



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Carlos Jeovanny López Romero
Ingeniero Bioquímico

**OPERACIÓN DE UN REACTOR FOTOHETEROTRÓFICO A DISTINTOS
REGÍMENES DE ALIMENTACIÓN**

Dirigida por

Dra. Elvia Inés García Peña

Ciudad de México. Diciembre 2016



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 19 del mes de diciembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:
Operación de un reactor fotoheterotrófico a distintos regímenes de alimentación.

Presentada por el alumno:

<u>López</u>	<u>Romero</u>	<u>Carlos Jeovanny</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	A	1	5	1	1	4	3

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dra. Eva Inés García Peña

Dr. Edgar Salgado Manjarrez



Dr. Jorge Isaac Chairez Oria

Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION

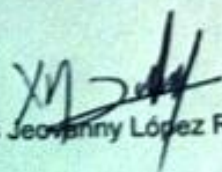
Dra. Pamela Guerra Blanco

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Ramón Villanueva Arce

Declaración de originalidad

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."


Carlos Jeovanny López Romero.


~~Véase en el director de tesis.~~
Dra. Elvia Inés García Peña

AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
PRESENTE.**

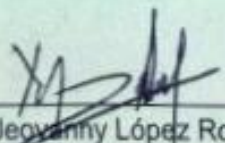
Bajo protesta de decir la verdad el que suscribe **C. Carlos Jeovanny López Romero** (se anexa copia simple de la identificación oficial), manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **"Operación de un reactor fotoheterotrónico a distintos regímenes de alimentación"**, en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la ley federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante el IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales (**publicación en línea de la tesis en el repositorio institucional**) "La Tesis" por un periodo de **dos años** contando a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovara automáticamente en caso de no dar aviso expreso a " El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad, o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Ciudad de México, a 18 de diciembre de 2016.

ATENTAMENTE



Carlos Jeovanny López Romero

Resumen

La fotofermentación es una tecnología amigable con el ambiente que, en conjunto con la fermentación oscura, permite mitigar los problemas de contaminación causados por residuos de desecho, produciendo a la vez hidrógeno: combustible que no produce gases de efecto invernadero. Por ello, resulta indispensable encontrar una forma de operar una fotofermentación en la que se obtengan altas productividades y que, además, ofrezca la posibilidad de acoplarla satisfactoriamente con una fermentación oscura.

En el presente trabajo se usó un consorcio microbiano para realizar una fotofermentación usando medio mineral con acetato como única fuente de carbono y en ausencia total de fuente de nitrógeno. Se operó a tres diferentes regímenes de alimentación: lote, lote alimentado y lote secuencial. Para el cultivo en lote secuencial se obtuvo una productividad específica de 5.39 mLH₂/g-h, que es 41% más a la obtenida para el cultivo en lote. Sin embargo, la productividad volumétrica resultó de 0.55 mLH₂/L-h, 34% menor que en el mismo régimen. Ello debido a la poca capacidad de retención de biomasa que se tiene en la fase de sedimentación. Por su parte, el cultivo operado en lote alimentado tuvo una productividad volumétrica 48% mayor a la del cultivo en lote y una específica 31% mayor al mismo, obteniendo valores de 1.20 mLH₂/L-h y 5.03 mLH₂/g-h respectivamente.

Estos resultados demuestran que ambos regímenes tienen la capacidad de aumentar la productividad de hidrógeno. El cultivo en lote alimentado se puede usar, entonces, en el acoplamiento con fermentación oscura gracias al efecto de dilución que tendría sobre las sustancias inhibitorias. El cultivo en lote secuencial, por otro lado, se puede usar ya que el consorcio se mantiene en el medio una mayor cantidad de tiempo, logrando que se adapte a éste e incremente la productividad. Sin embargo, resulta necesario encontrar una forma de retener la mayor cantidad de biomasa posible a fin de que la productividad volumétrica no decaiga. Para ello existen alternativas como centrifugación, filtración o inmovilización de células.

ABSTRACT

The photofermentation is a green technology that, together with dark fermentation, allows to alleviate the pollution problems caused by waste materials, producing at the same time hydrogen, a fuel that does not produce greenhouse gases in its combustion. For this reason, it is essential to find a way to operate a photofermentation in which it can be obtained high productivities and, also, offers the possibility to couple with a dark fermentation.

In this work, it was used a microbial consortium to perform a photofermentation using a mineral medium with acetate as sole carbon source and a total absence of nitrogen. It was operated in three different ways: batch, fed batch and sequencing batch. For the sequencing batch it was obtained a specific productivity of 5.39 mLH₂/g-h, it is 41% more than that obtained in batch culture. However, the volumetric productivity was 0.55 mLH₂/L-h, 34% less than the same culture. It is because of the low capacity to hold back the biomass in the settle phase. On the other hand, the fed batch culture had a volumetric productivity 48% higher than the batch culture, and a specific productivity 31% higher, obtaining values of 1.20 mLH₂/L-h and 5.03 mLH₂/g-h respectively.

These results demonstrate that both, fed batch and sequencing batch, can improve the hydrogen productivity. The fed batch culture can be used in the couple with dark fermentation due to dilution effect it could have on inhibitory substances. On the other hand, the sequencing batch culture can be used due to the consortium remains on the medium for long time, achieving its adaptation and, accordingly, improving its hydrogen productivity. However, it is necessary to find a way to hold back as much amount of biomass as possible, in order to the volumetric productivity is not affected. To achieve the above, there are alternatives like centrifugation, filtration or cell immobilization.

Contenido

Resumen	i
ABSTRACT	ii
Contenido	iii
Índice de figuras.	v
Indicie de Tablas.....	vii
1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1. Hidrógeno como fuente de energía.....	4
2.2. Fermentación oscura	5
2.3. Fotofermentación.....	6
2.3.1. Cultivos fotoheterotróficos	9
2.3.2. <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	10
2.3.3. <i>Desulfovibrio</i>	11
2.3.4. <i>Bacteroides</i>	12
2.4. Factores que afectan la producción de hidrógeno.....	12
2.5. Cultivo por lote.....	12
2.6. Cultivo por lote alimentado	15
2.7. Cultivo en lote secuencial	18
2.8. Reactores Agitados Mecánicamente (RAM)	19
3. Justificación	21
4. Objetivo.....	22
4.1. Objetivos específicos.....	22
6. Metodología	23
6.1. Consorcio fotofermentativo.	23
6.2. Optimización de medios.....	23
6.2.1. Optimización de medio de crecimiento	24
6.2.2. Optimización de medio de producción.	25
6.3. Determinación de amonio y nitrógeno inorgánico total residual.	27
6.4. Operación en reactor.	27
6.4.1. Producción por lote.....	27
6.4.2. Producción por lote alimentado.....	28
6.4.3. Producción por lote secuencial	28
6.5. Evolución de poblaciones.	28

7.	Resultados.....	29
7.1.	Optimización de medio de crecimiento.	29
7.2.	Optimización de medio de producción.	38
7.3.	Efecto de la concentración de glutamato de sodio en el medio de producción... 39	
7.4.	Consumo de nitrógeno inorgánico	41
7.5.	Cultivo por lote.....	42
7.5.1.	Evolución de poblaciones	45
7.6.	Cultivo en lote secuencial	48
7.7.	Cultivo en lote alimentado.....	54
7.8.	Comparación entre los regímenes.	58
8.	Conclusiones	60
9.	Bibliografía	62
10.	Anexos	67
10.1.	Análisis ANOVA obtenidos para la optimización de medio de crecimiento.	67

Índice de figuras.

Figura 1. Sistema fotosintético.....	8
Figura 2. Cultivo por lote.....	13
Figura 3. Patrones de flujo: A) Radial. B) Axial.....	20
Figura 4. Distribución de la población del consorcio fotofermentativo en fase de crecimiento.	23
Figura 5. Superficie de respuesta de biomasa (g/L) en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 93 horas de crecimiento.....	30
Figura 6. Superficie de respuesta de biomasa (g/L) en función de extracto de levadura (g/L) y sulfato de potasio dibásico (mM) a las 120 horas de crecimiento.....	31
Figura 7. Superficie de respuesta de DO (630 nm) en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 93 horas de crecimiento.....	32
Figura 8. Superficie de respuesta de DO (630 nm) en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 120 horas de crecimiento.....	33
Figura 9. Superficie de respuesta de pH en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 48 horas de crecimiento.....	34
Figura 10. Superficie de respuesta de pH en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 72 horas de crecimiento.....	34
Figura 11. Superficie de respuesta de pH en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 93 horas de crecimiento.....	35
Figura 12. Superficie de respuesta de pH en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 120 horas de crecimiento.....	35
Figura 13. Gráfica de contornos de biomasa (g/L) en función de concentración de fosfatos (mM). Modelo predicho por el software.....	36
Figura 14. Cinética de crecimiento y pH del consorcio fotofermentativo bajo condiciones obtenidas en la optimización del medio de crecimiento.....	38
Figura 15. Efecto de glutamato de sodio sobre la biomasa y el pH en fase de producción.	40
Figura 16. Cinética de consumo de Nitrógeno inorgánico.....	42
Figura 17. Cinética de producción de hidrógeno (mL), consumo de sustrato (g/L) y crecimiento celular (g/L) del cultivo por lote en reactor en fase de producción.....	43
Figura 18. Poblaciones presentes en el tiempo 0 horas del cultivo por lote en reactor. Fase de producción.....	46
Figura 19. Poblaciones presentes en el tiempo 238 horas del cultivo por lote en reactor. Fase de producción.....	47
Figura 20. Poblaciones presentes en el tiempo 430 horas del cultivo por lote en reactor. Fase de producción.....	47
Figura 21. Cinética de crecimiento (g/L) consumo de sustrato (g/L) y producción de hidrógeno (mL) en cultivo en lote secuencial en fase de producción.....	50

Figura 22. Poblaciones presentes en el tiempo 903 horas del cultivo por lote secuencial en reactor. Fase de producción.	53
Figura 23. . Cinética de crecimiento (g/L) y producción de hidrógeno (mL) en cultivo en lote alimentado en fase de producción.	55

Indicie de Tablas

Tabla 1. Matriz de tratamientos para la optimización de medio de crecimiento.	25
Tabla 2. Matriz de tratamientos para la optimización de medio de producción.....	26
Tabla 3. Respuestas observadas y estimadas de pH DO y biomasa con las condiciones obtenidas en la optimización.....	37
Tabla 4. Comparación de las productividades específicas y volumétricas en sistemas fotofermentativos reportados en la literatura.	45
Tabla 5. Valores cinéticos obtenidos del cultivo en lote secuencial en fase de producción.	51
Tabla 6. Valores cinéticos obtenidos del cultivo en lote alimentado en fase de producción.	56
Tabla 7. Comparación de las productividades específicas y volumétricas en sistemas fotofermentativos en lote alimentado reportados en la literatura.	57
Tabla 8. Productividad volumétrica y específica global de los cultivos en lote, lote alimentado y lote secuencial.	58
Tabla 9. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: biomasa a 48 horas. ..	67
Tabla 10. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: biomasa a 72 horas. 68	
Tabla 11. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: biomasa a 93 horas. 68	
Tabla 12. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: biomasa a 120 horas.	69
Tabla 13. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: DO a 48 horas.....	69
Tabla 14. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: DO a 72 horas.....	70
Tabla 15. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: DO a 93 horas.....	70
Tabla 16. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: DO a 120 horas.....	71
Tabla 17. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: pH a 48 horas.....	71
Tabla 18. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: pH a 72 horas.....	72
Tabla 19. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: pH a 93 horas.....	72
Tabla 20. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: pH a 120 horas.....	73

1. Introducción

El uso indiscriminado de fuentes de energía fósiles, cómo lo son el petróleo y sus derivados, el metano, el gas natural, entre otros, ha traído problemas ambientales que es necesario corregir y remediar (Ozmihci y Kargi, 2010). Lo anterior se debe a que estas fuentes de energía producen como subproductos gases de efecto invernadero, responsables del calentamiento global (Botas et al. 2005).

Lo anterior, aunado a que los combustibles fósiles son fuentes de energía no renovables, ha hecho necesaria la búsqueda de energías alternativas que sean limpias y renovables. El hidrógeno resulta una opción prometedora, ya que tiene ventajas sobre éstos últimos. En primer lugar, su combustión genera 122 KJ/g, hasta 2.7 veces mayor que la energía generada por los combustibles fósiles. En segundo lugar, el resultado de la reacción de combustión de este compuesto es solamente vapor de agua, mientras que la de los combustibles comunes es dióxido y monóxido de carbono (Balat, 2008).

Algunas de las formas existentes para producir hidrógeno, requieren altas cantidades de energía (reformado por vapor, electrólisis, etcétera). Dichas tecnologías, obtienen el hidrógeno mediante el uso de combustibles fósiles, generando gases de efecto invernadero durante el proceso (Turner. 2004). Esto cae en una contradicción obvia, ya que para obtener el combustible limpio se genera un impacto negativo al ambiente.

Por otro lado, se tiene la opción de producir hidrógeno por medio de microorganismos. Las bacterias púrpuras no sulfurosas (BPNS) en condiciones anaerobias y ausencia de nitrógeno, expresan una enzima llamada nitrogenasa. Esta enzima se encarga de tomar cualquier fuente de nitrógeno y convertirla en amonio, reacción que necesita de un gradiente de protones, el cual a su vez es generado gracias a un fotosistema intrínseco del microorganismo. Los protones obtenidos se transforman a hidrógeno para catalizar la reacción de reducción del nitrógeno (Adessi, 2013).

Dado que las BPNS necesitan fotones como fuente de energía, al proceso en el cuál producen hidrógeno se le conoce como fotofermentación. La fotofermentación la llevan a cabo usando como fuente de carbono compuestos reducidos, entre los que se encuentran los ácidos grasos volátiles (AGVs) (Adessi, 2013), de los que a su vez destacan el acetato, butirato y lactato.

Resulta importante resaltar que estos compuestos se pueden obtener de una etapa fermentativa previa, denominada fermentación oscura, en la cual otro tipo de microorganismos degradan azúcares de diferentes tamaños (sacarosa, glucosa, almidón) para reducirlas a AGVs y producir metano e hidrógeno. En la fermentación oscura se pueden usar como fuente de carbono residuos orgánicos, como frutas y hortalizas, o aguas residuales (López et al., 2015). Esto último trae la posibilidad de atacar varios problemas ambientales a la vez.

De la fermentación oscura y la fotofermentación, la segunda es la que puede producir una mayor cantidad de hidrógeno, estequiométricamente hablando. Sin embargo, este proceso se lleva a cabo a una velocidad menor. Una fotofermentación puede producir teóricamente un total de 4 moles de hidrógeno por cada mol de acetato, lo que se traduce a 8 moles por cada mol de glucosa. Sin embargo, estos rendimientos bajan considerablemente dado a que el metabolismo de las BPNS se puede dirigir hacia diversas rutas, y no sólo hacia formación de hidrógeno. Entre éstas se pueden nombrar el crecimiento, energía de mantenimiento y producción de otros metabolitos como polihidroxibutirato (PHB), pigmentos, entre otros (Adessi, 2013).

Resulta entonces importante lograr alcanzar el rendimiento máximo posible en la fotofermentación, y una de las formas en las que esto se puede lograr es trabajar el proceso a diferentes regímenes de alimentación. Lo anterior se logra debido a las características intrínsecas del proceso de alimentación.

Aunado a ello, también modificando el régimen y/o el tiempo de alimentación se pueden evitar o contrarrestar los efectos negativos que se presentan cuando se intenta usar el efluente de una fermentación oscura como sustrato de una fotofermentación (Argun y Kargi, 2011). Los efluentes de una fermentación tienen una alta concentración de AGVs, en especial butirato y propionato, y amonio, compuestos que inhiben la etapa fotofermentativa (Adessi, 2013). Es por ello que resulta necesario encontrar formas de acoplar con éxito los dos procesos.

El lote alimentado y secuencial son dos formas de operar una fermentación, y cada una tiene sus propias características y ventajas.

En un cultivo por lote alimentado el volumen inicial de operación es establecido en un valor dado. Según las características de la fermentación, se alimenta al reactor una cierta cantidad de medio de cultivo fresco y estéril, ya sea en pulsos o continuamente. En el caso

de una fotofermentación, la alimentación se puede realizar una vez que la fuente de carbono haya alcanzado la mitad de la concentración inicial o cuando comienza la producción de hidrógeno (Ren et al., 2009). Este tipo de cultivo tiene la ventaja de evitar la inhibición por productos, sustrato o algún otro factor que evite la producción de hidrógeno debido a su alta concentración en el medio. Lo anterior, se logra por las características intrínsecas del proceso, es decir, la alimentación continua y dilución del caldo de cultivo. Además, está demostrado que en un cultivo lote alimentado, la producción de hidrógeno puede llevarse a cabo durante más tiempo en un solo proceso, que en un cultivo en lote (Argun & Kargi. 2011).

Por otro lado, en un cultivo en lote secuencial el proceso se comienza como un cultivo en lote. El tiempo para que se lleve a cabo la fermentación se establece en un valor dado (en producción de hidrógeno puede variar entre 240 y 480 horas). Una vez terminada la fermentación se recupera la mayor cantidad de biomasa posible por medio de sedimentación. La biomasa se resuspende en un volumen igual de medio fresco y estéril y se comienza una nueva etapa. El proceso se repite de 3 a 4 veces, o hasta que la actividad microbiana decaiga. La ventaja que tiene ese tipo de cultivo es la posibilidad de lograr que la nitrogenasa, enzima responsable de la producción de hidrógeno, se exprese. Esto debido a que en cada ciclo, las trazas de nitrógeno que pudieron quedar en la etapa de crecimiento, se van diluyendo hasta que pueden desaparecer por completo. Además, el microorganismo se puede adaptar mejor a las condiciones del medio debido a los altos THR que se tienen. Al haber una ausencia total o casi total de nitrógeno, la actividad de esta enzima se incrementa y la producción del gas aumenta (Argun & Kargi. 2011).

Con lo anterior en mente, en el presente trabajo se busca encontrar con qué régimen de cultivo se puede encontrar la mayor productividad (producto/biomasa-tiempo, producto/volumen-tiempo), y que tanto incrementa el rendimiento en comparación con un cultivo en lote. Esto, usando un consorcio fotofermentativo y acetato como única fuente de carbono.

2. Marco teórico

2.1. Hidrógeno como fuente de energía.

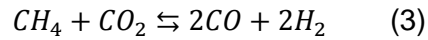
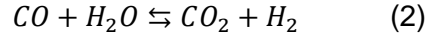
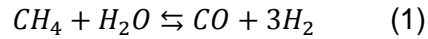
Actualmente, los combustibles fósiles siguen siendo una de las principales fuentes de energía (Liu et al. 2011). Estos combustibles son utilizados en industrias productoras de un sinnúmero de productos: en casas, fábricas, medios de transporte de todo tipo, etcétera. El uso indiscriminado de este tipo de fuente de energía ha causado poco a poco un impacto negativo en el medio ambiente (Ozmihci y Kargi. 2010), ello debido a que la combustión de estos combustibles son la principal fuente de gases de efecto invernadero. Los cuales causan el calentamiento global (Botas et al. 2005). Por si fuera poco estos combustibles son una fuente de energía no renovable (Azwar et al. 2014).

En miras de ayudar con el problema de contaminación se ha optado por usar energías alternativas, de preferencia renovables. Entre ellas se encuentra el uso de hidrógeno.

La producción de hidrógeno se puede llevar a cabo de varias formas, entre las que se encuentran la electrólisis del agua, producción mediante gas natural, mediante carbón, metano o por medio de microorganismos (Turner. 2004). Ésta última representa la forma más limpia de producir hidrógeno (Chen y Chang. 2006, Zhu et al. 1999), no sólo porque durante esta no se utilizan grandes cantidades de otros tipos de combustibles, sino porque dependiendo del proceso se pueden utilizar como fuente de carbono residuos de desecho de otros procesos, teniendo así un impacto secundario benéfico.

Como se indicó, la utilización de hidrógeno como fuente de energía busca reducir el impacto que tiene la producción de gases de efecto invernadero sobre el medio ambiente. Sin embargo, en algunos de los procesos de producción química se utilizan fuentes de energía o se realizan reacciones químicas que generan, directa o indirectamente, monóxido y dióxido de carbono, ocasionando que el uso del hidrógeno obtenido por estos métodos no sea del todo una energía limpia.

En el método por reformado con vapor de gas natural se hace reaccionar metano o monóxido de carbono con agua, lo que resulta en hidrógeno pero también en gases de efecto invernadero. También se puede hacer reaccionar metano y dióxido de carbono, obteniendo los mismos resultados (Botas, et al. 2005), tal como se muestra en las siguientes ecuaciones:



Para poder llevar a cabo las reacciones anteriores es necesario alcanzar temperaturas de hasta 1500°C (Sánchez. 2007), lo que requiere un gasto energético elevado. Adicionalmente, el proceso se lleva a cabo utilizando combustibles fósiles.

Mediante el método de oxidación de fracciones petrolíferas pesadas y carbón, se tienen el mismo resultado, oxidación de hidrocarburos hasta hidrógeno, agua y gases de efecto invernadero (CO y CO₂) (Botas et al., 2005).

Por otro lado, el proceso de producción de hidrógeno por electrólisis del agua demanda una gran cantidad de energía térmica y eléctrica, por lo que la conversión neta de energía total puede ser baja (Montes et al., 2005). Además de que para poder producir esta energía térmica se tienen, inevitablemente, como subproductos gases de efecto invernadero.

Dentro del método de producción por medio de bioprocesos existen varias formas de producir hidrógeno. Entre ellas se encuentra la biofotólisis, que puede ser directa o indirecta, fermentación oscura y fotofermentación (Adessi, 2013).

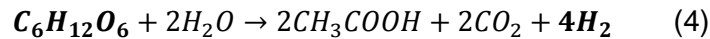
La biofotólisis se lleva a cabo por algas verdes y cianobacterias (Adessi, 2013), y este método no se estudiará en el presente trabajo, por lo que ahondaremos solamente en fermentación oscura y fotofermentación, sobre todo en ésta última.

2.2. Fermentación oscura

Este proceso de producción de hidrógeno puede ser llevado a cabo por un gran número de microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos (López et al., 2015). Se debe llevar a cabo en condiciones anóxicas, ya que el oxígeno inhibe las vías por las cuales se produce el biogás (Amrouche et al. 2013). Sin embargo, la producción de hidrógeno por este método, en términos de rendimiento, es baja debido a que se producen metabolitos de bajo peso molecular (Ácidos grasos volátiles, AGVs) como subproductos (López et al., 2015), ocasionando que solo una parte del metabolismo se dirija hacia la producción del biogás.

Los microorganismos capaces de producir hidrógeno por este método utilizan como fuente de carbono monosacáridos (glucosa como norma general) los cuales, bajo condiciones anóxicas como ya se dijo, y en un medio rico en nitrógeno, producen hidrógeno, dióxido de

carbono y acetato/butirato como subproductos (Amrouche et al. 2013). La siguiente ecuación muestra la relación estequiométrica del proceso antes mencionado, en el cual podemos apreciar que la producción teórica máxima que se puede obtener de hidrógeno es de 4 moles por mol de glucosa.



Sin embargo, este rendimiento difícilmente se puede alcanzar ya que una gran cantidad de sustrato lo utilizan los microorganismos para su manutención y crecimiento. Algunos estudios reportan productividades de menos de la unidad de mol de H₂ por mol de glucosa consumido. Por ejemplo de 0.376 y 0.71 en el estudio de Mark et al (2006) y Amrouche et al. (2013) respectivamente. También se ha encontrado que el rendimiento disminuye por la presencia de enzimas hidrogenasas denominadas *uptake* las cuales se encargan de reciclar el biogás cuando el microorganismo necesita poder reductor (Adessi, 2013).

La producción de hidrógeno por medio de este proceso se lleva a cabo indistintamente de día o de noche, la luz no es un factor determinante, a diferencia de la fotofermentación en la cual es indispensable la luz solar para los microorganismos. Por este hecho a éste proceso se le denomina *fermentación oscura*. El proceso se divide en tres etapas, la primera donde se lleva a cabo la hidrólisis de la materia orgánica, en la cual se lleva a cabo producción de biomasa. La segunda etapa se conoce como la fase acidogénica, donde se producen los AGV's y la tercera fase metanogénica, en la cual se produce el biogás (Gómez, 2015).

2.3. Fotofermentación

Las bacterias que pueden producir hidrógeno por medio de fotosíntesis se conocen como bacterias púrpuras no sulfurosas (BPNS). Existen diferentes grupos de estas bacterias, los cuáles se clasifican en *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* y *Rhodobacter* (López et al., 2015).

Estas bacterias tienen la capacidad de sintetizar ATP en ausencia de oxígeno utilizando la luz solar como fuente de energía. Todas las BPNS pueden crecer fotoheterotróficamente usando compuestos carbonados reducidos como donadores de electrones, algunas especies pueden incluso crecer fotoautotróficamente utilizando como donadores de electrones compuestos como S₂, H₂ o Fe²⁺ y dióxido de carbono como única fuente de carbono (Adessi, 2013). Entre los sustratos que puede utilizar están los AGVs, siendo el producto principal el hidrógeno.

La producción de hidrógeno por este medio se debe llevar a cabo en condiciones de luz y anoxigénicas. Bajo estas condiciones el aparato fotosintético es el encargado de aportar la energía suficiente para la producción de hidrogeno por medio de la acción de una nitrogenasa. Dicha enzima se encarga de la fijación de nitrógeno para reducirlo a amonio y esto sucede cuando en el medio se encuentra cualquier forma de este elemento. En condiciones de ausencia de nitrógeno, la actividad de esta enzima será la responsable del 70% de la producción de hidrógeno (López et al 2015, Adessi. 2013).

En la figura 1 se muestra un esquema del sistema fotosintético y la forma en la cual se genera una cadena de transporte de electrones para culminar con la producción de hidrógeno. Este sistema tiene un gran parecido con la cadena transportadora de electrones de los organismos aerobios, y al igual que en ellos el gradiente de protones necesario se produce a través de una ATP sintetasa.

Estos microorganismos constituyen una buena opción para producir hidrógeno ya que pueden realizar una conversión mucho más eficiente de sustratos, a diferencia de la fermentación oscura (López et al. 2015). También pueden utilizar gran variedad de sustratos como fuente de carbono, incluyendo una gran parte de los ácidos tricarbónicos implicados en el ciclo de Krebs, también piruvato, acetato, alcoholes y carbohidratos en general (Adessi, 2013). Otro beneficio que ofrecen estas bacterias es que pueden absorber tanto en la luz visible como en la luz infrarroja, esto es, de 400 hasta 900 nm (López et al., 2015), con lo cual se puede trabajar en espectros de luz amplios y con diferentes fuentes luminosas, y así buscar incrementar la eficiencia en la producción de hidrógeno.

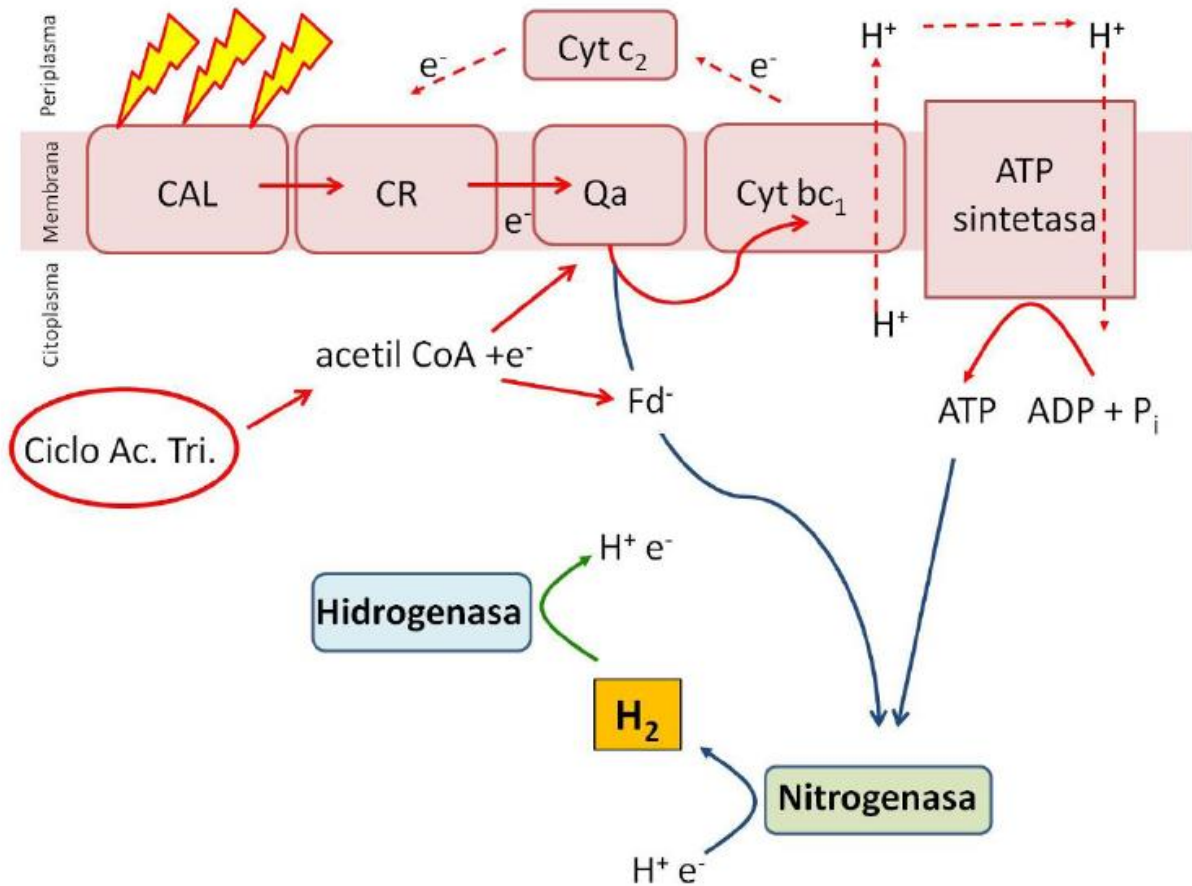
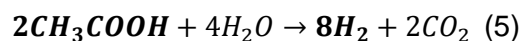


Figura 1. Sistema fotosintético.

Sistema fotosintético de *Rhodobacter sphaeroides*. Las líneas rojas indican el proceso para la producción de energía bajo condiciones anóxicas. Las líneas azules muestran la activación de la Nitrogenasa (sólo cuando existen bajos niveles de nitrógeno en el medio) para la producción de hidrógeno. La línea verde muestra la actividad de la hidrogenasa *uptake* para el reciclaje del hidrógeno. Qa = quinona, Cyt=citocromo, CAL=complejo para almacén de luz, CR=centro de reacción, Fd=ferrodoxina. Fuente: (López et al. 2015).

La ecuación (5) muestra la relación estequiometría en la producción de hidrógeno por el proceso de fotofermentación, si bien se utiliza de forma general acetato como fuente de carbono, se puede utilizar como sustrato cualquiera de los antes mencionados (en especial lactato, butirato y malato), dando como resultado siempre los mismos productos, los cuales son hidrógeno y dióxido de carbono.



A pesar de que en esta forma de producción de hidrógeno se tiene un rendimiento teórico mayor, 8 moles de H₂ por mol de hexosa, de igual manera que en la fermentación oscura no se puede alcanzar el rendimiento máximo teórico de producción de hidrógeno debido a la cantidad de sustrato que se utiliza para crecimiento y mantenimiento, y también a la presencia de hidrogenasas *uptake*. Además, según las condiciones del medio y los requerimientos de las células, el metabolismo se puede desviar hacia la síntesis de reservas energéticas (hidroxipolialcanoatos) y a la síntesis de pigmentos para aprovechamiento de la energía (Larimer et al., 2004).

A pesar de lo anterior, el porcentaje de conversión es mucho mayor al obtenido en una fermentación oscura, en el cual es de menos del 30% (moles de H₂ obtenidos experimentalmente por moles de H₂ estequiométricos). Varios estudios reportan un rendimiento que va desde el 45% hasta el 70% de conversión de sustrato a hidrógeno (Azwar et al., 2014, Chen y Chang, 2006). Esto indica que el proceso de fotofermentación ofrece un mejor rendimiento que la fermentación oscura.

2.3.1. Cultivos fotoheterotróficos

Una gran cantidad de autores han estudiado la producción de hidrógeno por fotofermentación usando cepas nativas o modificadas genéticamente como único microorganismo productor. Sin embargo, la producción de hidrógeno a partir de materiales de desecho se inicia de manera ideal desde una fermentación oscura.

Se han realizado estudios usando fuentes de carbono complejas, como maíz pretratado (Yang et al., 2010), almidón de tapioca (Cheng et al., 2011), almidón de trigo (Ozmihci y Kargi, 2010), entre otros, como sustrato en una fermentación oscura, obteniendo en el efluente una alta concentración de AGVs como butirato, acetato y propionato. Estas fuentes de carbono aún pueden ser usadas por organismos fotoheterotróficos para continuar la producción de hidrógeno, o de otros compuestos de valor agregado como polihidroxialcanoatos (PHAs).

Si bien se ha demostrado que las cepas puras, ya sean nativas o modificadas, de BPNS pueden metabolizar estos sustratos (Lo et al., 2011), los efluentes de una fermentación oscura no solamente se componen de estos VGAs, sino de una gran cantidad de compuestos, algunos desconocidos, que pueden afectar positiva o negativamente la producción de hidrógeno. Entre los anteriores se encuentra el amonio, uno de los principales inhibidores de la enzima nitrogenasa (Adessi. 2013).

Por esta razón se ha considerado utilizar consorcios fotoheterotróficos, es decir, un cultivo en el que se presentan una gran diversidad de microorganismos que tienen metabolismos versátiles y entonces son capaces de metabolizar estos compuestos orgánicos y así poder utilizar de manera más eficiente los efluentes de una fermentación oscura (Cai et al., 2012).

En el trabajo desarrollado se utilizó un consorcio fotoheterotrófico y la BPNS presente en mayor proporción en éste es *Rhodopseudomonas palustris*.

2.3.2. *Rhodopseudomonas palustris*

Es una BPNS que pertenece a las alfa proteobacterias. Está distribuida en la naturaleza en lagos, lagunas, estanques y costas. Puede crecer utilizando cuatro metabolismos diferentes, así estas bacterias son fotoautotróficas o fotosintéticas, fotoheterotróficas, quimioheterotróficas y quimioautotróficas. También puede crecer con o sin oxígeno (anaerobia facultativa) y puede utilizar una gran cantidad de compuestos orgánicos como aceptor final de electrones (Larimer et al., 2004).

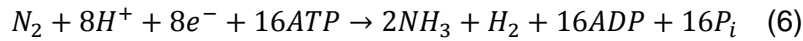
Las BPNS ganan electrones y protones mediante la degradación de ácidos orgánicos y cómo resultado generan ATP mediante sus fotosistemas. Dichos electrones, protones y el mismo ATP pueden usarse para el funcionamiento de una nitrogenasa cuando hay condiciones de limitación de nitrógeno. Cuando el nitrógeno, ya sea en forma de gas o en forma amoniacal, está ausente, la nitrogenasa puede actuar como una enzima no específica y convertir los protones (H^+) en hidrógeno (H_2) (Wu et al. 2012).

Debido a lo anterior estas bacterias tiene la habilidad de producir hidrógeno utilizando como fuente de carbono el efluente que se produce durante una fermentación oscura (AGVs), pudiendo realizar un sistema de dos reactores (anaeróbico y fotofermentativo) para hacer más eficiente la producción de hidrogeno. La ventaja de usar un proceso acoplado es el incremento en el rendimiento del proceso global, ya que en la fermentación oscura se producen entre 1.0-2.5 mol H_2 /mol glucosa y en fotofermentación se producen entre 3.3-4.6 mol H_2 /mol glucosa (Oh et al. 2004), lo que permitiría obtener un alto rendimiento global de hidrogeno.

2.3.2.1. Nitrogenasa

Esta enzima se encarga de la producción de amonio a partir de nitrógeno para obtener una fuente de éste elemento cuando es escaso en el ambiente.

Durante el proceso de síntesis de amonio se produce hidrógeno como subproducto. El proceso requiere de una gran cantidad de ATP, el cual proviene de la reducción de ácidos orgánicos gracias a la energía de la luz, tal como lo muestra la reacción 6 (López et al. 2013).



La nitrogenasa consta de dos componentes: la proteína Mo-Fe o complejo dinitrogenasa, en la cual se realiza la síntesis del amonio, y la proteína Fe o sub-unidad reductasa, la cual transporta los electrones de los donadores hacia el complejo dinitrogenasa (López et al., 2015). Existen distintos tipos de complejos dinitrogenasa, la más común y la que más eficientemente convierte en amonio el nitrógeno es la nitrogenasa Mo, las otras dos contienen Fe y V como cofactores (Larimer et al., 2004). Estas dos nitrogenasas son menos eficientes en la producción de amonio, pero más eficientes en la producción de hidrógeno. (López et al., 2015).

La síntesis de esta enzima ocurre bajo condiciones anóxicas y es regulada negativamente en presencia de oxígeno. Otra enzima de importancia es la hidrogenasa *uptake*, la cual es una enzima respiratoria que recupera los electrones del H₂ reduciendo las quinonas de la membrana, las cuales están involucradas en la respiración anaerobia. En la producción de hidrógeno esta enzima no es deseable debido a que por obvias razones afecta la producción de este gas (Adessi. 2013).

A parte de *R. palustris*, en el consorcio se encuentran en una alta proporción los géneros *Desulfovibrio* y *Bacteroides*.

2.3.3. *Desulfovibrio*

Es una bacteria anaerobia estricta y sulfato-reductora, esto es, que puede usar el sulfato como aceptor final de electrones en la oxidación anaerobia de compuestos orgánicos. (Alur, 1999).

Este tipo de bacterias pueden metabolizar ácidos grasos superiores e inferiores, propionato, lactato y piruvato a acetato. También es importante mencionar que algunas especies de estas bacterias pueden usar el hidrógeno molecular como única fuente de energía para reducir sulfato a ácido sulfhídrico. Por otro lado, algunas especies tienen la capacidad de fijar nitrógeno, aunque la reducción de nitratos a amonio es rara. (Alur, 1999).

2.3.4. *Bacteroides*

Las especies pertenecientes a este género son gram negativas, anaerobias, no formadoras de esporas y sin motilidad. A pesar de ser un género anaerobio pueden soportar bajas tensiones de oxígeno, lo que las hace aerotolerantes. Pueden metabolizar una gran cantidad de sustratos orgánicos, en especial azúcares como glucosa, almidón, celulosa, pectina, dextrano, entre otras. Estas bacterias pueden usar de una forma eficiente el amonio como fuente de nitrógeno para crecer o para transformarlo a glutamato. También tienen actividad proteolítica, por lo que pueden utilizar péptidos como fuente de nitrógeno. Sin embargo, no tienen la capacidad de usar aminoácidos. (Smith et al, 2006).

2.4. Factores que afectan la producción de hidrógeno.

Como se mencionó, la nitrogenasa es la enzima encargada de producir hidrógeno cuando el nitrógeno en el medio está ausente. El principal inhibidor de la enzima es el mismo nitrógeno (a excepción del dinitrógeno N_2). Dado que la enzima se expresa cuando las BPNS necesitan sintetizar amonio cuando éste se encuentra ausente (Adessi 2013) la presencia de amonio en el medio inhibe la expresión de la enzima. Argun et al (2008), reportan una concentración mínima inhibitoria de 47 mg/L de amonio.

También el oxígeno afecta a la nitrogenasa, ya que este destruye irreversiblemente a la enzima. Por otro lado, dado a que en condiciones anaeróbicas las BPNS utilizan su aparato fotosintético para generar ATP, cuando el oxígeno está presente se ve inhibida la síntesis de bacterioclorofila (Koku et al, 2002).

En este trabajo en particular el proceso por el cual el consorcio fotofermentativo llevará a cabo la producción de hidrógeno será solo fotofermentación. Para ello, se utilizarán tres tipos de regímenes: lote, lote alimentado y lote secuencial. Con lo anterior se busca conocer con cuál régimen de alimentación (lote alimentado o lote secuencial) se obtiene mayor productividad de hidrógeno. Para poder tener un punto de comparación (blanco o testigo) se realizará la producción en lote.

2.5. Cultivo por lote

Es un proceso cerrado, dado que únicamente se alimentan una vez los reactantes, que en este caso sería el microorganismo y el medio de cultivo, el cual incluiría la fuente de carbono y los nutrientes. Posteriormente solamente se adicionan buffers para control de pH, antiespumantes y oxígeno (en el caso del presente trabajo éste último no se desea).

Después de un periodo definido de tiempo la composición del medio varía, tanto en concentración celular como de sustrato y metabolitos. Después de ello se interrumpe el proceso y se recupera el producto deseado (Hernández. 2003).

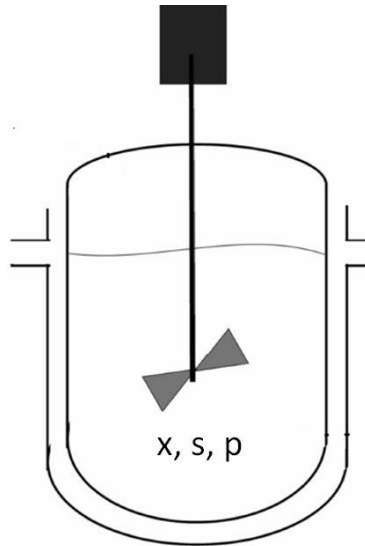


Figura 2. Cultivo por lote.

Como se muestra en la figura 2, en este tipo de cultivo no hay entrada ni salida de materiales, por tanto la ecuación general de balance de materia sería de la forma indicada en la ecuación (7):

$$\text{Acumulación} = \text{Producción} - \text{Consumo} \quad (7)$$

Este balance general aplica para la biomasa en el reactor así como para el sustrato y el producto.

Comenzaremos por analizar el balance de la biomasa, en el que la cantidad de biomasa en el reactor vendrá dada por xV , donde x es la concentración de biomasa y V el volumen total de operación (medio). Por definición, la tasa volumétrica de producción de biomasa está dada por: $r_x = x\mu$, en donde μ es la velocidad específica de crecimiento en unidades de tiempo a la menos uno. En cuanto al consumo también se tiene una tasa de muerte celular $r_d = k_d x$, donde k_d es la constante específica de muerte celular en las mismas unidades que μ (Doran, 1998).

Con todo lo anterior podemos obtener el balance para la biomasa como:

$$\frac{d(xV)}{dt} = \mu xV - k_d xV \quad (8)$$

Dado que en un cultivo por lote el volumen es constante, éste se puede sacar de la diferencial. Posteriormente, se divide cada término entre el volumen y despreciamos la muerte celular. Así se obtiene la ecuación 9, la cual es una expresión del cambio de concentración celular con respecto al tiempo en un cultivo por lote.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (9)$$

De manera análoga, se puede obtener el balance para el sustrato, pero hay que realizar algunas consideraciones. El sustrato se utiliza para que los microorganismos produzcan biomasa, pero también se requiere para que se produzca producto, además, el microorganismo necesita de una cantidad dada de sustrato para poder realizar sus funciones metabólicas, a esta cantidad se le conoce como “energía de mantenimiento” y se denota por la letra m . Por tanto, se debe considerar el consumo de sustrato para estos tres casos. El microorganismo no es capaz de generar más sustrato, por lo que únicamente se considera en el balance el consumo.

$$R_c = \frac{dsV}{dt} = \left(\frac{\mu}{Y_{xs}} + \frac{q_p}{Y_{ps}} + m \right) xV$$

Donde R_c es la velocidad de consumo de sustrato, Y_{xs} es el rendimiento estequiométrico de biomasa con respecto al sustrato, q_p es la velocidad específica de producción de producto y Y_{ps} es el rendimiento estequiométrico de producto con respecto al sustrato.

El volumen es constante en este cultivo, por lo que se puede sacar de la diferencial y podemos dividir ambos términos entre éste mismo, obteniendo así la ecuación 2, la cual es una expresión del consumo de sustrato con respecto al tiempo en un cultivo por lote.

$$\frac{ds}{dt} = \left(\frac{\mu}{Y_{xs}} + \frac{q_p}{Y_{ps}} + m \right) x \quad (2)$$

En el caso del producto se tiene lo contrario al sustrato, no hay consumo pero si producción, por lo tanto el balance solo considerará esto último.

$$R_p = \frac{dpV}{dt} = q_p xV$$

Donde R_p es la velocidad de producción de producto.

Considerando que en un cultivo por lote el volumen es constante, se puede sacar de la diferencial y dividir los términos entre éste. Así se llega a una expresión (ecuación 3) que relaciona la producción de producto con respecto al tiempo en un cultivo por lote.

$$\frac{dp}{dt} = q_p x$$

En este caso para poder calcular q_p debemos saber qué tipo de producto estará produciendo el microorganismo. Si se trata de un metabolito asociado al crecimiento únicamente dependerá de μ y de la productividad del producto con respecto a la biomasa Y_{px} (denominada α). Si se trata de un metabolito parcialmente asociado al crecimiento dependerá de esto mismo más una constante denominada β , que es la velocidad específica de producción de producto independiente de la biomasa. Por último, si el metabolito no se asocia al crecimiento únicamente dependerá de la constante β (Doran. 1998). Las diferentes ecuaciones planteadas se representan a continuación:

$$q_p = \alpha \mu \text{ --- Asociada al crecimiento.}$$

$$q_p = \beta \text{ --- No Asociada al crecimiento.}$$

$$q_p = \alpha \mu + \beta \text{ --- Asociada parcialmente al crecimiento.}$$

La presencia de un compuesto tóxico en el medio lleva a una menor tasa de crecimiento del microorganismo. Por lo general es la velocidad específica de crecimiento (μ) la que se ve afectada por estas casusas. Existen tres tipos de inhibición: competitiva, no competitiva y acompetitiva. La inhibición se puede dar tanto por sustratos agregados al medio de cultivo, como por productos que el propio microorganismo excreta al medio (UDL. 2015).

2.6. Cultivo por lote alimentado

En este tipo de operación, la alimentación de nutrientes se realiza de manera intermitente o continua, con el fin de controlar la concentración de sustrato existente en el reactor. Comenzando con una concentración diluida relativamente de sustrato y añadiendo más nutrientes conforme avanza la conversión se evita que se produzcan elevadas velocidades de crecimiento.

Para este caso el volumen no es constante, ya que al alimentar medio al reactor éste va en aumento, por lo cual tenemos que:

$$\frac{dV}{dt} = F$$

Donde F es el flujo de alimentación, el cual puede ser lineal, exponencial, etcétera.

De manera análoga al cultivo por lote se establece el balance de masa, con la diferencia de que en este caso se tiene:

$$\text{Entrada} + \text{Generación} - \text{Consumo} = \text{Acumulación}$$

Por lo que a la ecuación se le debe añadir la cantidad de especie o materia añadida en la alimentación. Así para el balance de biomasa se tendrá:

$$\frac{dxV}{dt} = Fx_i + (\mu - k_d)x$$

Donde x_i es la concentración de biomasa que ingresa con el medio alimentado.

En este caso el volumen es dependiente del tiempo, por lo que es necesario separar los términos de la ecuación.

$$x \frac{dV}{dt} + V \frac{dx}{dt} = Fx_i + (\mu - k_d)Vx$$

$$xF + V \frac{dx}{dt} = Fx_i + (\mu - k_d)Vx$$

Dividiendo entre el volumen y reordenando

$$\frac{dx}{dt} = \frac{F}{V}x_i + x \left(\mu - k_d - \frac{F}{V} \right)$$

Si definimos una velocidad de dilución $D = F/V$, obtenemos:

$$\frac{dx}{dt} = Dx_i + x(\mu - k_d - D)$$

En los bioprocesos es común que el medio que ingresa al reactor sea estéril, por lo cual no contendría ningún tipo de microorganismo, con lo que x_i se elimina. Si además la velocidad de muerte celular es despreciable en comparación con la velocidad específica de crecimiento entonces la ecuación se simplificaría, obteniendo una expresión que relaciona el cambio de concentración celular con respecto al tiempo en un cultivo por lote alimentado.

$$\frac{dx}{dt} = x(\mu - D)$$

En el caso del sustrato también se realiza un balance de masa, pero en este caso si hay entrada de sustrato, y en lugar de generación tenemos consumo.

$$\frac{dsV}{dt} = F(s_i - s) - \left(\frac{\mu}{Y_{xs}} + \frac{q_p}{Y_{ps}} + m \right) Vx$$

Donde s_i es la concentración del sustrato que ingresa al reactor. Dado que el volumen no es constante, se tiene:

$$s \frac{dV}{dt} + V \frac{ds}{dt} = F s_i - \left(\frac{\mu}{Y_{xs}} + \frac{q_p}{Y_{ps}} + m \right) Vx$$

$$sF + V \frac{ds}{dt} = F s_i - \left(\frac{\mu}{Y_{xs}} + \frac{q_p}{Y_{ps}} + m \right) Vx$$

Dividiendo cada expresión entre el volumen y considerando que $F/V = D$, obtenemos la ecuación 5, la cual expresa el consumo de sustrato con respecto al tiempo en un cultivo por lote alimentado:

$$\frac{ds}{dt} = D(s_i - s) - \left(\frac{\mu}{Y_{xs}} + \frac{q_p}{Y_{ps}} + m \right) x \quad \text{--- (5)}$$

Para el producto debemos realizar un balance del mismo modo, esta vez considerando que no hay consumo pero si producción:

$$\frac{dpV}{dt} = F p_i + q_p x V$$

Dado que el volumen no es constante, tenemos:

$$p \frac{dV}{dt} + V \frac{dp}{dt} = F p_i + q_p x V$$

$$pF + V \frac{dp}{dt} = F p_i + q_p x V$$

Dividiendo cada término entre el volumen y considerando que $F/V = D$:

$$\frac{dp}{dt} = F(p_i - p) + q_p x$$

En un cultivo por lote alimentado es poco común que la corriente de entrada contenga producto, por lo que la expresión que relaciona la producción de sustrato con respecto al tiempo en un cultivo por lote alimentado sería:

$$\frac{dp}{dt} = -Fp + q_p x \text{ --- (6)}$$

Donde q_p , al igual que en el cultivo por lote, se puede sustituir por la ecuación correspondiente ya sea si el producto se trata de un metabolito asociado, asociado parcialmente, o no asociado al crecimiento.

Argun y Kargi (2011) en un estudio de revisión bibliográfica, indican que el realizar tanto fermentación oscura como fermentación en un sistema lote alimentado (Fed Batch) tiene considerables ventajas sobre los sistemas en lote y continuo. Una de las más marcadas es la posibilidad de evitar la inhibición que las sustancias tóxicas causan sobre el crecimiento y/o la producción de hidrógeno. También se explica que cuando la tasa de alimentación del medio es igual a la tasa de consumo de sustrato, se alcanza en el reactor un estado *quasi* estacionario.

2.7. Cultivo en lote secuencial

Los cultivos en lote secuencial se basan en un sistema de llenado y vaciado. Todos estos procesos se llevan a cabo en un mismo reactor y siguen una determinada secuencia que se divide en cuatro etapas. La primera es la etapa de llenado, la cual puede ser estática, mezclada o aireada. Cabe aclarar que en esta etapa el medio alimentado debe ser de las mismas características que el medio inicial, igual que en un cultivo por lote alimentado. La segunda etapa es la etapa de reacción, en la cual el reactor se mezcla de la mejor manera posible y se permite el consumo del sustrato bajo condiciones de operación controladas. La tercera etapa es de sedimentación, en la cual los sólidos suspendidos se dejan sedimentar para obtener un sobrenadante clarificado el cual posteriormente será descargado como efluente. La última etapa es la de vaciado, en el cual el sobrenadante se descarga de manera tal que el material sedimentado no sea también vaciado. Se suele emplear un tiempo que va desde un 5 hasta un 30% del tiempo total (Muñoz y Ramos. 2014).

En algunas ocasiones el reactor se deja operar en régimen continuo para alcanzar un periodo de aclimatación, y posteriormente se comienza a operar en lote secuencial. (Lin & Jo. 2003). También, la relación que existe entre el tiempo de reacción y el tiempo de

sedimentación (R/S) suele ser importante para la operación del reactor y el rendimiento del bioproceso. (Lin & Jo. 2003, Sreethawong et al. 2010).

En cuanto al balance de biomasa, sustrato y producto, el reactor opera básicamente como un cultivo por lote, interrumpido en los procesos de descarga y llenado. Por ello, las ecuaciones que definen el cambio de concentraciones de las especies con respecto al tiempo para un cultivo por lote pueden utilizarse en este caso.

El sistema en lote secuencial es usado ampliamente en sistemas de tratamiento de aguas y hay pocos estudios relacionados con la producción de hidrógeno. Xie et al. (2012) realizaron un estudio donde se utiliza una cepa específica para producir hidrógeno mediante este tipo de cultivo: *Rhodopseudomonas faecalis* RLD-53. En dicho estudio se pone de manifiesto que el tiempo de retención hidráulico (TRH) es una variable importante a controlar. El rendimiento final de producción de hidrógeno en el estudio es de 3.12 mol H₂/mol acetato, lo que equivaldría a 6.24 mol H₂/mol glucosa. También se recalca la importancia que tiene la concentración del sustrato que se alimenta en cada nuevo ciclo.

2.8. Reactores Agitados Mecánicamente (RAM)

Debido a que en el presente trabajo se trabajará con un RAM resulta necesario explicar sus características

Este tipo de reactores son tanques cilíndricos con un motor que mueve una flecha central, la cual soporta uno o más agitadores o impulsores. Por lo regular se colocan tres o cuatro baffles o deflectores separados la misma distancia del centro alrededor de la periferia del tanque (Guevara López, 2004). Éstos se utilizan con la finalidad de evitar la formación de vórtices, lo cual mejora el mezclado (Hernández, 2003), aunque también tienen otras funciones, como la de evitar la formación de espuma (en los procesos en que esto se puede presentar) y hacer eficiente la transferencia de energía, ya que al formarse estos vórtices el impulsor disipa gran parte de la energía hacia el aire que se encuentra dentro de dichos vórtices.

Dependiendo de si el proceso es aerobio o anaerobio los RAM pueden tener un sistema de aireación. El aire se incorpora mediante una bomba haciéndose pasar antes por un filtro para esterilizarlo, posteriormente se hace pasar por una placa difusora con orificios o por

tubos perforados (Hernández, 2003), es entonces cuando los impulsores se encargan de su distribución a todo el caldo de fermentación.

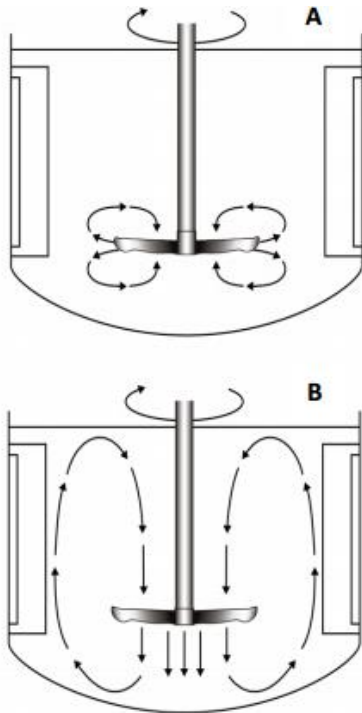


Figura 3. Patrones de flujo: A) Radial. B) Axial

Debido a la necesidad de mantener mezclado el medio de cultivo y para asegurar que todos los nutrientes, incluyendo el oxígeno, estén disponibles en cualquier parte del caldo para que el microorganismo los utilice, los impulsores tienen un papel fundamental en este tipo de reactores. El número de impulsores se define en base al tamaño del fermentador, y su disposición dentro de éste depende de la configuración geométrica del recipiente (Hernández, 2003). Los impulsores se clasifican de acuerdo a su patrón de descarga como: radiales y axiales. El flujo generado por los impulsores radiales está dirigido hacia las paredes del biorreactor, tal como se muestra en la figura 4A. Por otro lado los impulsores axiales dirigen el flujo en dirección axial hacia la base del tanque y transfieren movimiento a todas direcciones a lo largo del tanque (figura 4B). Estos impulsores se caracterizan por mantener suspendidas las células aunque la transferencia de oxígeno es limitada (Martínez, 2009).

3. Justificación

La fermentación oscura es una alternativa viable para tratar residuos que normalmente son desechados al ambiente sin un tratamiento previo, tales como aguas residuales, efluentes de la industria quesera, residuos sólidos orgánicos, etcétera. Sin embargo, el efluente obtenido de esta fermentación aún contiene una carga elevada de contaminantes, como AGVs y amonio, por lo que el uso subsecuente de una fotofermentación resulta deseable.

Sin embargo, ciertos compuestos contenidos en los efluentes de una fermentación oscura no pueden ser asimilables de forma eficiente por las bacterias fotofermentativas, pudiendo causar incluso la muerte de los microorganismos, como lo es el caso del butirato y el propionato.

Por lo anterior resulta indispensable encontrar alternativas que permitan la utilización de estos efluentes para así obtener todos los beneficios que ofrece una fotofermentación. Los cuales son producción de hidrógeno, PHAs y pigmentos, aunado al hecho de que también cumple con un impacto positivo al medio ambiente al tratar los desechos mencionados con anterioridad.

Una opción para lograr esto es la operación de la alimentación del reactor fotofermentativo. Un reactor trabajando en lote alimentado puede disminuir los efectos inhibitorios por sustrato o producto debido a la dilución que se tiene durante la alimentación. Por otro lado, un reactor en lote secuencial puede mejorar la producción debido al tiempo que se mantienen los microorganismos en la fase de producción, lo cual puede lograr que se adapten al medio y puedan utilizar de manera más eficiente los nutrientes presentes en éste.

En el presente trabajo se pretende producir hidrógeno a partir de una fotofermentación evaluando la producción del gas en un sistema de producción por lote, lote alimentado y lote secuencial, comparando las productividades producto/biomasa-tiempo y producto/volumen-tiempo. Esto con el fin de encontrar el más viable para un posterior acoplamiento con fermentación oscura.

4. Objetivo

Evaluar la producción de hidrógeno por fotofermentación en un reactor por lote, lote alimentado y lote secuencial.

4.1. Objetivos específicos

1. Optimizar los medios de cultivo de crecimiento y producción.
2. Evaluar la producción de hidrógeno del consorcio fotofermentativo en un reactor por lote en medio mineral y acetato como única fuente de carbono.
3. Conocer el cambio de las poblaciones microbianas que se da en el consorcio durante la etapa fotofermentativa en un proceso lote.
4. Evaluar la producción de hidrógeno del consorcio fotofermentativo en un reactor por lote alimentado en medio mineral y acetato como única fuente de carbono.
5. Evaluar la producción de hidrógeno del consorcio fotofermentativo en un reactor por lote secuencial en medio mineral y acetato como única fuente de carbono.

6. Metodología

6.1. Consorcio fotofermentativo.

El consorcio fotofermentativo usado, fue previamente obtenido por el grupo de trabajo mediante selección por medio de una columna de Winogradsky. La distribución inicial de las poblaciones del consorcio se muestra en la figura 4. Esta distribución corresponde a la etapa de crecimiento. Como se puede apreciar el 18% de la población es *Rhodopseudomonas*.

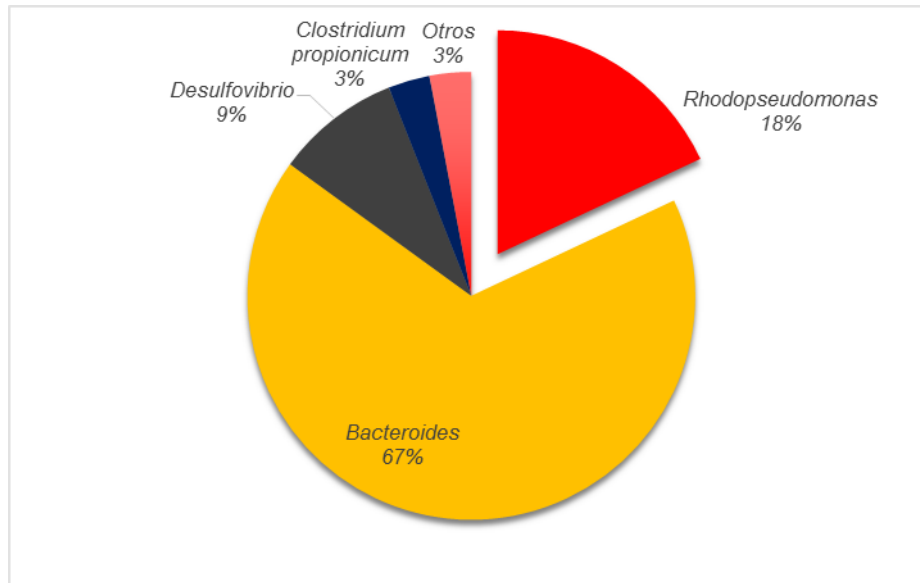


Figura 4. Distribución de la población del consorcio fotofermentativo en fase de crecimiento.

6.2. Optimización de medios

Antes de poder realizar el proceso fermentativo en un reactor, resulta necesario estandarizar los medios de crecimiento y producción, por lo cual se realizó la optimización de los mismos.

Lo anterior se realizó mediante el método de superficie de respuesta. Usando el diseño CCD (diseño central compuesto) para dicho fin.

El CCD: es el tipo de diseño más utilizado en esta a su flexibilidad: se puede construir a partir de un diseño factorial 2^k constituyendo la porción factorial del DCC, agregando puntos sobre los ejes en lo que se denominará porción axial y puntos al centro que se denominarán

porción central. Resulta clave para las propiedades del diseño la distancia entre el centro del diseño y la porción axial; generalmente.

El software utilizado para la optimización fue Design Expert®.

Todos los tratamientos se realizaron por duplicado.

6.2.1. Optimización de medio de crecimiento

Para la optimización del medio de crecimiento se variaron tres parámetros: concentración de fosfato de sodio monobásico y dibásico, usados como solución reguladora, y concentración de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

Los valores entre los que se realizó la optimización fueron de 4 a 10 mM para fosfato de potasio monobásico, 1.6-10 mM para fosfato de potasio dibásico y 0.5 a 1 g/L para extracto de levadura.

La matriz de tratamientos se obtuvo mediante el software mencionado, resultando un número total de 15. De ellos fueron cinco tratamientos centrales, cuatro tratamientos factoriales y seis tratamientos axiales. En la tabla 1 se muestra la matriz de tratamientos usada para la optimización. La columna de pH muestra el valor de pH de la solución reguladora obtenida con las dos sales de fosfato de potasio.

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en botellas serológicas de 100 mL. Para la inoculación se tomaron 10 mL de un consorcio en previo crecimiento (72 horas), y se añadieron a 90 mL de medio de crecimiento, obteniendo una concentración inicial de 0.1 g/L de biomasa. La atmósfera de anaerobiosis se logró desplazando el oxígeno con gas argón. La temperatura se mantuvo a 32 °C y el pH se ajustó a 6.8. Las cinéticas se dejaron correr por 5 días. La fuente de carbono fue acetato de sodio a una concentración de 2 g/L para todos los tratamientos. La fuente de luz fue luz led blanca.

Las respuestas a optimizar fueron concentración de biomasa en g/L, densidad óptica (DO) a 630 nm y pH. La biomasa se determinó por medio de método de Bradford y la DO por espectrofotometría a 630 nm, ambos realizados en un espectrofotómetro UV-vis PrerkinElmer® Delta XLS. El pH se determinó con un potenciómetro digital.

Tabla 1. Matriz de tratamientos para la optimización de medio de crecimiento.

Fosfato de potasio monobásico (mM)	Fosfato de potasio dibásico (mM)	Extracto de levadura g/L	pH
2.89	2.80	0.75	7.19
4.00	1.60	0.50	6.80
4.00	4.00	1.00	7.20
7.00	1.16	0.75	6.42
7.00	2.80	0.75	6.80
7.00	2.80	0.75	6.80
7.00	2.80	0.41	6.80
7.00	2.80	0.75	6.80
7.00	2.80	0.75	6.80
7.00	2.80	1.09	6.80
7.00	2.80	0.75	6.80
7.00	4.44	0.75	7.00
10.00	1.60	0.50	6.40
10.00	4.00	1.00	6.80
11.11	2.80	0.75	6.60

6.2.2. Optimización de medio de producción.

Para la optimización del medio de producción se variaron tres parámetros: concentración de glutamato de sodio y extracto de levadura y tiempo de crecimiento del inóculo.

Los valores entre los que se realizó la optimización fueron de 1 a 3 g/L para glutamato de sodio, 0 a 0.2 g/L de extracto de levadura y de 48 a 96 horas de crecimiento.

La matriz de tratamientos se obtuvo mediante el software, resultando en 15 diferentes tipos de tratamientos. Cinco tratamientos centrales, cuatro tratamientos factoriales y seis tratamientos axiales. En la tabla 2 se muestra la matriz de tratamientos usada para la optimización.

Tabla 2. Matriz de tratamientos para la optimización de medio de producción.

Glutamato de sodio (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	Tiempo (h)
2.00	0.10	38
1.00	0.00	48
3.00	0.20	48
2.00	0.00	72
0.59	0.10	72
2.00	0.10	72
2.00	0.10	72
2.00	0.10	72
2.00	0.10	72
2.00	0.10	72
3.41	0.10	72
2.00	0.24	72
3.00	0.00	96
1.00	0.20	96
2.00	0.10	106

Las cinéticas de producción se realizaron en botellas serológicas de 100 mL. Para la inoculación se tomaron 100 mL del consorcio en crecimiento, se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos y toda la pastilla de biomasa resultante se resuspendió en 100 mL de medio de producción. La atmósfera de anaerobiosis se logró desplazando el oxígeno con gas argón. La temperatura se mantuvo a 32 °C y el pH inicial fue de 6.8. Las cinéticas de dejaron correr por 10 días. La fuente de carbono fue acetato de sodio a una concentración de 2 g/L para todos los tratamientos. La fuente de luz fue luz led blanca.

Las respuestas a optimizar fueron concentración de biomasa en g/L y porcentaje de hidrógeno producido (medido como volumen de hidrógeno en volumen total de espacio de aire en una botella). El gas se determinó por método de cromatografía de gases en un cromatógrafo de gases Mac-Gow® serie 580.

6.3. Determinación de amonio y nitrógeno inorgánico total residual.

Para asegurarse de que la concentración de amonio en el medio de producción no fuera un factor limitante en la producción de hidrógeno, se siguió la cinética de consumo de amonio y nitrógeno inorgánico total durante el crecimiento y se determinó la concentración inicial de ambos en la cinética de producción.

Para hacer lo anterior se tomaron 100 mL del caldo de crecimiento y se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos. Se recuperó la pastillas y se resuspendió en 100 mL de medio de producción libre de toda fuente de nitrógeno. A este medio se determinó amonio y nitrógeno inorgánico total.

La determinación de nitrógeno se hizo por medio del kit HACH. Para la determinación de amonio se utilizó el kit Nitrogen-Ammonia Reagent Set, TNT, AmVer (Salicylate), High Range. Mientras que para la determinación de nitrógeno total se usó el kit Nitrogen, Total Inorganic, Test N' Tube.

Para obtener la concentración (ppm) de nitrógeno contenido en amonio se usó la relación de pesos moleculares N/NH_4^+ , para conocer qué porcentaje del peso molecular de amonio corresponde solo al nitrógeno, y así poder reportar nitrógeno inorgánico total y nitrógeno de amonio en conjunto.

6.4. Operación en reactor.

Los procesos de producción que se analizaron en el presente trabajo fueron lote alimentado y lote secuencial. Como sistema de referencia se corrió también un cultivo en lote.

6.4.1. Producción por lote

El consorcio utilizado para la producción se inoculó en un reactor RAM a una concentración inicial de 0.1 g/L, el cual tuvo un medio mineral rico y acetato de sodio como única fuente de carbono a una concentración de 2.5 g/L. Se establecieron condiciones anóxicas en el reactor utilizando argón para desplazar al oxígeno. La fuente luminosa se proporcionó por lámparas de leds colocadas por fuera y alrededor del tanque. La intensidad luminosa por fuera del mismo fue de $29.2 \mu E/m^2 \cdot s$. La velocidad de agitación se estableció en 200 rpm. El pH se ajustó a 6.8 y la temperatura a 35 °C. El volumen inicial fue de 4 litros. Posteriormente se determinó el porcentaje de hidrógeno contenido en el reactor por medio de cromatografía de gases. Durante todo el proceso se obtuvieron muestras cada 24 horas y se determinó proteína por método de Bradford y concentración de sustrato residual y

AGVs por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Usando una relación de peso seco y concentración de proteína se calculó la concentración de biomasa en g/L.

6.4.2. Producción por lote alimentado

Las condiciones usadas en este proceso fueron las mismas que en el proceso por lote. Se inició con un volumen de 1.5 litros y se añadió medio estéril y libre de oxígeno una vez que se alcanzó la mitad de consumo de acetato, usando de referencia los resultados de cultivo por lote. Esto fue a las 168 horas. La forma de alimentación fue por pulsos de 0.5 L cada 72 horas a partir de la primera alimentación hasta alcanzar un volumen final de 3.5 L. Posteriormente se determinó el porcentaje de hidrógeno contenido en el gas producido por medio de cromatografía de gases. Durante todo el proceso se obtuvieron muestras cada 24 horas y se determinó biomasa y concentración de sustrato residual y AGVs.

6.4.3. Producción por lote secuencial

En este tipo de cultivo se utilizó el mismo reactor y las mismas condiciones de temperatura, concentración de biomasa y sustrato y pH que en los procesos anteriores. El reactor se llenó con 4 L de medio de cultivo y se inoculó con el consorcio proveniente de proceso de crecimiento, previa centrifugación a 3500 rpm por 20 minutos, para obtener una concentración inicial de 0.1 g/L de biomasa. Después se dejó reaccionar por 420 horas. Se dejó sedimentar el caldo de cultivo durante 2 horas. El sobrenadante se extrajo con bomba de vacío alcanzar un volumen de 1.0 L. Posteriormente se añadió medio fresco estéril con una concentración de acetato de sodio de 2.5 g/L hasta tener de nuevo un volumen de 4L. Se dejó reaccionar por 420 horas y se repitió el procedimiento anterior una vez más, a fin de realizar 3 ciclos en total. Durante todo el proceso se obtuvieron muestras cada 24 horas y se determinó biomasa y concentración de sustrato residual y AGVs.

6.5. Evolución de poblaciones.

Se realizó el seguimiento de la evolución del consorcio fotofermentativo en el cultivo en lote. El método utilizado para ello fue pirosecuenciación, la cual es una tecnología de determinación de DNA a gran escala mediante luminiscencia.

La determinación se realizó en las fases lag, exponencial y estacionaria.

7. Resultados

7.1. Optimización de medio de crecimiento.

Para la optimización del medio de crecimiento se obtuvieron los análisis ANOVA de los resultados a los tiempos 48, 72, 93 y 120 de las respuestas DO a 630 nm, pH y biomasa en g/L. Se eligieron estos tiempos porque está demostrado en múltiples estudios que entre el segundo y quinto día de crecimiento, las bacterias fotofermentativas alcanzan la fase exponencial. Lo anterior, con la finalidad de observar si el modelo obtenido (superficie de respuesta) resulta en un buen acercamiento a las condiciones reales y si los parámetros evaluados influyen directamente sobre las respuestas que se desean optimizar.

Los resultados de estos análisis se encuentran en la sección de anexos, y en esta sección se discutirán los más representativos e importantes para los objetivos del presente trabajo.

Para la respuesta de biomasa en g/L, los resultados mostraron que a un tiempo de 48 y 72 horas, el modelo obtenido no es significativo a un nivel de significancia de 0.05. Esto es, el modelo no puede predecir los efectos que tiene sobre la biomasa la concentración de extracto de levadura y de fosfato de potasio monobásico y dibásico. Por el contrario, a las 93 y 120 horas el modelo es significativo.

Esto se aprecia también con el valor obtenido para la R cuadrada ajustada. Siendo para 48 y 72 horas menor a 0.75 (0.59 para ambos casos) y para las 93 y 120 de 0.94 y 0.75, respectivamente. Según Muñoz (2015), un valor menor a 0.75 en la R cuadrada ajustada indica que la variabilidad del proceso no puede ser explicada por el modelo, lo cual muy probablemente indique que no es la mejor manera de evaluar la respuesta de biomasa con este modelo o con las variables usadas.

En los dos modelos significativos se obtuvo que el extracto de levadura, variable C, resulta significativa, obteniendo valores de significancia de 0.0003 y 0.009 para 93 y 120 horas respectivamente. Lo anterior indica que el extracto de levadura influye directamente sobre la concentración de biomasa, esto debido a que contiene una alta cantidad de nitrógeno y nutrientes, indispensables para el crecimiento del microorganismo.

A las 93 y 120 horas se determinó también que la interacción entre las variables concentración de extracto de levadura y fosfatos es significativa, afectando directamente al crecimiento. Lo anterior se muestra de mejor manera en las figuras 5 y 6.

La figura 5 muestra la superficie de respuesta de la concentración de biomasa en g/L en función de la concentración de extracto de levadura y fosfato de potasio monobásico a las 93 horas de crecimiento. Es evidente que la concentración de extracto de levadura afecta de manera positiva al crecimiento del consorcio. Entre mayor sea la concentración de extracto, mayor será la concentración de biomasa. Por el contrario, si la concentración de fosfato monobásico se incrementa, el crecimiento celular se ve afectado negativamente. Este efecto sólo se da a concentraciones por debajo de 0.75 g/L de extracto de levadura.

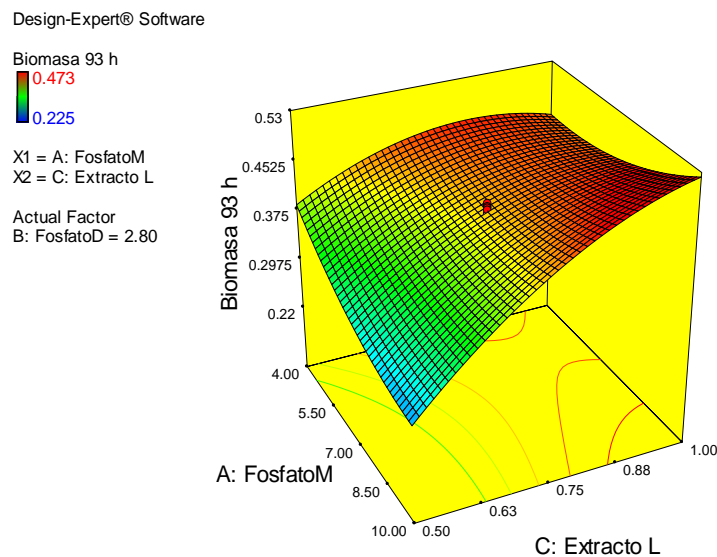


Figura 5. Superficie de respuesta de biomasa (g/L) en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 93 horas de crecimiento.

La figura 6 muestra la superficie de respuesta de la concentración de biomasa en g/L en función de la concentración de extracto de levadura y fosfato de potasio dibásico a las 120 horas de crecimiento. En este caso, el efecto inhibitorio de la concentración de fosfato no existe de la manera en que se presenta con el fosfato de potasio monobásico. La diferencia en las tendencias se puede deber a múltiples factores. Por un lado, la alta concentración de fosfatos en el medio causa una disminución de la actividad de agua (a_w), lo que puede ocasionar que el consorcio se vea limitado en su crecimiento ya que todo su aparato enzimático se ve limitado (Davey, 1989). Por otro lado, los fosfatos en el medio actúan como solución reguladora, evitando incrementos acelerados de pH que se dan durante el crecimiento del consorcio fotofermentativo. Así, la concentración de fosfatos influye sobre el crecimiento microbiano, tanto de manera positiva como de manera negativa. El MSR

usado permite encontrar la concentración de sales de fosfato óptima, de entre el rango evaluado, para obtener la mayor cantidad de biomasa posible y el menor incremento de pH.

Las superficies de respuesta obtenidas para los demás tiempos evaluados y las interacciones entre las tres variables evaluadas no se muestran dado que no resultaron ser significativas.

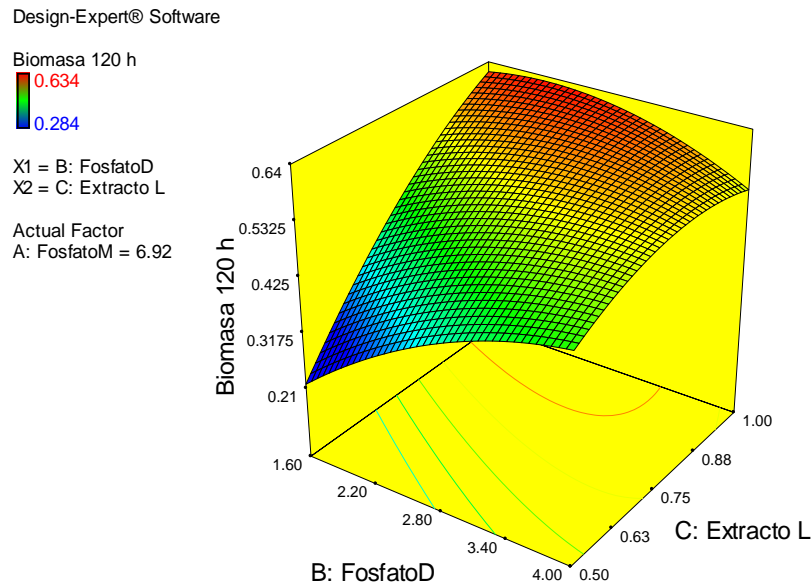


Figura 6. Superficie de respuesta de biomasa (g/L) en función de extracto de levadura (g/L) y sulfato de potasio dibásico (mM) a las 120 horas de crecimiento.

Se determinó el crecimiento tanto por proteína como por DO. Debido a que la determinación de DO se ve afectada por la concentración de los pigmentos y la relación entre ambos parámetros no es constante. En el caso de la respuesta de DO a 630 nm, los modelos para los tiempos a 48, 93 y 120 horas resultan significativos, es decir, que pueden predecir los resultados del proceso. Sin embargo, a 48 horas no hay una interacción entre las variables independientes que resulte significativa. Por otro lado, para los tres tiempos la concentración de extracto de levadura afecta directamente la DO. A una mayor concentración del compuesto, mayor DO se obtiene. Esto se da debido a dos razones: en primer lugar por el crecimiento celular y en segundo lugar porque la síntesis de pigmento está asociado al crecimiento (Takemoto y Lascelles, 1973). Resulta evidente que entre mayor sea la cantidad de pigmento que sintetice el consorcio, mayor será la DO.

Lo anterior mencionado se demuestra de mejor manera al analizar las superficies de respuesta de DO, mostradas en las figuras 7 y 8, las cuales muestran la misma tendencia que la explicada para la respuesta en la concentración de biomasa (g/L). Entre mayor sea la concentración de extracto de levadura (g/L) mayor será el valor de DO. Por otro lado, entre mayor sea la concentración de fosfato monobásico, menor será el valor obtenido de DO.

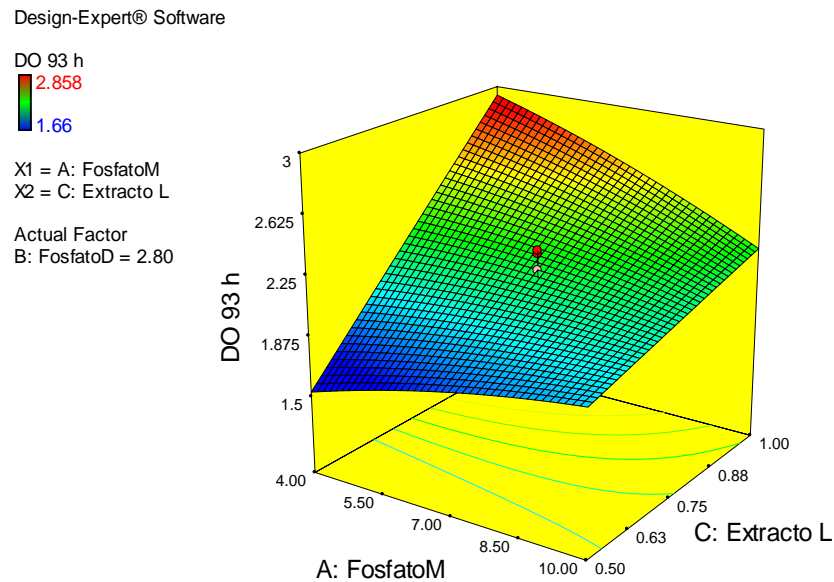


Figura 7. Superficie de respuesta de DO (630 nm) en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 93 horas de crecimiento.

El hecho de que a tiempos cortos (48 y 72 horas de cinética) no se tenga un efecto significativo de las variables sobre el proceso, se puede deber a que durante esta fase hay otros factores que no se consideran en el modelo que afectan al crecimiento y en consecuencia a la DO. Conforme el tiempo de cinética avanza, el pH del medio toma un papel importante sobre el crecimiento microbiano y entonces la concentración de fosfatos influye significativamente. Lo anterior se demuestra con el análisis de varianza y las superficies de respuesta de pH.

Design-Expert® Software

DO 120 h

3.836

2.157

X1 = B: FosfatoD

X2 = C: Extracto L

Actual Factor

A: FosfatoM = 7.00

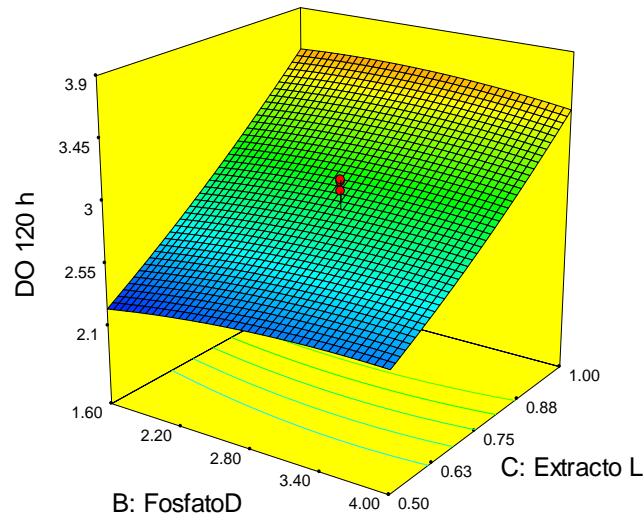


Figura 8. Superficie de respuesta de DO (630 nm) en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 120 horas de crecimiento.

Para la respuesta de pH todos los modelos obtenidos son significativos. En las figuras 9, 10, 11 y 12 se muestran las superficies de respuesta para pH en función de la concentración de extracto de levadura en g/L y concentración de fosfato de potasio monobásico en mM a los tiempos 48, 72, 93 y 120 horas respectivamente. En todos los casos se aprecia el efecto que tiene la concentración de fosfato. Entre mayor sea la concentración el efecto regulador es mayor y el aumento de pH resulta menor. Por otro lado, se ve también que la concentración de extracto de levadura tiene un efecto sobre el incremento de pH inverso al que tiene la concentración de fosfatos. Entre mayor sea la concentración del extracto, mayor es el incremento de pH.

Lo anterior no se debe a un efecto directo del extracto de levadura sino al crecimiento celular. Como se vio en las gráficas anteriores (biomasa y DO) a mayor concentración de este compuesto, mayor crecimiento celular. El crecimiento celular está asociado al incremento de pH, como lo mencionan Türkarslan et al. (1998) y Kim et al. (2006), y como se puede comprobar en la cinética de crecimiento presentada en la figura 14 y en las cinéticas de producción de hidrógeno obtenidas. Kim et al. (2006) y Cardeña et al. (2015) reportan que el incremento de pH se debe a la transformación que se da de las fuentes de nitrógeno a amonio por su concentración en exceso en el medio.

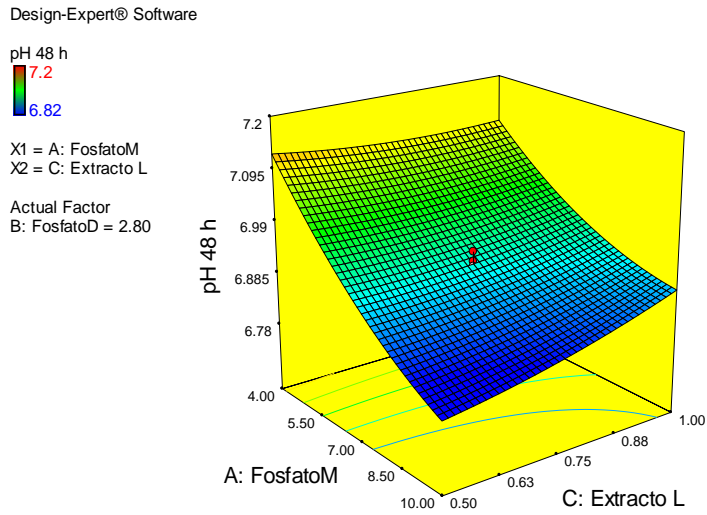


Figura 9. Superficie de respuesta de pH en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 48 horas de crecimiento.

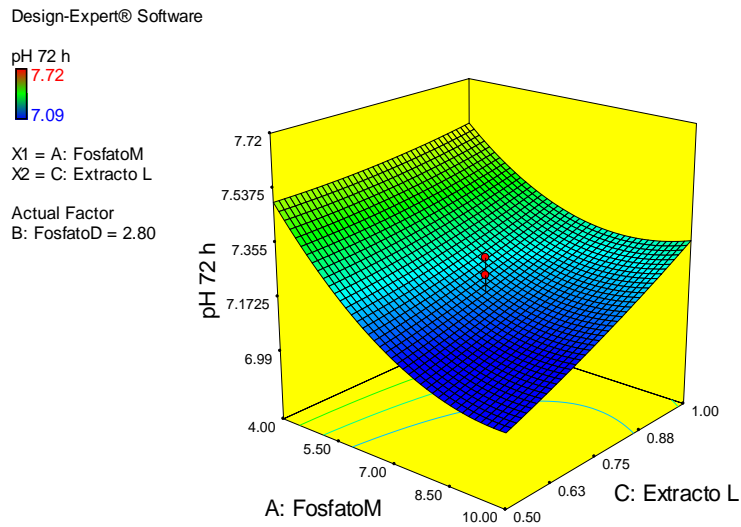


Figura 10. Superficie de respuesta de pH en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 72 horas de crecimiento.

Design-Expert® Software

pH 93 h



X1 = A: FosfatoM
X2 = C: Extracto L

Actual Factor
B: FosfatoD = 2.80

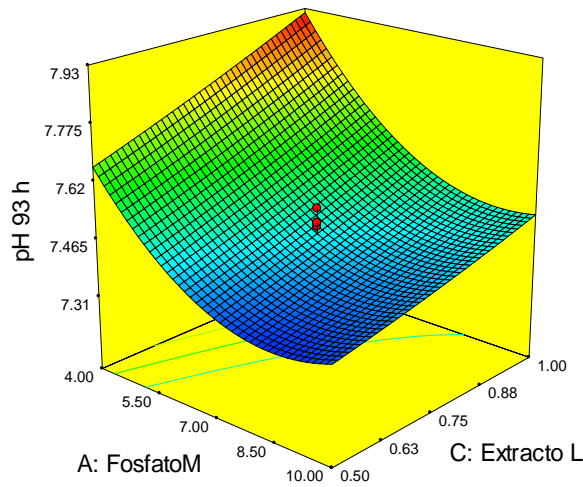


Figura 11. Superficie de respuesta de pH en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 93 horas de crecimiento.

Design-Expert® Software

pH 120 h



X1 = A: FosfatoM
X2 = C: Extracto L

Actual Factor
B: FosfatoD = 2.80

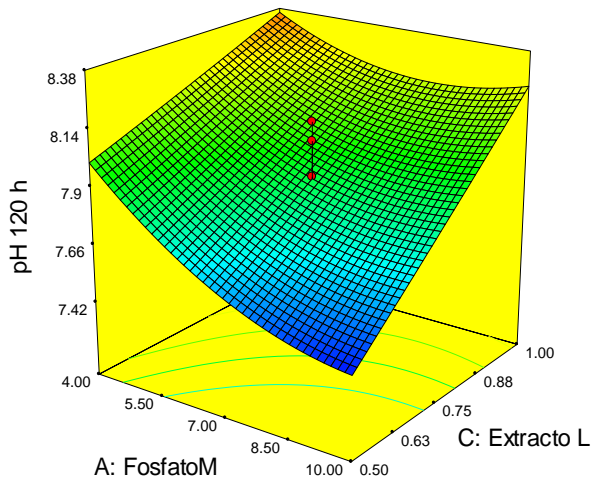


Figura 12. Superficie de respuesta de pH en función de extracto de levadura (g/L) y fosfato de potasio monobásico (mM) a 120 horas de crecimiento.

Con el mismo software usado para generar el análisis ANOVA y las superficies de respuesta, se procedió a optimizar las respuestas. El tiempo elegido para la optimización fue 93 horas, debido a que en la gran mayoría de los estudios realizados en fotofermentación, para cepas puras de BPNS y cultivos microbianos mixtos, se deja crecer por 96 horas para después comenzar la producción.

Durante el experimento se buscaba que la respuesta de biomasa (g/L) y DO (630 nm) fueran maximizadas y la respuesta de pH minimizada. Con ello, el software arrojó la gráfica de la figura 13. Esta gráfica de contornos muestra el valor máximo teórico que se obtendría de concentración de biomasa bajo las mejores condiciones predichas por el modelo dentro de la escala experimental, que son: 1 g/L de extracto de levadura, 7.58 mM de fosfato de potasio monobásico y 2.92 mM de fosfato de potasio dibásico, a un tiempo de 93 horas de crecimiento.

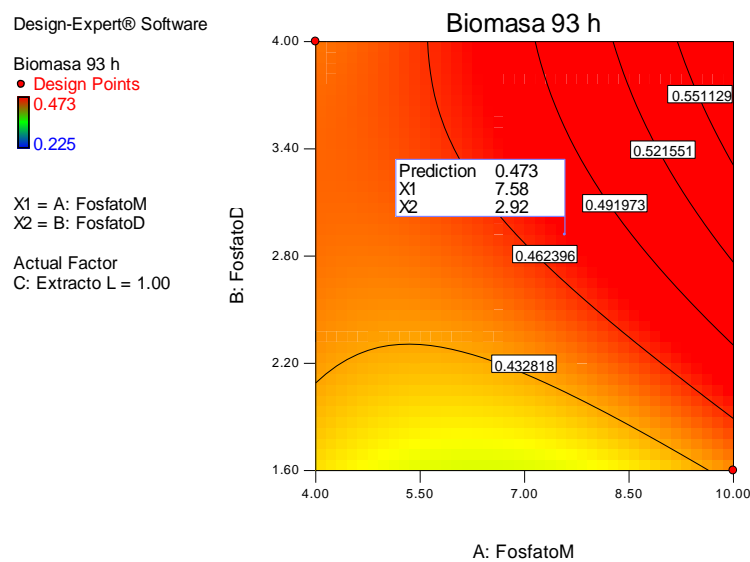


Figura 13. Gráfica de contornos de biomasa (g/L) en función de concentración de fosfatos (mM). Modelo predicho por el software.

Para saber si el modelo obtenido en la optimización se aproxima a las condiciones reales y puede ser usado, se necesita valorar el método. Para ello se corrió una nueva cinética de crecimiento usando las mejores condiciones obtenida. Se realizó por triplicado.

En la tabla 3 se muestran los resultados de los tratamientos. Tanto para la respuesta pH y biomasa no se encontró una diferencia significativa entre las condiciones estimadas y observadas. No así para los resultados de DO.

Lo anterior se debe a factores que no tienen que ver con el crecimiento, dado que la biomasa no varía de la misma manera. Como se mencionó anteriormente, la DO depende tanto de la concentración celular como de la concentración de pigmento. Yurkova y Beatty (1996) reportan que la síntesis de pigmento en BPNS depende de la intensidad de luz bajo la que crecen en condiciones fotosintéticas. Entre menor sea la intensidad de luz, el microorganismo se verá obligado a sintetizar mayor cantidad de pigmento para una mejor utilización de la energía.

Durante el experimento realizado la luz variaba en todos los tratamientos debido a la posición de estos en la agitadora orbital, a la presencia de obstáculos en la luz, como otras botellas, y la hora del día. Lo que puede explicar la diferencia en la DO sin que la haya en la concentración celular.

Tabla 3. Respuestas observadas y estimadas de pH DO y biomasa con las condiciones obtenidas en la optimización.

Muestra	Observados			Estimados			Desviación estándar entre el valor observado y el valor estimado por el modelo		
	Tiempo (h)	pH	DO	Biomasa (g/L)	pH	DO	Biomasa (g/L)	pH	DO (630 nm)
47	6.95 ± 0.03	1.04 ± 0.05	0.29 ± 0.02	6.91	1.114	0.310	0.03	0.051	0.017
72	7.17 ± 0.01	1.57 ± 0.13	0.38 ± 0.03	7.16	1.760	0.414	0.01	0.132	0.027
93	7.39 ± 0.1	1.95 ± 0.36	0.45 ± 0.01	7.54	2.459	0.446	0.10	0.358	0.005
120	7.77 ± 0.18	2.61 ± 0.56	0.57 ± 0.04	8.02	3.394	0.626	0.18	0.557	0.042

Finalmente, en la figura 14 se muestran los resultados de la cinética de crecimiento y pH usando las condiciones óptimas obtenidas. Donde se vuelve a poner de manifiesto la diferencia en las mediciones de DO debido a lo antes expuesto. Esto demuestra que la intensidad de luz debe ser un parámetro que se tiene que tomar en cuenta para la concentración del pigmento y una posterior optimización de la producción de hidrógeno. Si bien se sabe que éstos son los encargados de proporcionar el flujo de electrones necesario para el funcionamiento de la nitrogenasa, también se sabe que concentraciones altas de pigmentos pueden resultar inhibitorios para la producción de hidrogeno debido al efecto de sombra. El cual dificulta que los fotones de luz alcancen a las células que se encuentran al centro del caldo (Adessi, 2013).

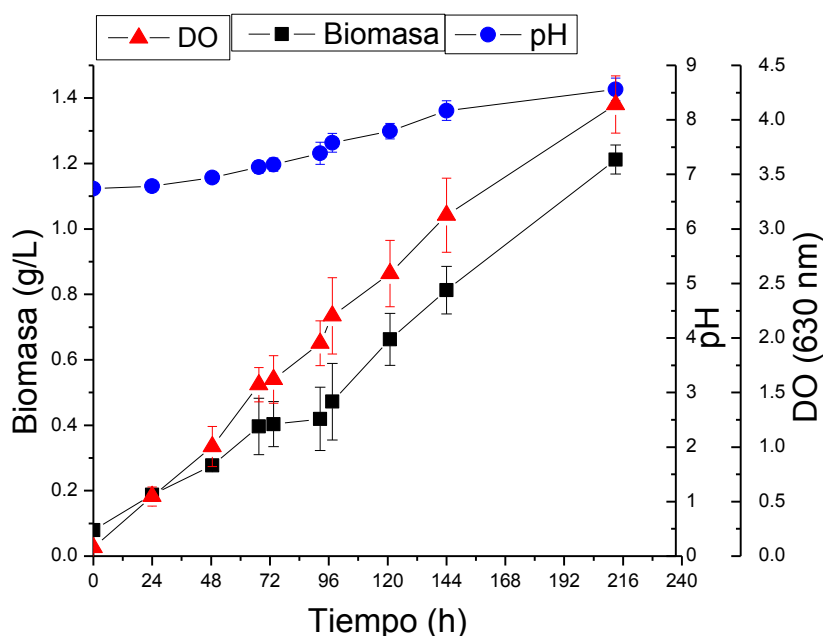


Figura 14. Cinética de crecimiento y pH del consorcio fotofermentativo bajo condiciones obtenidas en la optimización del medio de crecimiento.

7.2. Optimización de medio de producción.

Los resultados obtenidos durante la optimización del medio de producción no fueron satisfactorios. La producción de hidrógeno alcanzó un máximo de 2.66% concentración v/v (volumen de hidrógeno en volumen de aire en la botella), lo que equivale a 5.058 mL de

gas en un tiempo de 210 horas. Dado a lo anterior, la optimización fue descartada y se procedió a encontrar la causa de la baja producción.

7.3. Efecto de la concentración de glutamato de sodio en el medio de producción.

En muchos estudios, como los realizados por Oh et al (2004), Ren et al (2008) y Cardeña et al (2015), se realiza el proceso de crecimiento y producción en una misma etapa de fermentación usando glutamato como fuente de nitrógeno, obteniendo buenas productividades. Para que un microorganismo pueda crecer necesita fuente de nitrógeno, pero la presencia de amonio en el medio de crecimiento inhibe la expresión de los genes envueltos en la fijación del nitrógeno. Es por eso que la producción de hidrógeno se realiza usualmente en medios que contienen glutamato como fuente de nitrógeno (Golomysova et al, 2010). Por esta razón se probó optimizar el medio con este compuesto, sin embargo los resultados no fueron los esperados.

Para comprobar que el problema era la presencia de glutamato, se hicieron dos experimentos con y sin glutamato de sodio en el medio. La biomasa inicial fue 0.1 g/L, la concentración de glutamato de sodio fue de 3 g/L, se añadieron 2 g/L de acetato de sodio como fuente de carbono. Ambos tratamientos se realizaron por duplicado. El tiempo de cinética fue de 240 horas.

Los resultados se muestran en el figura 15

Es evidente que la producción de hidrógeno resulta afectada negativamente por la presencia de glutamato de sodio en el medio. No solo se inició la producción de hidrógeno 122 horas después en el cultivo que estaba en presencia de éste, sino que la cantidad producida fue aproximadamente 20 veces menor que en el caso en que no se tiene glutamato en el medio. Para la cinética en presencia de glutamato se obtuvo una producción máxima de 14.21 ± 0.78 mL de H_2 , mientras que para la cinética en ausencia de glutamato se obtuvo 0.678 ± 0.11 mL. Se aprecia que el consorcio que fue cultivado en el medio con glutamato de sodio crece de manera importante, alcanzando una concentración de 0.794 g/L, mientras que el consorcio que no está en presencia de glutamato alcanza solo los 0.22 g/L. Esto demuestra que el consorcio en presencia de glutamato está dirigiendo el metabolismo al crecimiento celular y esto, aunado al hecho de que la presencia de especies de nitrógeno inhiben la producción de hidrógeno, explica la baja producción del gas (Koku et al., 2002).

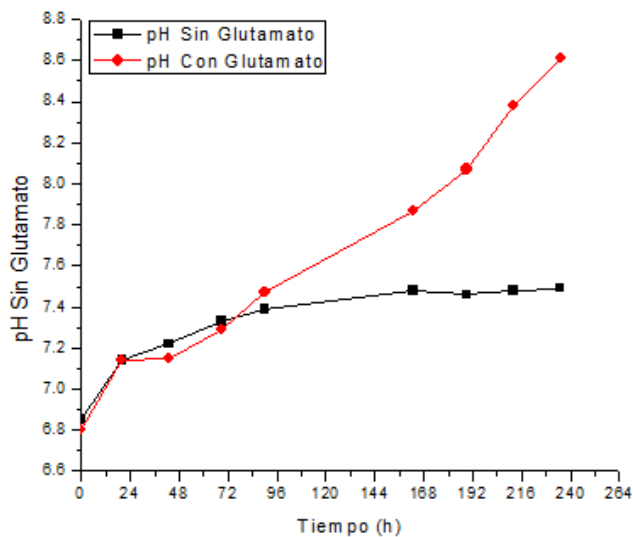
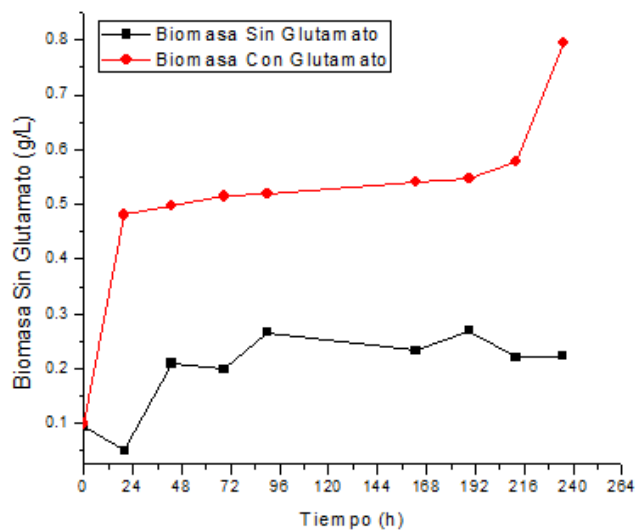


Figura 15. Efecto de glutamato de sodio sobre la biomasa y el pH en fase de producción.

La baja producción de hidrógeno en presencia de glutamato comparada con los reportes que se tienen usando la misma fuente de nitrógeno en los estudios antes mencionados, se puede deber a que en éstos se utilizó un solo microorganismo fotosintético, mientras que en el presente trabajo se utilizó un consorcio. Si bien está demostrado que *Rhodospseudomonas palustris* tiene la capacidad de producir hidrógeno en presencia de glutamato (Oh et al., 2004), los demás microorganismos presentes pueden afectar la producción de hidrógeno por la presencia de éste.

Por otro lado, es posible que la producción de hidrógeno comience a incrementar de manera acelerada pasadas las 210 horas de cinética. Los reportes que existen en la literatura mencionan que la producción de hidrógeno comienza cuando el microorganismo entra a la fase estacionaria en el crecimiento, lo cual coincide con el agotamiento de las fuentes de nitrógeno (Golomysova et al, 2010). Sin embargo, en el caso específico del consorcio usado, hasta las 210 horas comienza la producción, lo cual es 2 veces más el tiempo requerido cuando se utiliza medio libre de toda fuente de nitrógeno, factor que afecta de manera considerable la productividad.

Por los resultados anteriores se decidió trabajar las fermentaciones en fase de producción con un medio mineral libre de toda fuente de nitrógeno. Para asegurarse que no hubiera fuentes de nitrógeno inorgánicas en el medio de producción se realizó el seguimiento de la cinética de consumo de nitrógeno inorgánico y se determinó el valor inicial de éste y amonio en el proceso de producción.

7.4. Consumo de nitrógeno inorgánico

En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos de la cinética de consumo de nitrógeno inorgánico total y nitrógeno de amonio en ppm. Se aprecia como durante 96 horas de crecimiento el consumo de nitrógeno es muy bajo. Inclusive en las primeras 24 horas hay un incremento de concentración de nitrógeno.

La concentración de amonio aumenta en las primeras 24 horas de una concentración de 35.6 ppm a una concentración de 42.5 ppm. Esto se puede deber a que el consorcio fotofermentativo utilizado produce amonio reduciendo las fuentes de nitrógeno que se encuentran en alta concentración, como lo explica Cardeña et al. (2015). Según las especificaciones del fabricante, el extracto de levadura usado en el medio de cultivo contiene una concentración de nitrógeno amínico de aproximadamente 5.4% en peso. Esto significa que en el medio hay una concentración aproximada de 54 ppm de nitrógeno orgánico. Las bacterias fotofermentativas entonces pueden primero utilizar esta fuente de nitrógeno para crecer, y una vez agotada comenzarían a utilizar las fuentes inorgánicas, como el amonio.

La producción de amonio también explica el aumento de pH según lo reportado por Kim et al (2006) y Cardeña et al (2015).

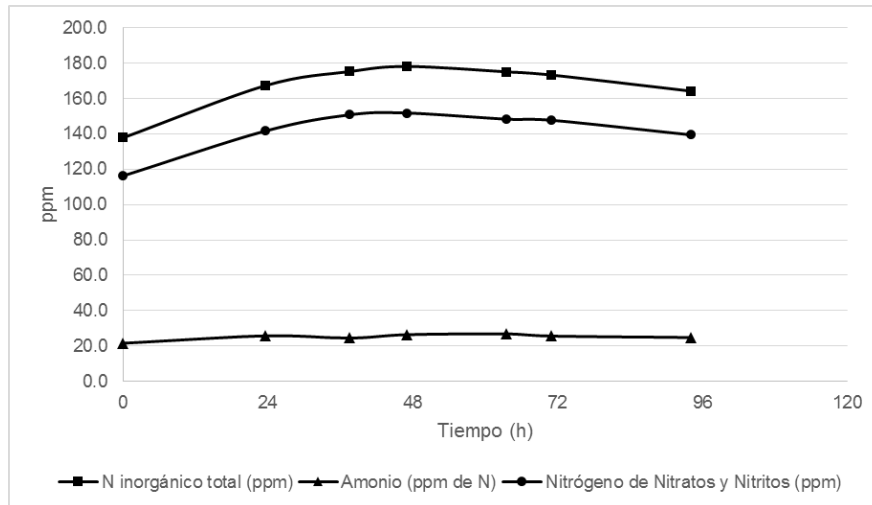


Figura 16. Cinética de consumo de Nitrógeno inorgánico.

La concentración inicial de amonio para el tiempo cero horas en la cinética de producción no se pudo detectar con los kits utilizados. El límite de detección inferior, según lo indica el fabricante, es de 5 ppm, mientras que Argun et al (2008) reportan una concentración mínima inhibitoria para la producción de hidrógeno en BPNS de 47 ppm de amonio. Por ello, podemos asegurar que el proceso de centrifugación asegura que la presencia de amonio no sea una limitante en la fase de producción de hidrógeno.

7.5. Cultivo por lote.

En la figura 17 se muestran las cinéticas de consumo de sustrato, producción de hidrógeno y crecimiento para la fase de producción en reactor por cultivo en lote.

La operación del reactor se inició con una concentración de acetato de 2.5 g/L. A partir de las 24 horas el consumo de este sustrato se lleva a cabo de manera continua hasta alcanzar un consumo máximo del 78% a las 503 horas de cultivo, resultando en un valor final de 0.55 g/L.

Por otro lado, la concentración inicial de biomasa fue de 0.1 g/L. Se observó una pequeña fase lag de 24 horas y posteriormente hubo crecimiento exponencial, el cual se detuvo al tiempo 264 horas con una concentración de 0.29 g/L. A partir de este tiempo y hasta que finalizó el proceso, el consorcio se mantuvo en fase estacionaria, llegando a un valor final de biomasa de 0.25 g/L.

Por último, la producción de hidrógeno se inició a las 96 horas, y se mantuvo con una tendencia exponencial hasta las 382 horas, donde el volumen producido fue de 1232 mL.

A partir de este momento la velocidad de producción del gas decayó, alcanzando un valor máximo acumulado de 1494.4 mL al cabo de 503 horas de cultivo.

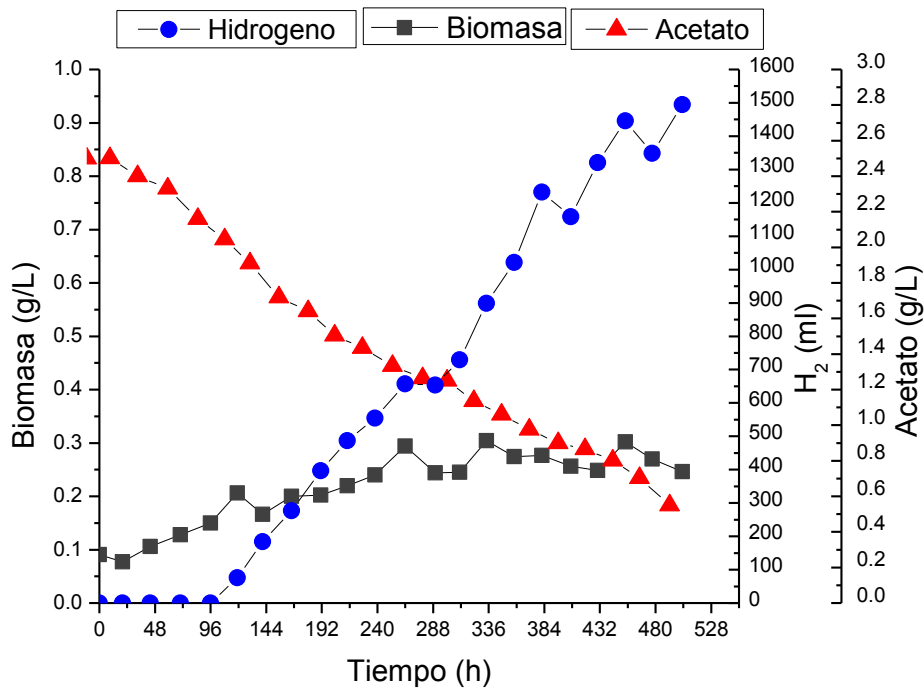


Figura 17. Cinética de producción de hidrógeno (mL), consumo de sustrato (g/L) y crecimiento celular (g/L) del cultivo por lote en reactor en fase de producción.

La tendencia de consumo de sustrato coincide con lo reportado por Lo et al (2011), donde utilizan la cepa WP3-5 de *Rhodopseudomonas palustris*, usando acetato como única fuente de carbono a una concentración inicial de 3 g/L. Los autores reportan un consumo de 77%. Por otro lado, Oh et al (2004) reportan un consumo del 60% usando una concentración inicial de 4 g/L, trabajando con la cepa P4 de *R. palustris*.

Oh et al (2004) también reportan que en ausencia total de fuente de nitrógeno el crecimiento del microorganismo es nulo, sin embargo, en el presente trabajo se observó crecimiento en la primera mitad del proceso (0.15 g/L). Si bien se demostró que hay ausencia de amonio en el medio, no se determinó nitrógeno orgánico, por lo cual las trazas que pudieron quedar del proceso de crecimiento favorecieron el desarrollo del consorcio microbiano. Esto también puede explicar que la producción de hidrógeno comience a las 96 horas de cultivo,

mientras que Oh et al (2004) y Lo et al (2011) reportan que la producción inicia desde las 24 horas.

Debido a que la escala del proceso del presente trabajo es distinta a los procesos reportados en la literatura (tabla 4), no es posible comparar los resultados obtenidos en términos de producción volumétrica de hidrógeno (mL). Por ello, se determinó la productividad específica y volumétrica global del proceso y también el rendimiento molar. La productividad específica expresa la producción máxima de hidrógeno (mL) durante el proceso, referido a gramos de célula en el medio y al tiempo total del proceso en horas. Por su parte, la productividad volumétrica expresa el mismo volumen máximo de hidrógeno producido (mL) referido al volumen del medio en litros y al tiempo total del proceso en horas. Finalmente, el rendimiento molar expresa los moles de hidrógeno producidos por cada mol de acetato consumido.

En la tabla 4 se muestra la comparación de los resultados de dichos valores obtenidos en el presente trabajo con los reportados en la literatura. La productividad volumétrica del cultivo en lote fue de 0.81 mLH₂/L-h. Este valor es muy bajo comparado con los ya reportados, pero esto se debe a la baja concentración de biomasa que se tiene en el proceso. En los trabajos reportados por Ren et al, (2008) y Lo et al, (2011), se realizan los procesos de crecimiento y producción en una misma cinética. El cultivo crece en extracto de levadura y glutamato de sodio respectivamente, dejando que las fuentes de nitrógeno se consuman y comience la producción, lo que explica la alta concentración de biomasa en el cultivo. Sin embargo, al comparar las productividades específicas, la obtenida en el presente trabajo es de 3.93 mLH₂/g-h, valor que se acerca al obtenido por Lo et al, (2008). Cabe resaltar que se trabajó a una escala mayor que en los procesos reportados, entonces se introducen al proceso variables que pueden afectar significativamente las productividades a comparación de un proceso en pequeña escala. Estas variables son agitación, la capacidad de la fuente luminosa para alcanzar el centro del reactor, geometría del reactor, etcétera.

Por último, el rendimiento molar producto/sustrato obtenido es de 1.77 molH₂/mol acetato, recordando que el teórico máximo es de 4.0 molH₂/mol acetato. En los trabajos de Ren et al, (2008) y Lo et al, (2011), se reporta un rendimiento de 3.46 molH₂/mol acetato, mientras que en el trabajo de Oh et al, (2004) se reporta un máximo de 2.8 molH₂/mol acetato. Es necesario aclarar que en el presente trabajo, la intensidad de luz, a pesar de que se mantuvo constante, fue baja en comparación con la recomendada en la literatura. En

diversos trabajos se reporta un mínimo de 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$, y en el presente trabajo se alcanzó solamente una intensidad de 29.2 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ por fuera del tanque.

Tabla 4. Comparación de las productividades específicas y volumétricas en sistemas fotofermentativos reportados en la literatura.

Microorganismo	Productividad volumétrica (mLH ₂ /L-h)	Productividad específica (mLH ₂ /g-h)	Proceso	Biomasa media (g/L)	Fuente de carbono	Referencia
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> P4	3.9	9.8	Cultivo en lote. Botellas serológicas 50 mL	0.35	Acetato, 4.5 g/L	Oh et al, (2004).
<i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	18.64	26.62	Cultivo en lote. Botellas serológicas 80 mL	0.7	Acetato, 2 g/L	Ren et al, (2008).
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> WP3-5	19.8	3.05	Reactor en lote, 500 mL	6.48	Acetato, 4 g/L	Lo et al, (2011).
Consorcio microbiano	0.81	3.83	Reactor en lote 4 L	0.22	Acetato, 2.5 g/L	Este trabajo.

Es necesario considerar que mientras en los trabajos reportados en la literatura se usan cepas puras de bacterias, en el presente se trabaja con un consorcio microbiano. Como se presentó en la figura 4, la BPNS del consorcio usado es *Rhodopseudomonas*, presente en una proporción del 18%. Sin embargo, esta proporción no se mantiene constante a lo largo de la cinética, y ello también afecta evidentemente a la productividad. Por esto resulta necesario realizar el seguimiento de la evolución de las poblaciones, cuyos resultados se muestran en la siguiente sección.

7.5.1. Evolución de poblaciones

En las figuras 18, 19 y 20 se presentan las proporciones que tienen las poblaciones microbianas presentes en el consorcio en la fase lag (0 horas), fase exponencial (238 horas) y fase estacionaria (430 horas) del cultivo en lote operado en reactor en fase de producción.

En el consorcio están presentes, provenientes de la fase de crecimiento, los géneros *Rhodopseudomonas*, *Bacteroides*, *Desulfovibrio* y *Clostridium*. *Rhodopseudomonas* es la PNSB del consorcio, y por tanto la responsable de la producción del hidrógeno producido. Este microorganismo constituye el 18% de la población microbiana. Por su parte, *Bacteroides* está presente en una proporción del 67%, ya que en fase de crecimiento tiene todos los nutrientes necesarios para desarrollarse, en especial amonio y fuentes orgánicas de nitrógeno, en las cuales se puede desarrollar de buena manera (Smith et al, 2006). *Desulfovibrio* está presente en un porcentaje de predominancia del 9%, está bacteria se encarga de reducir sulfatos y en ocasiones puede usar hidrógeno molecular como agente reductor (Alur, 1999), lo cual no es deseable en el proceso. En otros se encuentran géneros de bacterias de los cuales su presencia en el consorcio es muy pequeña, y por tanto no pueden ser identificados.

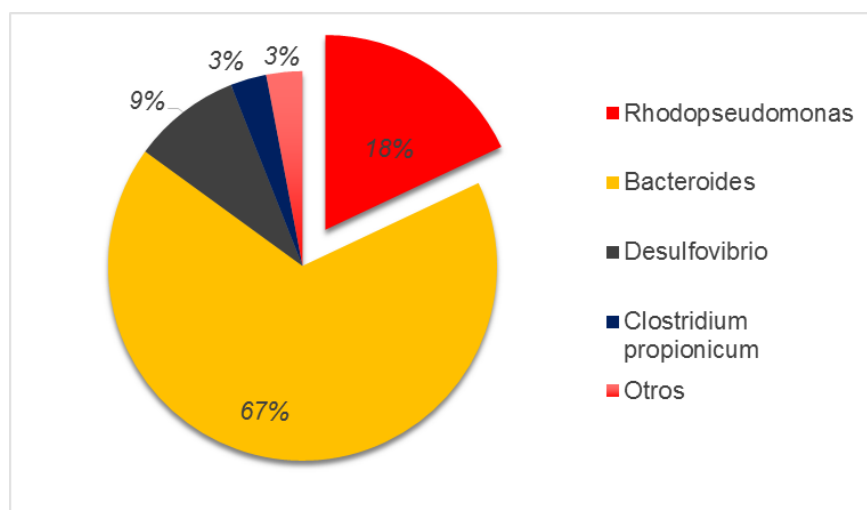


Figura 18. Poblaciones presentes en el tiempo 0 horas del cultivo por lote en reactor. Fase de producción.

Al entrar a fase exponencial, se puede apreciar que las proporciones microbianas cambian ligeramente comparadas a las determinadas en la fase inicial. El mayor cambio se evidenció en el porcentaje de *Rhodopseudomonas*, el cual se incrementó hasta constituir el 28% de la población microbiana, mientras que *Desulfovibrio* se mantuvo similar, ya que su

predominancia sólo se incrementó 1%. La proporción de *Bacteroides* decreció de 67% a 61%.

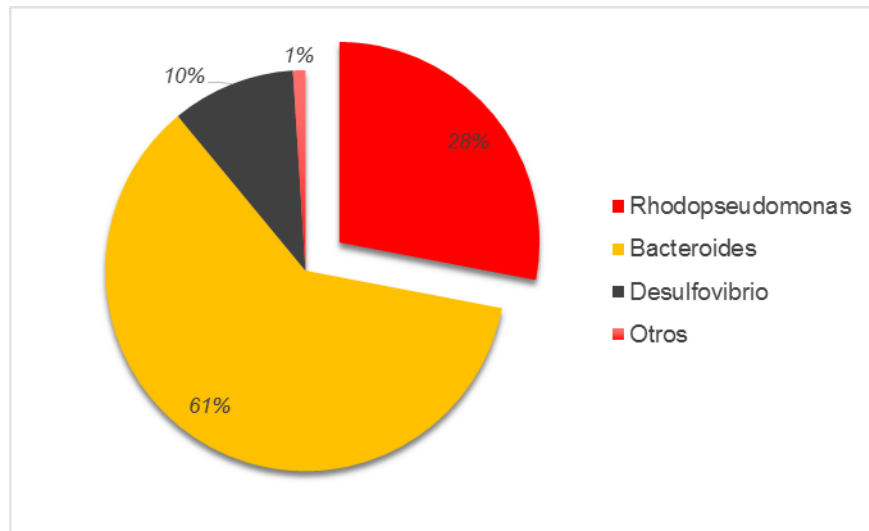


Figura 19. Poblaciones presentes en el tiempo 238 horas del cultivo por lote en reactor.
Fase de producción.

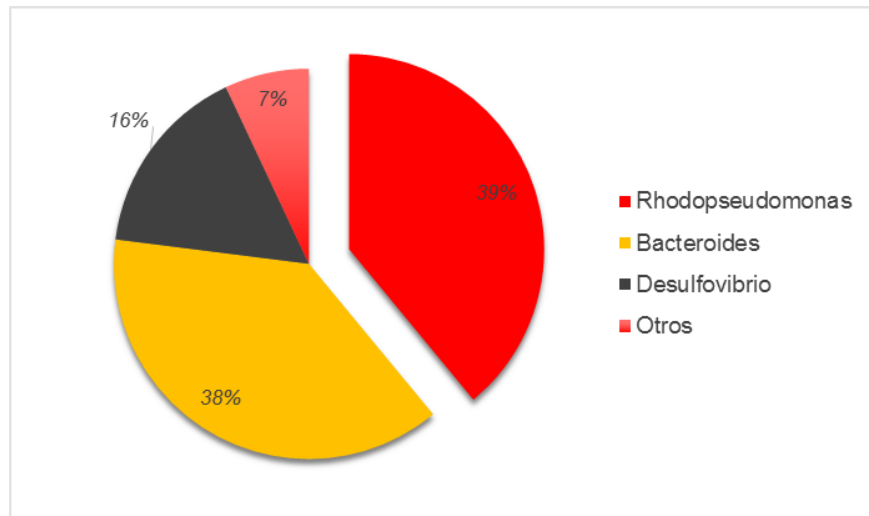


Figura 20. Poblaciones presentes en el tiempo 430 horas del cultivo por lote en reactor.
Fase de producción.

Durante la fase estacionaria (430 h de cultivo) se observó un nuevo incremento en la predominancia de *Rhodopseudomonas*, alcanzando un porcentaje de 38%. Mientras que la proporción de *Bacteroides* se redujo a la mitad de la inicial, quedando en 38%. *Desulfovibrio* aumentó su proporción hasta 16%.

El cambio de poblaciones se refleja en mayor medida en la fase estacionaria, ya que en este punto el consorcio se ha adaptado a las condiciones del proceso y las bacterias capaces de desarrollarse bajo esta presión selectiva incrementan su porcentaje y su actividad metabólica. *Rhodopseudomonas* puede desarrollarse en ausencia de una fuente de nitrógeno gracias a la enzima nitrogenasa que puede expresar al encontrarse en esa situación. Fija nitrógeno y lo transforma a amonio, el cuál puede fácilmente utilizar (Adessi, 2013). Está reportado que algunas especies de *Desulfovibrio* también pueden fijar nitrógeno del ambiente. Además, pueden usar los sulfatos como aceptores de electrones (Alur, 1999), por lo que puede seguir manteniéndose durante la fotofermentación. Sin embargo *Bacteroides* solo puede sintetizar fuentes de nitrógeno orgánico a partir de amonio o de otras fuentes de nitrógeno orgánico, como péptidos (Smith et al, 2006), por lo que al estar en ausencia de nitrógeno se ve imposibilitado para seguir desarrollándose

Aunado a lo anterior, *Rhodopseudomonas* tiene una fuente adicional de energía que puede aprovechar, la luz. A diferencia de los otros dos géneros presentes, *Rhodopseudomonas* sintetiza un aparato fotosintético para captar los fotones de luz y crear una cadena transportadora de electrones y un gradiente de protones para generación de ATP (Golomysova et al, 2010), con ello puede obtener energía y tiene una ventaja sobre las demás bacterias en el consorcio.

La presencia en alta proporción de *Rhodopseudomonas* es deseable para el proceso ya que, como ya se mencionó, es la encargada de producir todo el hidrógeno, por lo cual evidentemente entre mayor sea su proporción en el consorcio mayor será la producción.

Con estos resultados se puede pensar que si la cinética de producción se mantiene por tiempos más largos, la proporción de *Rhodopseudomonas* en el cultivo seguirá incrementando, pudiendo obtenerse valores de productividad y rendimiento más altos. Esto se puede demostrar analizando los resultados obtenidos en el cultivo en lote secuencial.

7.6. Cultivo en lote secuencial

En la figura 21 se muestra la cinética de crecimiento en g/L, consumo de acetato en g/L y producción de hidrógeno en mL del cultivo en lote secuencial en fase de producción.

Dado que el primer ciclo de este régimen es un cultivo lote, se partió de este mismo para seguir los demás ciclos, es por ello que los valores en las primeras 503 horas son los mismos que para los resultados presentados para el cultivo en lote.

La concentración inicial de acetato fue de 2.5 g/L. El acetato, se consumió partir de las 24h de cultivo, el consumo de este sustrato se llevó a cabo de manera continua hasta alcanzar un consumo máximo de 78% a las 503 h de cultivo durante el primer ciclo, llegando a una concentración de 0.55 g/L. Posteriormente, el acetato se volvió a incrementar ya que se alimentó medio fresco con una concentración de acetato de 2.5 g/L para recuperar el volumen perdido en la etapa de decantación (3 L), reestableciendo parte del sustrato consumido en cada ciclo. Así, para el segundo ciclo la concentración de acetato inicial fue de 1.95 g/L, y éste se consumió en menor proporción que en el ciclo anterior hasta alcanzar un consumo total de 43% a las 767 horas llegando a un valor de 1.05 g/L. Durante el tercer ciclo el acetato se vuelve a reestablecer a una concentración de 2.01 g/L y se consumió nuevamente de manera continua hasta las 1247 horas alcanzando solamente un 17% de consumo y una concentración final de 1.62 g/L.

La operación del reactor se inició con una concentración de biomasa de 0.1 g/L. Posteriormente, la biomasa se incrementó hasta alcanzar una concentración de 0.25 g/L debido al consumo de sustrato y la presencia de una cierta cantidad de nitrógeno orgánico residual. Para el segundo ciclo, dado a que el consorcio provenía de una etapa previa, se observó un decremento en la concentración de biomasa debido al efecto de dilución que se tiene por el proceso, resultando en una concentración inicial de 0.06 g/L. Adicionalmente, el coeficiente de sedimentación del consorcio es muy bajo, por lo que no se puede retener la mayoría de la biomasa, lo que ocasiona el 76% de pérdida de la misma. En este segundo ciclo la biomasa no aumenta debido a que toda traza de nitrógeno orgánico que provenía de la fase de crecimiento fue consumida en el primer ciclo. En el tercer ciclo de nueva cuenta la biomasa cae en un 65% respecto a la concentración del ciclo anterior, resultando en 0.025 g/L de concentración inicial. Del mismo modo, no hay crecimiento significativo.

En la gráfica se presenta tanto el hidrógeno producido en cada ciclo como el hidrógeno acumulado total en el proceso completo. El hidrógeno total acumulado se produce de manera continua a lo largo de casi todo el proceso a partir de que comienza su producción a las 96 horas. Solamente se tienen 2 fases estacionarias en la cinética, las cuales corresponden al inicio del segundo y tercer ciclo. El hidrógeno total acumulado alcanza un valor de 2781 mL.

En cuanto al hidrógeno analizado en cada ciclo, se obtuvo que para el primero la producción máxima acumulada fue de 1494 mL. Posteriormente, en el segundo ciclo se tiene una fase lag menor a la del primero, comenzando la producción de hidrógeno 72 horas después de iniciado dicho ciclo, alcanzando un volumen acumulado de 1008 mL de hidrógeno. Para el tercer ciclo la fase lag aumentó a 144 horas y se redujo la producción del gas a menos de la mitad respecto al ciclo anterior, siendo el máximo volumen acumulado de 337 mL.

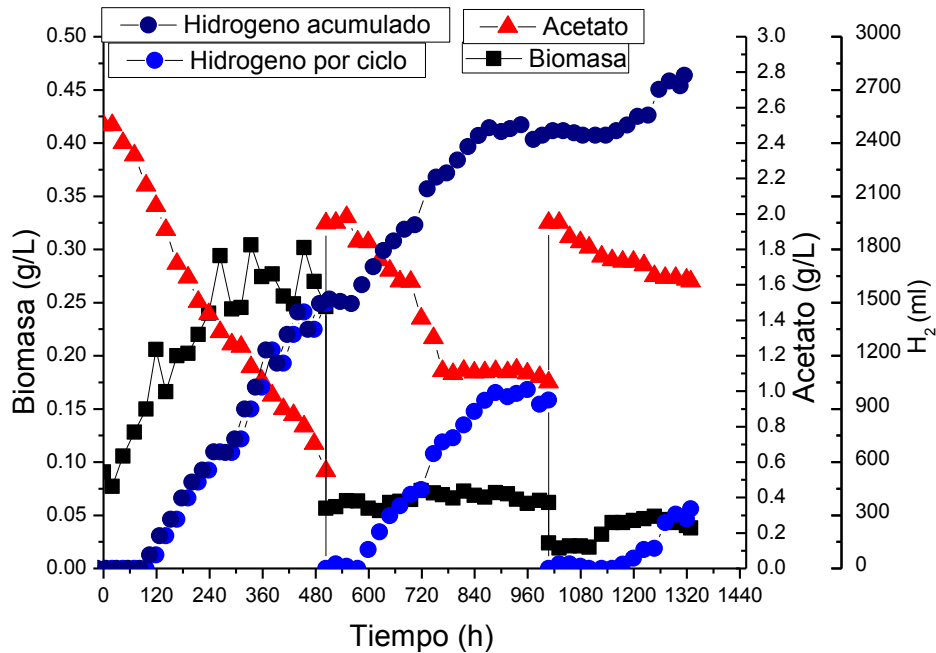


Figura 21. Cinética de crecimiento (g/L) consumo de sustrato (g/L) y producción de hidrógeno (mL) en cultivo en lote secuencial en fase de producción.

El consumo de acetato cada vez menor en cada ciclo se debe en parte a la disminución en la concentración de biomasa, pero también influye la ausencia de nitrógeno que se consigue, según lo reportado por Oh et al (2004). En su estudio los autores reportan el consumo de acetato con diferentes fuentes de nitrógeno y en ausencia total de éste. Cuando no hay presencia alguna de fuente de nitrógeno el consumo de sustrato es sólo de 27%, a diferencia del 60% que se obtiene cuando se tiene en el medio una concentración de extracto de levadura de 3 g/L.

El casi nulo crecimiento de biomasa obtenido en el segundo y tercer ciclo también coincide con lo reportado por Oh et al (2004), donde ponen de manifiesto que en ausencia total de nitrógeno la bacteria fotofermentativa no tiene crecimiento alguno.

De igual manera que en el cultivo en lote, para poder comparar los resultados con la bibliografía es necesario calcular la productividad específica y volumétrica. En este caso, se calcularon estas dos productividades para cada ciclo, por lo que el tiempo referido es el correspondiente al tiempo que duró el cultivo en producción en cada uno de éstos.

En la tabla 5 se muestran los valores de dichas productividades, las cuales fueron de 0.81, 0.53 y 0.27 mLH₂/L-h para la volumétrica en el primer, segundo y tercer ciclo respectivamente. Estos resultados son esperados debido a lo que se observó en la figura 21, dónde es evidente que la producción total de hidrógeno decae en cada nuevo ciclo. Las productividades específicas, sin embargo, tienen una tendencia contraria, obteniendo resultados de 3.83, 8.12 y 7.53 mLH₂/g-h para el primer, segundo y tercer ciclo respectivamente, también reportadas en el tabla 5.

Tabla 5. Valores cinéticos obtenidos del cultivo en lote secuencial en fase de producción.

Ciclo	mL H ₂	mLH ₂ /L-h	mLH ₂ /g _{cél} -h	molH ₂ /mol _{acetato}	Biomasa (g/L)	μ (h ⁻¹)
1	1494.4	0.81	3.83	1.77	0.1	0.004 ± 0.0005
2	1008.5	0.53	8.12	2.77	0.057	0.0008 ± 0.0001
3	336.9	0.27	7.53	2.14	0.024	0.0006 ± 0.0002

Las productividades volumétricas se ven afectadas debido a que la concentración de biomasa cae abruptamente entre cada ciclo. Como se mencionó, el consorcio no puede sedimentar de manera rápida y entonces la mayor parte de la biomasa en el caldo de cultivo se desecha junto con el sobrenadante y al añadir medio fresco estéril, el efecto de dilución causa la caída en la concentración de biomasa. Esto se puede ver en su valor inicial reportado en la tabla 5. Entre el primer y segundo ciclo pasa a ser de 0.1 g/L a 0.057 g/L, la mitad. Para el tercer ciclo cae hasta 0.024 g/L.

Este tipo de régimen de cultivo se ha utilizado en fermentación oscura dado a que los consorcios usados pueden sedimentar fácilmente, caso contrario que las bacterias

fotofermentativas. Xie et al (2012) realizaron un estudio usando el lote secuencial en una fotofermentación, pero para poder retener la biomasa se inmovilizó en fibras de carbón activado, logrando obtener mejores rendimientos producto/sustrato en cada nuevo ciclo, lo que concuerda con los resultados del presente trabajo.

Por otro lado, la productividad específica aumenta entre cada ciclo. Esto se debe a varios factores. El primero radica en el hecho que en el primer ciclo el metabolismo del microorganismo está dirigido no solo a producción de hidrógeno, sino también a producción de biomasa. Esto se puede ver en el valor de velocidad específica de crecimiento (μ), el cuál es de 0.004 h^{-1} , que si bien es bajo, es 5 veces mayor que el obtenido en el segundo ciclo, que resultó ser de 0.0008 h^{-1} , y casi 7 veces mayor a la del tercer ciclo, 0.0006 h^{-1} . Durante el metabolismo fotoheterotrófico de las BPNS, la cadena de transporte de electrones formada junto con el gradiente de protones tiene 3 funciones. La primera es generar ATP por la enzima ATP sintetasa, la segunda es reducir el NAD^+ a NADH por medio de la enzima NADH deshidrogenasa y la tercera para reducir la ferredoxina por medio del complejo Rnf. El NADH después se utilizará para la producción de biomasa y la síntesis de H_2 (Golomysova et al, 2010). En cada ciclo del lote secuencial se tiene cada vez mayor limitación de nitrógeno, por lo que el microorganismo fotofermentativo se ve obligado a dirigir el metabolismo hacia la producción de amonio y, en consecuencia, hacia la producción de hidrógeno, lo cual explica el aumento de productividad específica.

El segundo factor que afecta la productividad específica es el porcentaje de población de la BPNS que se tiene en cada nuevo ciclo. En la figura 22 se muestra la distribución de poblaciones a las 903 horas del proceso en lote secuencial. Este tiempo es justo al final del segundo ciclo. Se puede ver que la predominancia de *Rhodospseudomonas* se incrementó nuevamente hasta alcanzar a constituir el 83% de la población microbiana en el reactor. La presencia de *Desulfovibrio* fue del 5%, mientras que *Bacteroides* no se encontró en esta etapa de cultivo, o bien no fue detectable. Esto indica que la mayor parte del consorcio microbiano se compone por una BPNS, lo que también favorece/permite que la productividad específica sea casi 3 veces mayor que en el primer ciclo.

Un tercer factor que afecta la productividad específica es la luz. Si bien, la intensidad se mantuvo constante en $29.2 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$, la densidad óptica del caldo de cultivo disminuyó por el mismo efecto de dilución que causó la disminución de la biomasa. Al tener una densidad óptica menor, la luz puede alcanzar las zonas centrales del reactor con mayor facilidad. Se sabe que las mismas bacterias al estar presentes en gran cantidad en el medio producen

un efecto *sombra*, el cual causa una disminución en la productividad de hidrógeno ya que no todas las células pueden recibir en la misma cantidad los fotones de luz (Hallenbeck, 2013). Estudios revelan que la intensidad de luz es un factor que afecta la productividad específica. Entre mayor sea la intensidad de luz, mayor será la productividad específica (Argun y Kargi, 2010). En el caso del presente trabajo no se trabajó a diferentes intensidades de luz, pero es evidente que entre menor sea la densidad óptica del medio, la intensidad de luz se acerca más a la homogeneidad en todo el reactor, causando el aumento de la productividad específica.

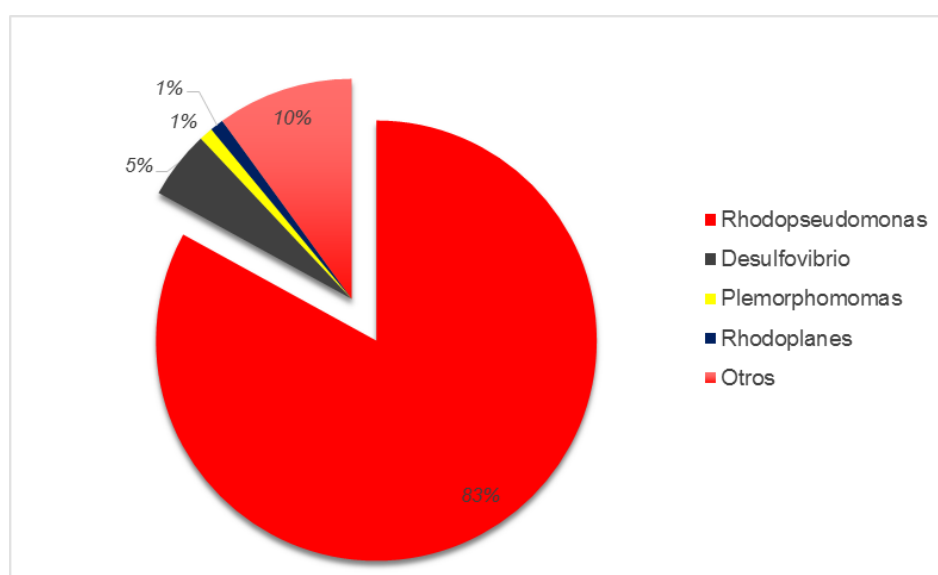


Figura 22. Poblaciones presentes en el tiempo 903 horas del cultivo por lote secuencial en reactor. Fase de producción.

Por último, el rendimiento molH₂/mol acetato (tabla 5) en el primer, segundo y tercer ciclo tuvo un valor de 1.77, 2.77 y 2.14 respectivamente. Esto indica que no solo la productividad específica aumenta en cada ciclo, sino también el rendimiento producto/sustrato, lo cual nos indica que el lote secuencial es mejor en términos de rendimiento y productividad para producir hidrógeno que el cultivo en lote.

También se obtuvieron los valores de producción volumétrica (mL) de hidrógeno y productividad volumétrica y específica en un cultivo en lote alimentado para compararlos con los dos ya analizados. Los resultados se presentan en la siguiente sección.

7.7. Cultivo en lote alimentado.

En la figura 23 se muestra la cinética de crecimiento y producción de hidrógeno en el cultivo en lote alimentado en reactor en fase de producción.

Los primeros 10 días de la cinética transcurren en una modalidad de cultivo en lote. La concentración inicial de biomasa es de 0.15 g/L. Se tiene un pequeño aumento de biomasa en las primeras 24 horas y posteriormente permanece constante por 237 horas, resultando en un valor de 0.175 g/L. En este tiempo se realiza la primera alimentación y la concentración baja debido al efecto de dilución. En esta primera alimentación la biomasa aumenta de 0.14 g/L a 0.22 g/L en un tiempo de 72 horas. A este tiempo se alimenta de nuevo el reactor y así sucesivamente. Se puede apreciar que para las siguientes alimentaciones ya no se tuvo crecimiento de biomasa y la concentración final en el proceso fue de 0.164 g/L.

También en la figura 23 se presenta tanto la evolución en la producción de hidrógeno acumulado total como la producción del gas en cada etapa de alimentación. Durante la modalidad en cultivo por lote la producción inició a las 96 horas de cultivo y se alcanzó un volumen acumulado de 587 mL a lo largo de 237 horas. Llegado a este tiempo se realizó la primera alimentación y se observó que la producción comenzó a las 24 horas siguientes y el volumen acumulado total fue de 196 mL. Para la segunda, tercera y cuarta etapa de alimentación el volumen acumulado total fue de 103.5 mL, 69.61 mL y 47.93 mL respectivamente, y del mismo modo que en la primera etapa la producción comienza a las 24 horas posteriores.

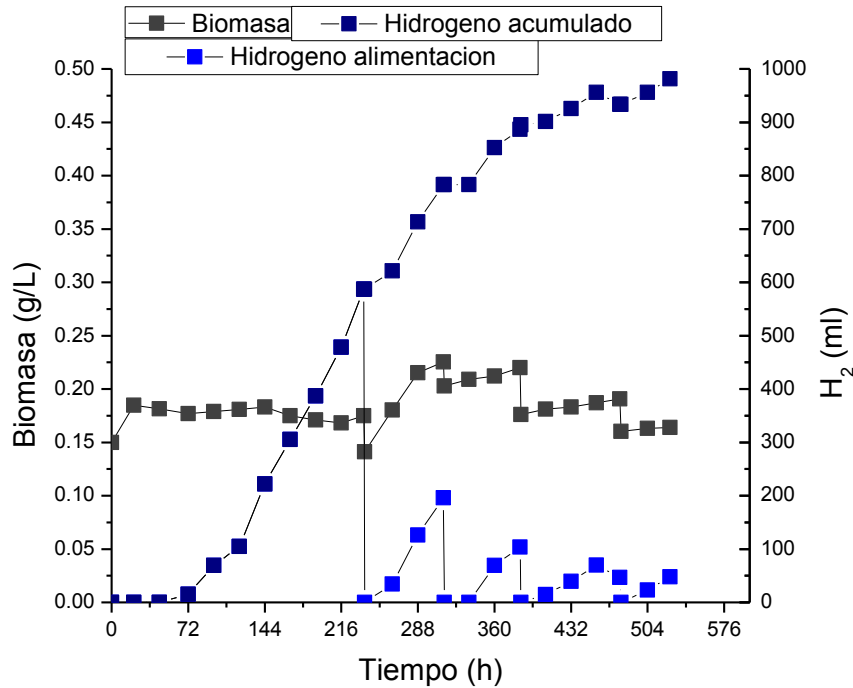


Figura 23. . Cinética de crecimiento (g/L) y producción de hidrógeno (mL) en cultivo en lote alimentado en fase de producción.

Se calcularon las productividades específicas puntuales, esto es, el volumen de hidrógeno producido (mL) en 24 horas, referido a ese tiempo y a los gramos de biomasa en el medio en ese momento. Los resultados se reportan en el tabla 6. Se observa que la productividad específica en cada fase de alimentación cae desde 21.7 mLH₂/g-h hasta 2.33 mLH₂/g-h entre la modalidad lote y la última etapa de alimentación. Este efecto es el mismo que obtuvieron Ren et al (2009), en el cual operan en botellas serológicas un cultivo en lote alimentado de *Rhodopseudomonas palustris*. En dicho estudio se mide la productividad volumétrica máxima, la cual cae en cada etapa de alimentación, pero se alcanza en un tiempo menor. Lo mismo ocurre en el presente trabajo. Para alcanzar el valor de 21.7 mLH₂/g-h en la fase en lote, el cultivo necesitó estar en producción por 216 horas. Al alimentar la primera vez, la productividad máxima se alcanzó en 27 horas. En la segunda, tercera y cuarta alimentación se logró en 24, 48 y 26 horas respectivamente. Esto también se aprecia en el hecho de que para la fase en lote el consorcio inicia la producción del gas a las 96 horas, mientras que para todas las fases de alimentación la producción comenzó después de 24 horas.

Ren et al (2009) reportan que este efecto se debe a que en las primeras horas el metabolismo de la bacteria está dirigido a producción de biomasa, mientras que en las alimentaciones está dirigido a la producción de hidrógeno. También explican que la caída en las productividades se debe a que el sustrato se agota cada vez con mayor rapidez, lo que causa que el microorganismo entre en una fase de declive, por lo que la actividad de las enzimas también decae, lo que incluye la nitrogenasa. Esto se sustenta con los estudios de Golomysova et al (2010), dónde se menciona que en la fase de producción de hidrógeno los electrones que dona la fuente de carbono (en este caso el acetato) se dirigen en su mayoría hacia la ruta de síntesis de amonio e hidrógeno.

La productividad volumétrica, reportada en la tabla 6, también se ve afectada por el mismo efecto, pero resulta más conveniente utilizar para explicarlo la productividad específica, ya que en la volumétrica también está presente el efecto de dilución, causando que el volumen no sea constante en cada fase de alimentación.

Tabla 6. Valores cinéticos obtenidos del cultivo en lote alimentado en fase de producción.

Fase alimentación	mLH ₂ /L-h (Pvol Máxima)	mLH ₂ /g _{cel} -h (Pesp Máxima)
Lote	3.73	21.7
1	2.10	9.77
2	1.28	6.05
3	0.47	2.52
4	0.60	2.33

En la Tabla 7 se presentan los valores reportados en otros trabajos para la productividad específica y volumétrica en una fotofermentación operada bajo el régimen de lote alimentado. Para realizar esta comparación las productividades calculadas son globales, es decir, referidas al tiempo total del proceso.

La productividad volumétrica obtenida en el presente trabajo es muy baja comparada con las ya reportadas, pero ello se debe a la baja acumulación de biomasa que se tiene. En los estudios realizados por Carlozzi et al (2010) y Carlozzi y Lambardi (2009), se realiza un crecimiento en medio con glutamato de sodio como fuente de carbono antes de entrar a fase fotofermentativa. Por ello, la biomasa inicial con la que se inicia es mucho mayor, efecto

ya comprobado en la sección 7.3 del presente trabajo. Pero la mayor limitante se encuentra en la intensidad de luz irradiada al reactor. Mientras que en el presente trabajo es de 29.2 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$, en el trabajo de Carlozzi et al (2010) fue de 1500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$ y en el trabajo de Carlozzi y Lambardi (2009) fue de 230 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{-s}$. Es claro que si se provee al proceso de una cantidad de luz mayor, las productividades incrementarán.

Tabla 7. Comparación de las productividades específicas y volumétricas en sistemas fotofermentativos en lote alimentado reportados en la literatura.

Microorganismo	Productividad volumétrica (mLH ₂ /L-h)	Productividad específica (mLH ₂ /g-h)	Proceso	Biomasa media (g/L)	Fuente de carbono	Referencia
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> 42OL	12.03	No reportado	Cultivo en lote alimentado. Reactor cilíndrico de 1.07 L	2.0	No reportada	Carlozzi et al, (2010).
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> 42OL	7.26	11.7	Cultivo en lote alimentado. Reactor cilíndrico de 1.07 L	0.7	Acetato, 3 g/L	Carlozzi y Lambradi, (2009).
Consorcio microbiano	1.2	5.03	Reactor en Lote Alimentado 4L	0.18	Acetato, 2.5 g/L	Este trabajo.

El efecto mencionado de la concentración de biomasa se observa de mejor manera al comparar las productividades específicas, en dónde la obtenida en este trabajo fue de 5.03 mLH₂/g-h mientras que la obtenida por Carlozzi y Lambardi (2009) es de 11.7 mLH₂/g-h. El hecho de que la productividad volumétrica del presente trabajo sea 5 veces menor que la reportada en dicho estudio, pero la productividad específica sea solo 2 veces menor, se

debe a la cantidad de biomasa presente. Mientras en el estudio de Carozzi y Lambardi es de 0.7 g/L, en el presente trabajo es de 0.18 g/L. Oh et al (2004) y Adessi (2011) reportan que entre mayor sea la cantidad de biomasa en el medio, menor será la productividad específica debido a la inhibición que se da por el efecto sombra, es decir, las mismas células evitan que la luz alcance a las que se encuentran en el centro del recipiente.

7.8. Comparación entre los regímenes.

Como se puede apreciar en la tabla 8, tanto el lote alimentado y secuencial tienen una mayor productividad específica comparadas con la que se obtiene en el cultivo en lote, lo que demuestra que es mejor trabajar la fotofermentación en este tipo de regímenes. La productividad volumétrica más baja se obtuvo en el lote secuencial, pero las causas ya se explicaron en la sección correspondiente, y la productividad volumétrica del cultivo en lote alimentado es la más alta.

Al alimentar a una fotofermentación efluentes provenientes de una fermentación oscura, se puede usar el régimen en lote alimentado para mitigar el efecto causado por la presencia de sustancias inhibitorias del crecimiento (butirato, propionato) y de la producción de hidrógeno (amonio) tal como lo explican Argun y Kargi (2011). Por los resultados obtenidos y explicados en la sección anterior, sabemos que se puede tener esta importante ventaja cuando se realice el acoplamiento de fermentación oscura y fotofermentación y además incrementar la productividad comparada con un cultivo simple en lote, obteniendo los dos beneficios.

Tabla 8. Productividad volumétrica y específica global de los cultivos en lote, lote alimentado y lote secuencial.

Cultivo	mLH ₂ /L-h	mLH ₂ /g _{cel} -h
Lote	0.83	3.83
Lote Alimentado	1.2	5.03
Lote Secuencial	0.55	5.39

El régimen que muestra mayor potencial es el cultivo en lote secuencial, ya que con cada nuevo ciclo la productividad específica aumenta de manera considerable. Si se logra encontrar una forma de retener la mayor cantidad de biomasa posible, la productividad volumétrica, y en sí la producción total de volumen de hidrógeno, se puede incrementar en igual medida. Además, mientras más tiempo se mantenga el consorcio fotofermentativo en el medio de producción, se espera un mejor comportamiento en cuanto a la producción de H₂, pudiendo lograr que los efectos inhibitorios de las sustancias de una fermentación oscura tengan con cada ciclo un impacto menor.

Existen varias posibilidades para lograr mantener la concentración de biomasa en todo el proceso del lote secuencial. Pueden usarse métodos de separación más eficientes que la sedimentación, como lo son la centrifugación o la filtración por membranas (Chen et al, 2009). Pero estos métodos además de ser caros dificultan el poder mantener el proceso en condiciones de esterilidad. Otro método que puede utilizarse es el de la inmovilización de células, método que ya se ha demostrado puede incrementar las productividades (Xie et al, 2012).

8. Conclusiones

Las concentraciones óptimas de los parámetros evaluados, para maximizar la concentración de biomasa del consorcio microbiano y minimizar el aumento de pH en la fase de crecimiento, resultaron ser 1 g/L de extracto de levadura y 7.48 mM y 2.92 mM de fosfato de sodio monobásico y dibásico respectivamente.

El modelo obtenido por el MSR usado se aproxima de buena forma a las condiciones reales dentro de las primeras 96 horas de cinética de crecimiento, ya que no se encontró diferencia significativa entre los resultados experimentales y los predichos por dicho modelo.

El glutamato de sodio favorece en gran medida el crecimiento del consorcio microbiano, pero retarda el tiempo de producción 210 horas, lo cual no resulta viable para el proceso en términos de productividad. Por ello no fue viable realizar la optimización del medio de producción y se trabajó en ausencia total de nitrógeno.

La distribución de poblaciones del consorcio es variable a lo largo del tiempo debido a la presión selectiva que se tiene el reactor. Esto es, ausencia de oxígeno, presencia de energía luminosa y limitación total de nitrógeno. Ello favorece el desarrollo de *Rhodopseudomonas* y limita el de *Bacteroides*, causando que en tiempos avanzados del proceso la presencia de la BPNS sea mayor, dando como resultado el aumento de la productividad específica.

El proceso de sedimentación usado para operar el proceso en lote secuencial resulta ineficiente para la retención de biomasa, lo cual causa que la productividad volumétrica caiga de manera importante desde 0.81 hasta 0.27 mLH₂/L-h entre el primer y el tercer ciclo de producción, obteniendo un valor global (tiempo total del proceso) de 0.55 mLH₂/L-h. Sin embargo, la productividad específica incrementa en cada nuevo ciclo, lo que resulta en un valor global de 5.39 mLH₂/g-h, que es 41% más a la obtenida para el cultivo en lote. Ello indica que el proceso operado en este tipo de régimen puede incrementar la producción de hidrógeno, pero hace falta encontrar una forma de retener la mayor cantidad de biomasa posible para no ver disminuida la productividad volumétrica.

El proceso operado en lote alimentado incrementa tanto la productividad volumétrica como la productividad específica comparada con el proceso en lote. La primera resultó ser de 1.20 mLH₂/L-h, lo cual es 48% mayor a la obtenida para el proceso en lote. Por su parte, la productividad específica fue de 5.03 mLH₂/g-h que es 31% mayor a la del proceso en lote. Ello indica que este tipo de régimen se puede usar para el acoplamiento de una

fotofermentación con una fermentación oscura obteniendo como ventaja, además del efecto de dilución de las sustancias inhibitorias, el aumento de las productividades.

Comparados entre sí, el proceso en lote alimentado tiene una productividad volumétrica 118% mayor que el proceso en lote secuencial, pero una productividad específica 7% menor.

Si se logra encontrar una forma de retener la biomasa en el proceso en lote secuencial, éste puede resultar mejor que un cultivo en lote y lote alimentado, ya que usando un solo inóculo se puede alimentar al proceso un volumen hasta 3 veces mayor, favoreciendo que el consorcio se adapte a las condiciones del medio por el largo tiempo que permanece en él, pudiendo obtener productividades cada vez más altas.

9. Bibliografía

1. Adessi, Alessandra. (2013). *Hydrogen production using purple non-sulfur bacteria (PNSB) cultivated under natural or artificial light condition with synthetic or fermentation derived substrates* (tesis doctoral). Universidad de Florencia. Italia. PP. 21,22.
2. Alur, M. (1999). *Desulfovibrio*. En: Encyclopedia of Food Microbiology. Batt, C. & Patel, P. Editores. Ed. Elsevier.
3. Amrouche, D., Abdi, M., Lounici, H. & Mameri, N. (2013). *Biohydrogen production by dark and photo-fermentation processes*. Renewable and Sustainable Energy Conference. 499-503.
4. Argun, H. & Kargi, F. (2010). *Effects of light source, intensity and lighting regime on bio-hydrogen production from ground wheat starch by combined dark and photo-fermentation*. International Journal of Hydrogen Energy. 35:1604-16012.
5. Argun, H. & Kargi, F. (2011). *Biohydrogen production by different operational modes of dark and photofermentation: An overview*. International Journal of Hydrogen Energy. 36:74413-7459.
6. Argun, H., Kargi, F. & Kapdan, I. K. (2008). *Light fermentation of dark fermentation effluent for biohydrogen production by different Rhodobacter species at different initial volatile fatty acid concentrations*. International Journal of Hydrogen Energy. 33:7405-7412.
7. Azwar, M.Y., Hussain, M.A. & Abdul-Wahab, A.K. (2014). *Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review*. Renewable & Sustainable Energy Reviews. 31:158-173.
8. Balat, Mustafa. (2008). *Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems*. International Journal of Hydrogen Energy. 33:4013-4029.
9. Botas, J.A., Calles, J.A., Dufour, J. & San Miguel, G. (2005). *La economía del hidrógeno — una visión global sobre la revolución energética del siglo XXI*. Grupo de Ingeniería Química Ambiental. Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología.
10. Cai, J. Wang, G. & Pan, G. (2012). *Hydrogen production from butyrate by a marine mixed photrophic bacteria consort*. International Journal of Hydrogen Energy. 37:4057-4067.

11. Cardeña, R., Moreno, G., Valdez-Vazquez, I. y Buitrón, G. (2015). *Optimization of volatile fatty acids concentration for photofermentative hydrogen production by a consortium*. International Journal of Hydrogen Energy. 30:1-12.
12. Carlozzi, P. & Lambardi, M. (2009). *Fed batch operation for bio H₂ production by Rhodospseudomonas palustris (strain 42OL)*. Renewable Energy. 34:2577-2584.
13. Carlozzi, P.; Pintucci, C.; Piccardi, R.; Biccioni, A.; Minieri, S. & Lambardi, M. (2010). *Green energy from Rhodospseudomonas palustris grown at low to high irradiance values, under fed-batch operational conditions*. Biotechnology Letters. 32:477-481.
14. Chen, C-Y., Yang, M-H., Yeh, K-L., Liu, C-H., Chang, J-S. (2008). *Byohydrogen production using sequential two stage dark and photo fermentation processes*. International Journal of Hydrogen Energy. 33:4755-4762.
15. Chen, W-H.; Sung, S.; & Chen, S-Y. (2009). *Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects*. International journal of Hydrogen Energy. 34:227-234.
16. Cheng, J.; Su, H.; Zhou, J.; Song, W. & Cen, K. (2011). *Hydrogen production by mixed bacteria through dark and photofermentation*. International Journal of Hydrogen Energy. 36:450-457.
17. Chodak, Ivan. (2008). *Polyhydroxyalkanoates: origin, properties and applications*. En: Monomers, polymers and composites from renewable resources. Belgacem, M. & Gandini, A. Editores. Ed. Elsevier.
18. Davey, K. R. (1989). *A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase*. Journal of Applied Bacteriology. 67:483-488.
19. Doran, Pauline. (1998). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. Editorial Acriba. Zaragoza. PP. 370-390.
20. Ghosh, D., Sobro, I. & Hallenbeck, P. (2012) *Optimization of the hydrogen yield from single-stage photofermentation of glucose by Rhodospseudomonas capsulatus JP91 using response surface methodology*. Bioresource Technology. 123:199-206.
21. Golomysova, A.; Gomelesky, M. & Ivanov, P. (2010). *Flux balance analysis of photoheterotrophic growth of purple nonsulfur bacteria relevant to biohydrogen production*. International Journal of Hydrogen Energy. 35:12751-12760.
22. Gómez Romero, Jacob. (2015). *Producción de biohidrógeno por co-digestión de lactosuero y residuos sólidos orgánicos en sistemas en lote y continuo (tesis doctoral)*. Instituto Politécnico Nacional. México. PP. 7-12.

23. Guevara López Eliane. (2004). *Diseño, construcción y caracterización hidrodinámica de un biorreactor multifuncional* (tesis de grado). Universidad Tecnológica de la Mixteca.
24. Hallenbeck, P. (2013). *Phofermentatica biohydrogen production*. En: Biohydrogen. Pandey; Chang; Hallenbeck & Larroche. Editores. Ed. Elsevier.
25. Hernández Peñaranda, Alicia. (2013). *Microbiología industrial*. Editorial EUNED. España. PP. 40-45,50-70.
26. Kessler, B. & Witholt, B. (2001). *Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism*. Journal of Biotechnology. 86:97-104.
27. Kim, M-S., Baek, J-S. y Lee, J-K. (2006) *Comparision of H₂ accumulation by Rhodobacter sphaeroides KD131 and its uptake hydrogenase and PHB synthase deficent mutant*. International Journal of Hydrogen Energy. 31:121-127.
28. Koku, H., Eroglu, I., Gündüz, U., Yücel, Y. & Türker, L. (2002). *Aspects of metabolism of hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides*. International Journal of Hydrogen Energy. 27:1315-1329.
29. Larimer, F., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M., Pelletier, D., Beatty, T., Lang, A., Tabita, F., Gibson, J., Hanson, T., Bobst, C., Torres y Torres, J., Peres, C., Harrison, F., Gibson, J. & Harwood, C. (2004). *Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas palustris*. Nature Biotechnology. 22:55-61.
30. Lin, C-Y. & Jo, C-H. (2003). *Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing Batch reactor process*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 78:678-.684.
31. Liu, B-F., Xie, G-J., Guo, W-Q., Ding, J. & Ren, N-Q. (2011). *Optimization of photohydrogen production by immobilized Rodhopsseudomonas faecalis RLD-53*. Natural Resources. 2:1-7.
32. Lo, Y-C, Chen, C-Y, Lee, C-M & Chang, J-S. (2011). *Photo fermentative hydrogen production using dominant components (acetate, lactate and butyrate) in dark fermentation effluents*. International Journal of Hydrogen Energy. 36:14059-14068
33. López, G. D., De Philippis, R. & Olguín, E.J. (2015). *El potencial de las bacterias púrpuras no sulfurosas (BPNS) en la producción biológica de hidrógeno*. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal. 6:1-18.
34. Martínez Rodolfo. (2009). *Comparación de dos impulsores en un biorreactor para el cultivo de células Beta vulgaris L. y su producción de betalaínas y proteínas*

- arabinogalactanos* (tesis de maestría). Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional.
35. Mohan, S., Babu, V. & Sarma, P.N. (2007). *Anaerobic biohydrogen production from dairy wastewater treatment in sequencing batch reactor (AnSBR): Effect of organic loading rate*. *Enzyme and Microbial Technology*. 41:506-515.
 36. Montes, M., Abánades, A. & Martínez-Val, J.M. (2005). *Producción de hidrógeno a partir de energía solar*. Centro de Análisis de Desarrollo Energético Sostenible, FFII.
 37. Muñoz Paredes, J. & Ramos, M. (2014). *Reactores discontinuos secuenciales: una tecnología versátil en el tratamiento de aguas residuales*. Universidad Militar Nueva Granada. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*. 24-1.
 38. Oh, Y-K., Seol, E-H., Kim, M-S. & Park, S. (2004). *Photoproduction of hydrogen from acetate by chemoheterotrophic bacterium Rhodospseudomonas palustris P4*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 29:1115-1121.
 39. Ozmihci, S. & Kargi, F. (2010). *Bio-hydrogen production by photo-fermentation of dark fermentation effluent with intermittent feeding and effluent removal*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35:6674-6680.
 40. Ren, N-Q., Liu, B-F., Ding, J., Guo, W-Q., Cao, G-L. y Xie, G-J. (2008). *The effect of butyrate concentration on photo hydrogen production from acetate by Rhodospseudomonas faecalis RLD-53*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33:5981-5985.
 41. Ren, N-Q., Liu, B-F., Zheng, G-X., Xing, D-F., Zhao, X., Guo, W-Q. & Ding, J. (2009). *Strategy for enhancing photo-hydrogen production yield by repeated fed-batch cultures*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34:7579-7584.
 42. Smith, C, J.; Rocha, E, R. & Paster, B, J. (2006). *The medically important Bacteroides spp. In health and disease*. En: *Bacteroides: Advances in Research And Application*. Acton, Q, A. Editor. Ed: ScholarlyEditions.
 43. Sreethawong, T., Chastsiriwatana, S., Rangsunvigit, P. & Chavadej, S. (2010). *Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD: N ratio, and organic acid composition*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 35:4092-4102.
 44. Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W. & Cen, K. (2009). *Combination of dark and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34:8846-8853.

45. Türkarslan, S., Özgür Yigit, D., Arslan, K., Eroglu, I. y Gündüz, U. (1998). *Photobiological hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides O.U.001 by utilization of waste wáter from milk industry*. Wn: Zaborsky OR., editor. BioHydrogen. New York and London: Plenum Press, 1998. p. 151–6.
46. Turner John, A. (2004). *Sustainable hydrogen production*. Science. 305:972.
47. Wu, S.; Liou, S. & Lee, C. (2012). *Correlation between bio-hydrogen porduction and polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by Rhodopseudomonas palustris WP3-5*. Bioresource Technology. 113:44-50.
48. Xle, G-J., Liu, B-F., Guo, W-Q., Ding, J., XIng, D-F, Nan, J., Ren, H-Y. & Ren, N-Q. (2012). *Feasibility studies on continuous hydrogen production using photo fermentative sequencing batch reactor*. International Journal of Hydrogen Energy. 37:13689-13695.
49. Yang, H.; Guo, L. & Liu, F. (2010). *Enhanced bio-hydrogen production from corncob by a two-step process: Dark- and photo-fermentation*. Bioresource Technology. 101:2049-2052.
50. Zhu, H., Suzuki, T., Tsygankov, A., Asada, Y. & Miyake, J. (1999). *Hydrogen production from tofu wastewater by Rhodobacter sphaeroides immobilized in agar gels*. International Journal of Hydrogen Energy. 24:305-310.

10. Anexos.

10.1. Análisis ANOVA obtenidos para la optimización de medio de crecimiento.

Tabla 9. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: biomasa a 48 horas.

Respuesta		Biomasa 48 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Prob > F	
Modelo	0.022	9	0.002	3.189	0.1073	No significativo
A-FosfatoM	0.003	1	0.003	3.939	0.1040	
B-FosfatoD	0.000	1	0.000	0.066	0.8069	
C-Extracto L	0.012	1	0.012	15.551	0.0109	
AB	0.006	1	0.006	8.321	0.0344	
AC	0.001	1	0.001	1.378	0.2933	
BC	0.004	1	0.004	5.470	0.0665	
A ²	0.001	1	0.001	0.668	0.4508	
B ²	0.000	1	0.000	0.007	0.9359	
C ²	0.004	1	0.004	4.719	0.0819	
Residual	0.004	5	0.001			
R cuadrada	0.852	R cuadrada ajustada	0.584			

Tabla 10. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: biomasa a 72 horas.

Respuesta		Biomasa 72 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Prob > F	
Modelo	0.037	9	0.004	3.217	0.1056	No significativo
A-FosfatoM	0.003	1	0.003	1.974	0.2190	
B-FosfatoD	0.000	1	0.000	0.190	0.6814	
C-Extracto L	0.018	1	0.018	13.991	0.0134	
AB	0.002	1	0.002	1.783	0.2394	
AC	0.001	1	0.001	0.787	0.4157	
BC	0.000	1	0.000	0.002	0.9649	
A^2	0.000	1	0.000	0.351	0.5795	
B^2	0.003	1	0.003	2.449	0.1784	
C^2	0.005	1	0.005	3.616	0.1156	
Residual	0.006	5	0.001			
R cuadrada	0.853	R cuadrada ajustada	0.588			

Tabla 11. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: biomasa a 93 horas.

Respuesta		Biomasa 93 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Value	Prob > F	
Modelo	0.066	9	0.007	25.442	0.0012	Significativo
A-FosfatoM	0.000	1	0.000	1.259	0.3128	
B-FosfatoD	0.013	1	0.013	46.459	0.0010	
C-Extracto L	0.023	1	0.023	79.848	0.0003	
AB	0.002	1	0.002	5.447	0.0669	
AC	0.005	1	0.005	15.991	0.0103	
BC	0.001	1	0.001	2.133	0.2040	
A^2	0.004	1	0.004	14.723	0.0122	
B^2	0.001	1	0.001	4.436	0.0890	
C^2	0.013	1	0.013	45.153	0.0011	
Residual	0.001	5	0.000			
R cuadrada	0.979	R cuadrada ajustada	0.942			

Tabla 12. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: biomasa a 120 horas.

Respuesta		Biomasa 120 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Prob > F	
Modelo	0.135	9	0.015	5.420	0.0387	Significativo
A- FosfatoM	0.001	1	0.001	0.209	0.6664	
B- FosfatoD	0.007	1	0.007	2.566	0.1701	
C-Extracto L	0.047	1	0.047	17.077	0.0091	
AB	0.021	1	0.021	7.679	0.0393	
AC	0.003	1	0.003	1.123	0.3378	
BC	0.015	1	0.015	5.419	0.0674	
A ²	0.000	1	0.000	0.011	0.9192	
B ²	0.014	1	0.014	5.170	0.0721	
C ²	0.015	1	0.015	5.293	0.0697	
Residual	0.014	5	0.003			
R cuadrada	0.907	R cuadrada ajustada	0.740			

Tabla 13. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: DO a 48 horas.

Respuesta		DO 48 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Prob > F	
Modelo	0.390	9	0.043	5.413	0.0388	Significativo
A-FosfatoM	0.063	1	0.063	7.980	0.0369	
B-FosfatoD	0.063	1	0.063	7.935	0.0372	
C-Extracto L	0.074	1	0.074	9.333	0.0283	
AB	0.002	1	0.002	0.222	0.6577	
AC	0.010	1	0.010	1.252	0.3140	
BC	0.001	1	0.001	0.141	0.7227	
A ²	0.020	1	0.020	2.542	0.1717	
B ²	0.007	1	0.007	0.819	0.4069	
C ²	0.052	1	0.052	6.607	0.0500	
Residual	0.040	5	0.008			
R cuadrada	0.907	R cuadrada ajustada	0.739			

Tabla 14. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: DO a 72 horas.

Respuesta		DO 72 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Prob > F	
Modelo	0.689	9	0.077	2.669	0.1461	No significativo
A-FosfatoM	0.011	1	0.011	0.387	0.5613	
B-FosfatoD	0.120	1	0.120	4.165	0.0968	
C-Extracto L	0.492	1	0.492	17.140	0.0090	
AB	0.262	1	0.262	9.134	0.0293	
AC	0.149	1	0.149	5.204	0.0714	
BC	0.007	1	0.007	0.244	0.6422	
A ²	0.004	1	0.004	0.149	0.7153	
B ²	0.015	1	0.015	0.524	0.5015	
C ²	0.008	1	0.008	0.270	0.6255	
Residual	0.144	5	0.029			
R cuadrada	0.828	R cuadrada ajustada	0.518			

Tabla 15. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: DO a 93 horas.

Respuesta		DO 93 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados medios	F	Prob > F	
Modelo	1.055	9	0.117	4.788	0.0497	Significativo
A-FosfatoM	0.022	1	0.022	0.917	0.3821	
B-FosfatoD	0.085	1	0.085	3.465	0.1217	
C-Extracto L	0.718	1	0.718	29.296	0.0029	
AB	0.148	1	0.148	6.035	0.0575	
AC	0.141	1	0.141	5.747	0.0618	
BC	0.073	1	0.073	2.994	0.1441	
A ²	0.013	1	0.013	0.546	0.4933	
B ²	0.001	1	0.001	0.050	0.8318	
C ²	0.000	1	0.000	0.003	0.9605	
Residual	0.122	5	0.024			
R cuadrada	0.896	R cuadrada ajustada	0.709			

Tabla 16. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: DO a 120 horas.

Respuesta		DO 120 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados medios	F	Prob > F	
Modelo	1.702	9	0.189	8.381	0.0153	Significativo
A-FosfatoM	0.001	1	0.001	0.032	0.8651	
B-FosfatoD	0.001	1	0.001	0.030	0.8686	
C-Extracto L	1.410	1	1.410	62.456	0.0005	
AB	0.298	1	0.298	13.199	0.0150	
AC	0.014	1	0.014	0.626	0.4646	
BC	0.007	1	0.007	0.328	0.5915	
A^2	0.000	1	0.000	0.010	0.9253	
B^2	0.020	1	0.020	0.886	0.3898	
C^2	0.027	1	0.027	1.214	0.3208	
Residual	0.113	5	0.023			
R cuadrada	0.938	R cuadrada ajustada	0.826			

Tabla 17. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: pH a 48 horas

Respuesta		pH 48 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados medios	F	Prob > F	
Modelo	0.131	9	0.015	22.868	0.0015	Significativo
A-FosfatoM	0.072	1	0.072	113.678	0.0001	
B-FosfatoD	0.002	1	0.002	2.834	0.1531	
C-Extracto L	0.002	1	0.002	2.834	0.1531	
AB	0.000	1	0.000	0.433	0.5397	
AC	0.002	1	0.002	3.333	0.1275	
BC	0.008	1	0.008	12.409	0.0169	
A^2	0.011	1	0.011	16.971	0.0092	
B^2	0.008	1	0.008	12.663	0.0162	
C^2	0.001	1	0.001	1.726	0.2460	
Residual	0.003	5	0.001			
R cuadrada	0.976	R cuadrada ajustada	0.934			

Tabla 18. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: pH a 72 horas.

Respuesta		pH 72 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados medios	F	Prob > F	
Modelo	0.456	9	0.051	7.791	0.0180	Significativo
A-FosfatoM	0.125	1	0.125	19.218	0.0071	
B-FosfatoD	0.034	1	0.034	5.197	0.0716	
C-Extracto L	0.036	1	0.036	5.604	0.0642	
AB	0.020	1	0.020	3.042	0.1416	
AC	0.009	1	0.009	1.355	0.2969	
BC	0.018	1	0.018	2.694	0.1617	
A ²	0.120	1	0.120	18.486	0.0077	
B ²	0.002	1	0.002	0.381	0.5641	
C ²	0.002	1	0.002	0.280	0.6191	
Residual	0.033	5	0.007			
R cuadrada	0.933	R cuadrada ajustada	0.814			

Tabla 19. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: pH a 93 horas.

Respuesta		pH 93 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados medios	F	Prob > F	
Modelo	0.409	9	0.045	9.098	0.0128	Significativo
A-FosfatoM	0.115	1	0.115	23.065	0.0049	
B-FosfatoD	0.031	1	0.031	6.257	0.0544	
C-Extracto L	0.036	1	0.036	7.298	0.0427	
AB	0.016	1	0.016	3.217	0.1328	
AC	0.002	1	0.002	0.322	0.5949	
BC	0.008	1	0.008	1.531	0.2709	
A ²	0.134	1	0.134	26.733	0.0036	
B ²	0.026	1	0.026	5.148	0.0725	
C ²	0.000	1	0.000	0.072	0.7996	
Residual	0.025	5	0.005			
R cuadrada	0.943	R cuadrada ajustada	0.839			

Tabla 20. Análisis ANOVA para medio de crecimiento. Respuesta: pH a 120 horas.

Respuesta		pH 120 h				
Análisis de Varianza						
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados medios	F	Prob > F	
Modelo	0.402	9	0.045	8.214	0.0160	Significativo
A-FosfatoM	0.101	1	0.101	18.641	0.0076	
B-FosfatoD	0.031	1	0.031	5.753	0.0617	
C-Extracto L	0.039	1	0.039	7.217	0.0435	
AB	0.017	1	0.017	3.200	0.1336	
AC	0.002	1	0.002	0.296	0.6097	
BC	0.005	1	0.005	0.959	0.3723	
A^2	0.131	1	0.131	24.090	0.0044	
B^2	0.032	1	0.032	5.826	0.0606	
C^2	0.001	1	0.001	0.159	0.7065	
Residual	0.027	5	0.005			
R cuadrada	0.9366	R cuadrada ajustada	0.8226			