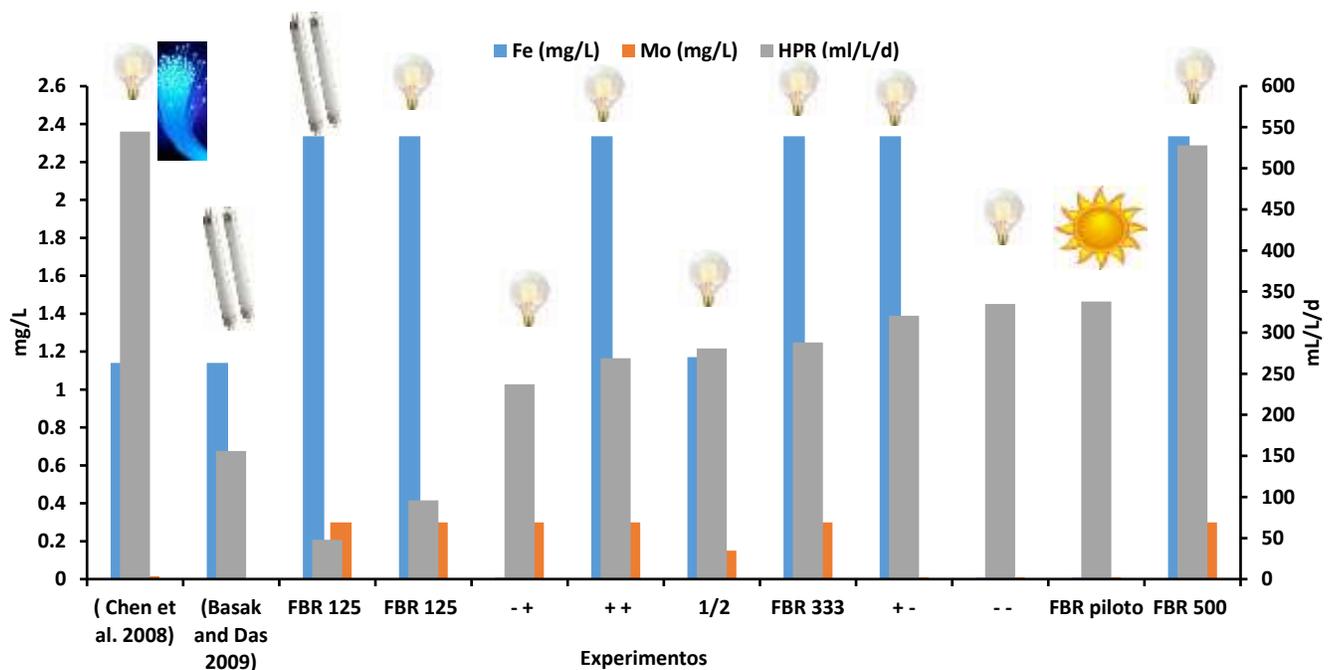


Figura 50. Comparación de los 3 estudios, reactores escala laboratorio FBR a diferentes intensidades, los tratamientos en botellas y el reactor piloto (solar) además de otras investigaciones.

Con las lámparas incandescentes y fluorescentes, observamos que en las investigaciones realizadas por Chen 2008 y Basak 2009 se reportan resultados similares a los de esta investigación, en el caso de Chen 2008, utilizó lámparas incandescentes y fibra óptica para proveer luz por dentro del reactor, así como bajas concentraciones de molibdeno y altas de hierro, por lo que los resultados obtenidos fueron muy parecidos a los nuestros en el reactor a 500 W/m². Por otro lado, Basak reporta el uso de lámparas fluorescentes que proporcionan resultados superiores a los nuestros realizados con lámparas fluorescentes; sin embargo, como se muestra en la figura, en la investigación reportada por Basak, se emplearon bajas concentraciones de molibdeno, lo que nos indica que se pudo haber presentado el fenómeno de inhibición mencionado anteriormente.

6. Conclusiones

En esta investigación se evaluó el comportamiento de un consorcio de fotobacterias aplicando diferentes condiciones de cultivo, por lo que se puede concluir lo siguiente. El consorcio presentó mejores producciones de hidrógeno bajo fuentes de luz con amplio espectro que superen los 700 nm, como las lámparas incandescentes (300 a 900 nm).

Se obtuvo una mayor producción de hidrógeno (340 mL/L/d) bajo las concentraciones de 7.7 µg/L de Fe y 10 µg/L de Mo. Mientras que a concentraciones más altas, 2336 µg/L de Fe y 300 µg/L de Mo presentó una menor producción (269 mL/L/d). Fenómeno que requiere mayor estudio.

El diseño del fotobiorreactor tubular con un alto índice superficie/volumen (106 m^{-1}), permitió un buen desempeño en condiciones ambientales, con una tasa de producción de 337 mL/L/d, mientras que la mayor tasa de producción obtenida en condiciones controladas fue de 480 mL/L/d. Se encontró que las condiciones ambientales como intensidad de luz solar y temperatura tienen efecto significativo en la producción de hidrógeno. Obteniendo mejores resultados de producción de hidrógeno y colonización en meses de primavera (alta radiación solar) y temperatura por encima de los 27 °C.

Recomendaciones para la continuidad del estudio

Debido a los resultados obtenidos en ésta investigación. Se recomienda conducir la investigación y experimentación hacia la producción de hidrógeno bajo condiciones ambientales (intemperie), utilizando instrumentos de medición precisos para el análisis de intensidad luminosa en línea, análisis del consumo y fijación de amonio, análisis de la producción de pigmentos (bacterioclorofilas) a lo largo del día, control de pH, y explorar la posibilidad de enriquecer la iluminación por medio de fibras ópticas para redirigir la luz solar al centro del tubo, por ultimo realizar el estudio de proceso de obtención de energía por medio de la oxidación de hierro y el consumo de molibdeno, con el fin de entender y probar el mecanismo de producción de enzimas nitrogenasas.

Productos generados

Congresos

Diaz, A. y Buitrón, G. (27– 29 de Abril 2015). *Hydrogen production by immobilized bacteria using synthetic wastewater*. Congreso de la IWA – Young Water Professionals México 2015. Guanajuato, México.

Diaz, A. y Buitrón, G. (27– 29 de Abril 2015). *Hydrogen production by immobilized bacteria using synthetic wastewater*. *Solución a la Problemática del Agua en México: Propuestas de Jóvenes Investigadores 2015*. Primera edición. ISBN: 978-607-441-404-2.

Referencias Bibliográficas

- Adessi, Alessandra, y Roberto De Philippis (2014), «Photobioreactor Design and Illumination Systems for H₂ Production with Anoxygenic Photosynthetic Bacteria: A Review», *International Journal of Hydrogen Energy* 39 (7) (febrero): 3127-3141. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.12.084.
- Adessi, Alessandra, Giuseppe Torzillo, Enrico Baccetti, y Roberto De Philippis (2012), «Sustained Outdoor H₂ Production with Rhodospseudomonas Palustris Cultures in a 50L Tubular Photobioreactor», *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (10) (mayo): 8840-8849. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.01.081.
- Aiba, Shuichi (1982), «Growth Kinetics of Photosynthetic Microorganisms», En *Microbial Reactions*, 85-156. Advances in Biochemical Engineering 23. Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/chapter/10.1007/3540116982_3.
- Anón. (2016), «JAMSTEC - JAPAN AGENCY FOR MARINE-EARTH SCIENCE AND TECHNOLOGY». Accedido febrero 1. <http://www.jamstec.go.jp/e/>.
- Argun, Hidayet, y Fikret Kargi (2010), «Photo-Fermentative Hydrogen Gas Production from Dark Fermentation Effluent of Ground Wheat Solution: Effects of Light Source and Light Intensity», *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (4) (febrero): 1595-1603. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.12.040.
- Baghchehsaraee, Bitá, George Nakhla, Dimitre Karamanev, y Argyrios Margaritis (2010), «Fermentative Hydrogen Production by Diverse Microflora», *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (10) (mayo): 5021-5027. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.08.072.
- Bannister, T. T. (1979), «Quantitative Description of Steady State, Nutrient-Saturated Algal Growth, Including Adaptation», *Limnology and Oceanography* 24 (1) (enero 1): 76-96. doi:10.4319/lo.1979.24.1.0076.
- Basak, Nitai, y Debabrata Das (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* 23 (1) (enero 10): 31-42. doi:10.1007/s11274-006-9190-9.
- Basak, Nitai, Asim Kumar Jana, Debabrata Das, y Dipankar Saikia (2014), «Photofermentative Molecular Biohydrogen Production by Purple-Non-Sulfur (PNS) Bacteria in Various Modes: The Present Progress and Future Perspective», *International Journal of Hydrogen Energy* 39 (13) (abril): 6853-6871. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.02.093.
- Benemann, John (1977), «Hydrogen and methane production through microbial photosynthesis A₂», En *Living Systems As Energy Converters*, ed. M. J. Allen y J. -P. Massué, 285-297. Elsevier. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780720406290500282>.
- Bitton, Gabriel (2005), *Wastewater microbiology*. 3rd ed. Hoboken, N.J. Wiley-Liss, John Wiley & Sons.
- Boran, Efe, Ebru Özgür, Job van der Burg, Meral Yücel, Ufuk Gündüz, y Inci Eroglu (2010), «Biological Hydrogen Production by Rhodobacter Capsulatus in Solar Tubular Photo Bioreactor», *Journal of Cleaner Production* 18 (diciembre): S29-S35. doi:10.1016/j.jclepro.2010.03.018.

- Boran, Efe, Ebru Özgür, Meral Yücel, Ufuk Gündüz, y Inci Eroglu (2012), «Biohydrogen Production by Rhodobacter Capsulatus in Solar Tubular Photobioreactor on Thick Juice Dark Fermenter Effluent», *Journal of Cleaner Production* 31 (agosto): 150-157. doi:10.1016/j.jclepro.2012.03.020.
- Burlew, John Swalm 1910-Ed (1976), *Algal Culture, from Laboratory to Pilot Plant*. Washington. Carnegie Institution.
- Burns, R. C., y R. W. F. Hardy (2012), *Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants*. Springer Science & Business Media.
- Chen, C, G Saratale, C Lee, P Chen, y J Chang (2008), «Phototrophic Hydrogen Production in Photobioreactors Coupled with Solar-Energy-Excited Optical Fibers», *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (23) (diciembre): 6886-6895. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.09.014.
- Chen, Chun-Yen, y Jo-Shu Chang (2006), «Enhancing phototropic hydrogen production by solid-carrier assisted fermentation and internal optical-fiber illumination», *Process Biochemistry* 41 (9) (septiembre): 2041-2049. doi:10.1016/j.procbio.2006.05.005.
- Chen, Chun-Yen, Mu-Hoe Yang, Kuei-Ling Yeh, Chien-Hung Liu, y Jo-Shu Chang (2008), «Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes», *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (18) (septiembre): 4755-4762. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.06.055.
- Chochois, Vincent, Laure Constans, David Dauvillée, Audrey Beyly, Mélanie Solivérès, Steven Ball, Gilles Peltier, y Laurent Cournac (2010), «Relationships between PSII-Independent Hydrogen Bioproduction and Starch Metabolism as Evidenced from Isolation of Starch Catabolism Mutants in the Green Alga Chlamydomonas Reinhardtii», *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (19) (octubre): 10731-10740. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.03.052.
- Chu, Chen-Yeon, Shu-Yii Wu, Po-Chi Hsieh, y Chiu-Yue Lin (2011), «Biohydrogen production from immobilized cells and suspended sludge systems with condensed molasses fermentation solubles», *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (21). 2010 Asian/APEC BioH2 (octubre): 14078-14085. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.04.101.
- Cowan, M. Kelly, y Kathleen P. Talaro (2009), *Microbiology: a systems approach*. 2nd ed. Boston. McGraw-Hill.
- CRD Lancaster (2013), *Purple Bacteria: Photosynthetic Reaction Centers*.
- Das, Debabrata, y Nitai Basak (2009), «Photofermentative Hydrogen Production Using Purple Non-Sulfur Bacteria Rhodobacter Sphaeroides O.U.001 in an Annular Photobioreactor: A Case Study», *Biomass and Bioenergy* 33 (6-7) (junio): 911-919. doi:10.1016/j.biombioe.2009.02.007.
- David Edwards (2012), «Scaling up Step by Step».
- David Edwards, P. Eng (2015), «Scaling up Bioenergy Technologies».
- Debabrata Das, Namita Khanna, y Chitrlekha Nag Dasgupta (2014), «Biohydrogen production: Fundamentals and Technology Advances».
- Eroglu, Ela, Ufuk Gunduz, Meral Yucel, y Inci Eroglu (2010), «Photosynthetic Bacterial Growth and Productivity under Continuous Illumination or Diurnal Cycles with Olive Mill Wastewater as Feedstock», *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (11) (junio): 5293-5300. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.03.063.
- Fernández-Sevilla, José Maria, Francisco Gabriel Acién-Fernández, y Emilio Molina-Grima (2014), «Photobioreactors Design for Hydrogen Production», En *Microbial*

- BioEnergy: Hydrogen Production*, ed. Davide Zannoni y Roberto De Philippis, 38:291-320. Dordrecht. Springer Netherlands.
http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-8554-9_13.
- Fernando A.Lopes Pinto, Peter Lindblad, y Olga Troshina (2002), «A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution», *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Frigaard, Niels-Ulrik, Kim L. Larsen, y Raymond P. Cox (1996), «Spectrochromatography of photosynthetic pigments as a fingerprinting technique for microbial phototrophs», *FEMS microbiology ecology* 20 (2): 69–77.
- Gallazzi, Alessandro, Barbora Branska, Flavia Marinelli, y Petra Patakova (2015), «Continuous production of n-butanol by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 using suspended and surface-immobilized cells», *Journal of Biotechnology* 216 (diciembre 20): 29-35. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.10.008.
- Gosse, Jimmy L., Brian J. Engel, Federico E. Rey, Caroline S. Harwood, L. E. Scriven, y Michael C. Flickinger (2007), «Hydrogen production by photoreactive nanoporous latex coatings of nongrowing *Rhodospseudomonas palustris* CGA009», *Biotechnology progress* 23 (1): 124–130.
- Gottstein, J., y Hugo Scheer (1983), «Long-wavelength-absorbing forms of bacteriochlorophyll a in solutions of Triton X-100», *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (8): 2231–2234.
- Grima, E. Molina, F. García Camacho, J. A. Sánchez Pérez, J. M. Fernández Sevilla, F. G. Ación Fernández, y A. Contreras Gómez (1994), «A Mathematical Model of Microalgal Growth in Light-Limited Chemostat Culture», *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 61 (2) (octubre 1): 167-173. doi:10.1002/jctb.280610212.
- Grima, E. Molina, FG Ación Fernández, F. Garcia Camacho, y Yusuf Chisti (1999), «Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup», *Journal of biotechnology* 70 (1): 231–247.
- Guevara-López, Eliane, y Germán Buitrón (2015), «Evaluation of Different Support Materials Used with a Photo-Fermentative Consortium for Hydrogen Production», *International Journal of Hydrogen Energy* 40 (48) (diciembre): 17231-17238. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.08.057.
- Guo, Cheng-Long, Xun Zhu, Qiang Liao, Yong-Zhong Wang, Rong Chen, y Duu-Jong Lee (2011), «Enhancement of Photo-Hydrogen Production in a Biofilm Photobioreactor Using Optical Fiber with Additional Rough Surface», *Bioresource Technology* 102 (18) (septiembre): 8507-8513. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.075.
- Hallenbeck, Patrick C., y Dipankar Ghosh (2009), «Advances in Fermentative Biohydrogen Production: The Way Forward?», *Trends in Biotechnology* 27 (5) (mayo): 287-297. doi:10.1016/j.tibtech.2009.02.004.
- Hayashi, Hidenori, Mitsue Miyao, y Sigehiro Morita (1982), «Absorption and fluorescence spectra of light-harvesting bacteriochlorophyll-protein complexes from *Rhodospseudomonas palustris* in the near-infrared region», *Journal of biochemistry* 91 (3): 1017–1027.
- Heining, M., A. Sutor, S. C. Stute, C. P. Lindenberger, y R. Buchholz (2015), «Internal Illumination of Photobioreactors via Wireless Light Emitters: A Proof of Concept», *Journal of Applied Phycology* 27 (1) (febrero): 59-66. doi:10.1007/s10811-014-0290-x.

- Hernández, Gamaliel (2011), «Producción de hidrógeno en un reactor con biomasa fija». Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ismail, Ku Syahidah Ku, Ghasem Najafpour, Habibollah Younesi, Abdul Rahman Mohamed, y Azlina Harun Kamaruddin (2008), «Biological Hydrogen Production from CO: Bioreactor Performance», *Biochemical Engineering Journal* 39 (3) (mayo): 468-477. doi:10.1016/j.bej.2007.11.003.
- J.A.L. Cruz-Abeyro, R. Pérez Enríquez, H. Böhnel, y A. Kotsarenko (2005), «Estación Meteorológica en el Observatorio Geoelectromagnético del Campus Juriquila de la UNAM, Querétaro: Instalación, calibración y operación del sistema».
- J.H. Steele (1977), «Microbial Kinetics and Dynamics in Chemical Reactor Theory».
- Kargi, Fikret, y Hidayet Argun (2011), «Bio-Hydrogen Production by Different Operational Modes of Dark and Photo-Fermentation: An Overview», *International Journal of Hydrogen Energy* 36 (13) (julio): 7443-7459. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.03.116.
- Keskin, Tugba, Mona Abo-Hashesh, y Patrick C. Hallenbeck (2011), «Photofermentative Hydrogen Production from Wastes», *Bioresource Technology* 102 (18) (septiembre): 8557-8568. doi:10.1016/j.biortech.2011.04.004.
- Keskin, Tuğba, Laura Giusti, y Nuri Azbar (2012), «Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture», *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (2). 10th International Conference on Clean Energy 2010 (enero): 1418-1424. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.10.013.
- Koku, Harun, İnci Eroğlu, Ufuk Gündüz, Meral Yücel, y Lemi Türker (2002), «Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*», *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (11): 1315–1329.
- Kondo, Toshihiko, Masayasu Arakawa, Tatsuki Wakayama, y Jun Miyake (2002), «Hydrogen production by combining two types of photosynthetic bacteria with different characteristics», *International Journal of Hydrogen Energy* 27 (11): 1303–1308.
- Larimer, Frank W, Patrick Chain, Loren Hauser, Jane Lamerdin, Stephanie Malfatti, Long Do, Miriam L Land, et al. (2004), «Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*», *Nature Biotechnology* 22 (1) (enero): 55-61. doi:10.1038/nbt923.
- Lazaro, Carolina Zampol, Daniele Vital Vich, Julia Sumiko Hirasawa, y Maria Bernadete Amâncio Varesche (2012), «Hydrogen Production and Consumption of Organic Acids by a Phototrophic Microbial Consortium», *International Journal of Hydrogen Energy* 37 (16) (agosto): 11691-11700. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.05.088.
- Liao, Qiang, Ye-Jun Wang, Yong-Zhong Wang, Xun Zhu, Xin Tian, y Jun Li (2010), «Formation and Hydrogen Production of Photosynthetic Bacterial Biofilm under Various Illumination Conditions», *Bioresource Technology* 101 (14) (julio): 5315-5324. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.019.
- Liu, Bing-Feng, Nan-Qi Ren, De-Feng Xing, Jie Ding, Guo-Xiang Zheng, Wan-Qian Guo, Ji-Fei Xu, y Guo-Jun Xie (2009), «Hydrogen Production by Immobilized *R. Faecalis* RLD-53 Using Soluble Metabolites from Ethanol Fermentation Bacteria *E. Harbinense* B49», *Bioresource Technology* 100 (10) (mayo): 2719-2723. doi:10.1016/j.biortech.2008.12.020.
- Lowry, Oliver H., Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, Rose J. Randall, y others (1951), «Protein measurement with the Folin phenol reagent», *J Biol Chem* 193 (1): 265–275.

- Lubitz, Wolfgang, Hideaki Ogata, Olaf Rüdiger, y Edward Reijerse (2014), «Hydrogenases», *Chemical Reviews* 114 (8) (abril 23): 4081-4148. doi:10.1021/cr4005814.
- Michel, Hartmut, y Johann Deisenhofer (1988), «Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II», *Biochemistry* 27 (1): 1–7.
- Miyake, Jun, Masato Miyake, y Yasuo Asada (1999), «Biotechnological hydrogen production: research for efficient light energy conversion», *Journal of Biotechnology* 70 (1): 89–101.
- Mulder, David W., Eric M. Shepard, Jonathan E. Meuser, Neelambari Joshi, Paul W. King, Matthew C. Posewitz, Joan B. Broderick, y John W. Peters (2011), «Insights into [FeFe]-Hydrogenase Structure, Mechanism, and Maturation», *Structure* 19 (8) (agosto): 1038-1052. doi:10.1016/j.str.2011.06.008.
- National Center for information Biotechnology, U. S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, y 20894 Usa (2016), «National Center for Biotechnology Information». Accedido febrero 1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Niederman, Robert A. (2013), «Membrane Development in Purple Photosynthetic Bacteria in Response to Alterations in Light Intensity and Oxygen Tension», *Photosynthesis Research* 116 (2-3) (octubre): 333-348. doi:10.1007/s11120-013-9851-0.
- van Oorschot, J.L.P. (1955), *Conversion of Light Energy in Algal Culture*. Mededelingen. Veenman & Zonen. <https://books.google.com.mx/books?id=TiEAHQAAAJ>.
- Özgür, Ebru, y Begüm Peksel (2013), «Biohydrogen Production from Barley Straw Hydrolysate through Sequential Dark and Photofermentation», *Journal of Cleaner Production* 52 (agosto): 14-20. doi:10.1016/j.jclepro.2013.02.035.
- Prévost, Danielle, H. Antoun, y L. M. Bordeleau (1987), «Effects of low temperatures on nitrogenase activity in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) nodulated by arctic rhizobia», *FEMS Microbiology Letters* 45 (4) (agosto 1): 205-210. doi:10.1016/0378-1097(87)90053-X.
- RAO, V. RANGA (1977), «Effect of temperature on the nitrogenase activity of intact and detached nodules in Lotus and Stylosanthes», *Journal of Experimental Botany* 28 (2): 261–267.
- Rolff, M., y F. Tucek (2013), «Nitrogenase and Nitrogen Activation», En *Comprehensive Inorganic Chemistry II*, 593-618. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978008097774400927X>.
- Smith, Barry E., Raymond L. Richards, y William E. Newton (2004), *Catalysts for Nitrogen Fixation: Nitrogenases, Relevant Chemical Models and Commercial Processes*. Springer Science & Business Media.
- Stephenson, Marjory, y Leonard Hubert Stickland (1931), «Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen», *Biochemical Journal* 25 (1): 205-214.
- Tian, Xin, Qiang Liao, Xun Zhu, Yongzhong Wang, Pan Zhang, Jun Li, y Hong Wang (2010), «Characteristics of a Biofilm Photobioreactor as Applied to Photo-Hydrogen Production», *Bioresour Technol* 101 (3) (febrero): 977-983. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.007.
- Veziroglu, T. (2012), *Hydrogen Energy*. Springer Science & Business Media.
- Vree, Jeroen H., Rouke Bosma, Marcel Janssen, Maria J. Barbosa, y René H. Wijffels (2015), «Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors», *Biotechnology for Biofuels* 8: 215. doi:10.1186/s13068-015-0400-2.

- Wang, Yong-Zhong, Qiang Liao, Xun Zhu, Rong Chen, Cheng-Long Guo, y Jin Zhou (2013), «Bioconversion Characteristics of Rhodospseudomonas Palustris CQK 01 Entrapped in a Photobioreactor for Hydrogen Production», *Bioresource Technology* 135 (mayo): 331-338. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.105.
- Waughman, G. J. (1977), «The effect of temperature on nitrogenase activity», *Journal of Experimental Botany* 28 (4): 949–960.
- Wen-Hsing Chen (2006), *Biological hydrogen production by anaerobic fermentation*.
- Wu, Ta Yeong, Jacqueline Xiao Wen Hay, Liu Bi Kong, Joon Ching Juan, y Jamaliah Md. Jahim (2012), «Recent Advances in Reuse of Waste Material as Substrate to Produce Biohydrogen by Purple Non-Sulfur (PNS) Bacteria», *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (5) (junio): 3117-3122. doi:10.1016/j.rser.2012.02.002.
- Xie, Guo-Jun, Bing-Feng Liu, Jie Ding, De-Feng Xing, Hong-Yu Ren, Wan-Qian Guo, y Nan-Qi Ren (2012), «Enhanced photo-H₂ production by Rhodospseudomonas faecalis RLD-53 immobilization on activated carbon fibers», *Biomass and Bioenergy* 44 (septiembre): 122-129. doi:10.1016/j.biombioe.2012.05.002.
- Yang, Honghui, Jing Zhang, Xueqing Wang, Jiangtao Feng, Wei Yan, y Liejin Guo (2015), «Coexpression of Mo- and Fe-Nitrogenase in Rhodobacter Capsulatus Enhanced Its Photosynthetic Hydrogen Production», *International Journal of Hydrogen Energy* 40 (2) (enero): 927-934. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.11.087.
- Yingli, R, T Zhang, y H Fang (2008), «Characteristics of a Phototrophic Sludge Producing Hydrogen from Acetate and Butyrate», *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (9) (mayo): 2147-2155. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.02.055.
- Yves Jouanneau, Blandine Wong, y Paulette M. Vignais (1985), «Stimulation by light of nitrogenase synthesis in cells of Rhodospseudomonas capsulata growing in N-limited continuous cultures», *Biochimica et Biophysica Acta* 808: 149-155.
- Zagrodnik, R., y M. Laniecki (2015), «The Role of pH Control on Biohydrogen Production by Single Stage Hybrid Dark- and Photo-Fermentation», *Bioresource Technology* 194 (octubre): 187-195. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.028.
- Zagrodnik, R., M. Thiel, K. Seifert, M. Włodarczak, y M. Łaniecki (2013), «Application of immobilized Rhodobacter sphaeroides bacteria in hydrogen generation process under semi-continuous conditions», *International Journal of Hydrogen Energy* 38 (18) (junio 18): 7632-7639. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.01.023.
- Zhang, Chuan, Xun Zhu, Qiang Liao, Yongzhong Wang, Jun Li, Yudong Ding, y Hong Wang (2010), «Performance of a Groove-Type Photobioreactor for Hydrogen Production by Immobilized Photosynthetic Bacteria», *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (11) (junio): 5284-5292. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.03.085.

Anexos

Anexo 1. Control de temperatura, diseño y programación

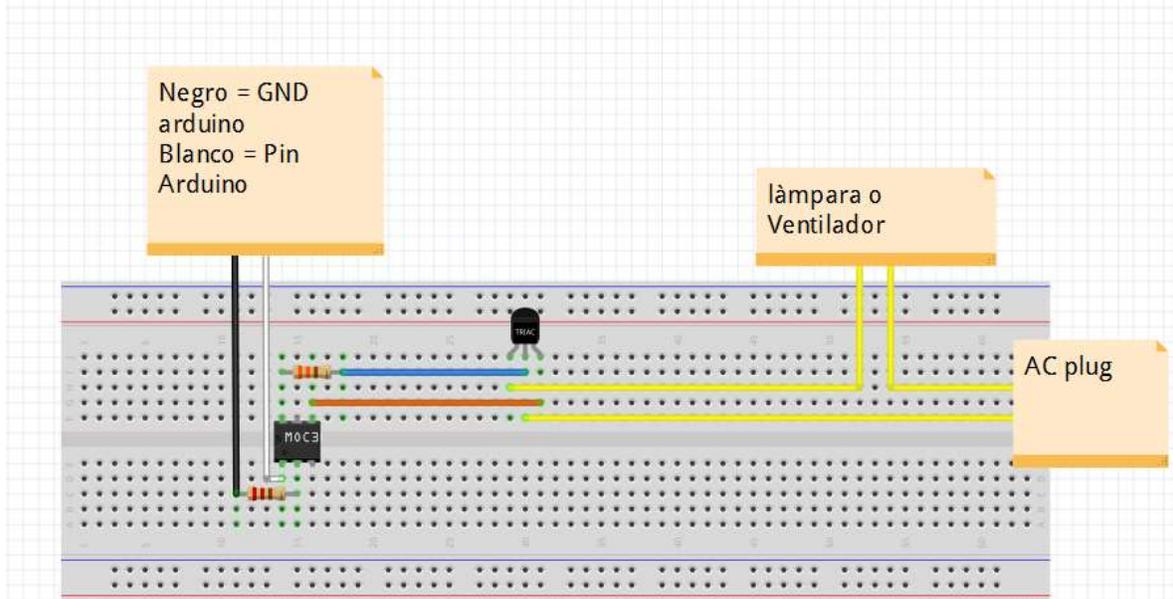


Ilustración 1. Sección del control de dispositivo que utilizan Coirrente Alterna.

```
// Include libraries
```

```
#include "Wire.h"
```

```
#include "LiquidCrystal.h"
```

```
#include "OneButton.h"
```

```
#include "OneWire.h"
```

```
#include "DallasTemperature.h"
```

```
// States
```

```
#define S_Monitor 0
```

```
#define S_Sleep 1
```

```
#define S_SetTemp 2
```

```
int state = S_Sleep; // Initial state
```

```
// DS18B20 setup
```

```
#define TempSensor 10 // PIN one wire device (Sensor de temperatura) esta conectado a  
OneWire;
```

```
// pasa la referencia OneWire al Sensor Dallas Temp
```

```
DallasTemperature sensors(&oneWire);
```

```
// OneButton setup
```

```
OneButton button(9, true); //Le dice a la libreria OneButton que pin está conectado
```

```
// Inicia la libreria LCD con los pines de la interfase
```

```

LiquidCrystal lcd(2, 3, 4, 5, 6, 7);
// Other PINs
int FridgeRly = 8;
// Vars
unsigned long Sleep = 0;
unsigned long SleepLength = 9000; // Cuanto tiempo esperamos antes de que vuelva a
intentar enfriar
float SetTemp = 28.00; // La temperature default que entrega el controlador
float TempC = 0;
float TempF = 0;
bool CoolRun = false;
bool Boot = true;

void setup() {
  lcd.begin(16, 2); // Set up de las filas y columnas activas del LCD
  sensors.begin(); // Inicia la libreria de Dallas temps
  // PIN Modes
  pinMode(FridgeRly, OUTPUT);
  //Serial.begin(9600);
}
void loop() {
  switch(state) {
  case S_Monitor:
    F_Monitor();
    break;
  case S_Sleep:
    F_Sleep();
    break;
  case S_SetTemp:
    F_SetTemp();
    break;
  }
}

```

```

}
// Functions
void F_Monitor() {
  button.attachPress(F_ButtonPress);
  button.tick();
  if (TempF <= SetTemp) {
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print("Monitoreo... ");
  }
  F_GetTemp();
  F_ShowTemp();
  if (TempF > SetTemp) {
    digitalWrite(FridgeRly, HIGH); // Enciende el enfriador
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print("Enfriando a: "); // Impresión en la pantalla cuando está en modo enfriador
    lcd.print(SetTemp);
    CoolRun = true;
  }
  if (CoolRun == true && TempF <= SetTemp) {
    Sleep = millis();
    state = S_Sleep;
  }
}

void F_Sleep() {
  button.attachPress(F_ButtonPress);
  button.tick();
  digitalWrite(FridgeRly, LOW); // Apaga el enfriador
  lcd.setCursor(0, 1);
  lcd.print("Durmiendo... ");
  F_GetTemp();
  F_ShowTemp();
  if (millis() - Sleep > SleepLength) {

```

```

CoolRun = false;
state = S_Monitor;
}
}
void F_SetTemp() {
button.attachClick(F_Increase);
button.attachPress(F_ButtonPress2);
button.tick();
lcd.setCursor(0, 0);
lcd.print("SetTemp: ");
lcd.print(SetTemp);
lcd.setCursor(0, 1);
lcd.print(" Hold to Exit ");
}
void F_Increase() {
SetTemp = SetTemp + 1.00;
if (SetTemp > 40.00) {
SetTemp = 28.00;
}
}
void F_ButtonPress() {
state = S_SetTemp;
}
void F_ButtonPress2() {
state = S_Monitor;
}
void F_GetTemp() {
sensors.requestTemperatures(); // Le dice al sensor que guarde la temperatura
TempC = sensors.getTempCByIndex(0); // Recupera la temp de la memoria del sensor y la
guarda en la var local
TempF = (TempC ); // Convierte A Fahrenheit
}

```

```
void F_ShowTemp() {  
  lcd.setCursor(0, 0);  
  lcd.print("Temp: ");  
  lcd.print(TempC);  
  lcd.print("C ");  
  //Serial.print(TempF); Serial.println(" degrees F");  
}
```

