

Efecto de Agentes Oxidantes y Reductores en la Producción de Hidrógeno.

María Alejandra Vesga Barón

Trabajo de Grado para Optar al Título de Ingeniera Química

Directores

Estela Tapia Venegas  
Ingeniera Bioquímica, M.Cs, Ph.D  
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

María Cristina Schiappacasse  
Ingeniera Civil Bioquímica, M.Cs  
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Liliana del Pilar Castro  
Ingeniera Química, Ph.D  
Universidad Industrial de Santander

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2017

*A Dios, por brindarme la oportunidad de ser una eterna estudiante, aprendiendo día a día a ser mejor persona, a dar lo mejor de mí, y a creer en el mundo, por ello soy un granito más en busca de la redención.*

*A mi papí, Néstor, por su sacrificio y esfuerzo para que yo alcanzara mis sueños, por impulsarme a dar lo mejor de mí para seguir hasta el final, y por enseñarme que el estudio es el futuro.*

*A mi mamá, Sandra, por levantarme cada mañana, por cada comida, por mantener el orden dentro del caos y por la coca-cola en las noches largas.*

*A mi familia, mis abuelos Abue y Tere, precursores de una familia de cuento de hadas, ejemplo de amor eterno y perseverancia, a mi tía Laura, por su ejemplo y apoyo incondicional, y a todos los que conforman mi familia, por su cariño y por potenciar y brindar las condiciones para alcanzar mis sueños.*

*En honor, al profesor Gonzalo Ruiz Fillipi, quien no alcance a tener el placer de conocer, pero agradezco ser parte de su trabajo y legado.*

### **Agradecimientos**

Expreso mis profundos agradecimientos a:

La Postdoc. Estela Tapia, por la gran oportunidad brindada para trabajar en su grupo de investigación, por su apoyo a lo largo del proceso, y por su contante guía en el desarrollo de este proyecto.

Los miembros del grupo de investigación de ambiental, especialmente a María Cristina Schiappaccasse, Lorena Jorquera, Pilar Valderrama y Oriana Ramírez, por compartir sus conocimientos y experiencias, y siempre ayudar en cada uno de los pasos del proyecto.

A la escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y a la Universidad Industrial de Santander, por el convenio de movilidad internacional, que hizo posible realizar esta pasantía de investigación.

Dra. Liliana Castro, por depositar su confianza en mí desde el inicio de esta aventura, por estar al pendiente tanto de las etapas de este proyecto como de mi estancia fuera del país, y por sus aportes para concluir este trabajo de la mejor manera.

Los profesores y a la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander, los cuales me brindaron una muy buena formación académica, profesional e integral durante la realización de mis estudios.

A mis compañeros de camino, con los que reí, lloré y compartí momentos de los que conservo recuerdos. Y a los nuevos, quienes esta nueva experiencia trajo a mi vida, por convertirse en mi familia extranjera, y por impulsarme a descubrir nuevas aventuras.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción	14
1.Marco teórico	16
1.1.Procesos biológicos de producción de hidrógeno	16
1.1.1.Fermentación oscura	16
1.2.Glicerol como sustrato	17
1.3.Variables operacionales que afectan la producción de H <sub>2</sub>	20
1.3.1.pH	20
1.3.2.Temperatura	20
1.3.3.Concentración de sustrato	21
1.3.4.Potencial redox (ORP)	21
1.4.Microorganismos productores de H <sub>2</sub>	25
1.4.1.Cultivos puros y mixtos para producir hidrógeno	25
2.Metodología	27
2.1.Materiales	27
2.1.1.Sustrato	27
2.1.2.Lodos	27
2.1.3.Medio de Cultivo	27
2.1.4.Agentes oxidantes y reductores	28
2.2.Metodología experimental	28
2.2.1.Diseño experimental	28
2.2.2.Montaje experimental	29

EFECTO DEL ORP SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.	7
2.3.Métodos analíticos: Parámetros físico-químicos	31
2.4.Parámetros para cuantificar la producción de hidrógeno	31
2.4.1.Rendimiento de hidrógeno.	31
3.Resultados y discusión	32
3.1.Efecto de agente oxidante/reductor en la producción de hidrógeno y remoción de glicerol	32
3.2.Efecto de agente oxidante/reductor en la producción de metabolitos	34
3.3.Variables ambientales	39
3.3.1.Redox	39
3.3.2.pH	41
3.3.3.Materia orgánica	42
Conclusiones	42
Perspectivas	43
Bibliografía	44
Anexos	53

**Lista de figuras**

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Ruta metabólica para la producción fermentativa de H <sub>2</sub> a partir de glicerol.	19
Figura 2. Reactores CSTR proveedores de inóculos	29
Figura 3. Equipo AMPTs	30
Figura 4. Concentración de metabolitos para inóculo de lodo aerobio.	35
Figura 5. Concentración de metabolitos para inóculo de lodo aerobio.	36
Figura A1. Ruta metabólica para la producción fermentativa de H <sub>2</sub> a partir de glucosa en sistemas PFOR	54
Figura A2. Ruta metabólica para la producción fermentativa de H <sub>2</sub> a partir de glucosa en sistemas PFL	56
Figura B1. Montaje experimental del AMPTs	66
Figura 3. Equipo para cromatografía HPLC	76

**Lista de anexos**

	<b>Pág.</b>
Anexo A. Rutas metabólicas para la producción de H <sub>2</sub>	53
Anexo B. Metodología experimental	59
Anexo C. Metodología analítica: Parámetros físico-químicos	67
Anexo D. Curva de acumulación de gas (AMPTs)	77

**ABREVIATURAS Y DEFINICIONES**

<b>AGV</b>	Ácidos Grasos Volátiles
<b>AMPTs</b>	Automatic Methane Potential Test system
<b>CSTR</b>	Continuos Stirred-tank-reactor, reactor continuo de tanque agitado
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>FHL</b>	Sistema enzimático Formiato-Hidrógeno-Liasa
<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrógeno
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography, Cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>ORP</b>	Oxidation-Reduction Potential, Potencial de óxido-reducción
<b>PFL</b>	Sistema enzimático Piruvato-Formiato-Liasa
<b>PFOR</b>	Sistema enzimático Piruvato-Ferredoxina-Óxido-Reductasa
<b>SST</b>	Sólidos Suspendidos Totales
<b>SSV</b>	Sólidos Suspendidos Volátiles

**AMPTs:** Equipo para realizar ensayos convencionales de potencial metano (o hidrógeno) mediante digestión anaerobia, los ensayos se pueden montar de forma rápida. El principio de medición del AMPTs está basado en el desplazamiento de volumen, pero la diferencia radica en la

medida y recolección de los datos de manera automática, los datos obtenidos se observan en tiempo real durante el transcurso de la experiencia.

**Consorcio:** Conjunto de microorganismos más directamente relacionados, que tienen una relación funcional común.

**Digestión anaerobia completa:** Proceso biológico, llevado a cabo por un consorcio microbiano de bacterias que degradan la materia orgánica mediante pasos sucesivos de hidrólisis, acidogénesis-acetogénesis y metanogénesis, para finalmente producir metano y dióxido de carbono.

**Digestión anaerobia parcial:** Proceso biológico, llevado a cabo por un consorcio microbiano de bacterias que degradan la materia orgánica mediante pasos sucesivos de hidrólisis y acidogénesis-acetogénesis, para finalmente producir hidrógeno, dióxido de carbono y metabolitos solubles como ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico, etanol, etc.

**Lodo anaerobio:** Consorcio microbiano proveniente de un reactor industrial que degrada materia orgánica en condiciones anaerobias, los microorganismos se relacionan simbióticamente, metabolizando la materia orgánica en ausencia de oxígeno a través de etapas sucesivas como son la hidrólisis, acidogénesis-acetogénesis y metanogénesis.

**Lodo aerobio (activo):** Consorcio microbiano proveniente de un reactor industrial que degrada materia orgánica en condiciones aerobias, los microorganismos se relacionan simbióticamente, metabolizando la materia orgánica en presencia oxígeno generando dióxido de carbono y produciendo una gran cantidad de biomasa en comparación con sistemas anaerobios.

## RESUMEN

**TÍTULO:** EFECTO DE AGENTES OXIDANTES Y REDUCTORES EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO\*

**AUTOR:** MARÍA ALEJANDRA VESGA BARÓN†

**PALABRAS CLAVE:** Hidrógeno, Potencial de óxido-reducción, metabolitos.

### DESCRIPCIÓN:

El hidrógeno es una nueva fuente de energía limpia, su producción vía digestión anaerobia tiene especial atención ya que simultáneamente a la producción de hidrógeno se pueden tratar residuos como el glicerol de la producción de biodiesel. Dentro del proceso productivo de hidrógeno se presentan variables de proceso estudiadas ampliamente como pH, Temperatura, Tipo de inóculo etc. Se ha estudiado en otros procesos que el potencial de óxido reducción (ORP) puede dirigir las vías metabólicas de producción, sin embargo, llama la atención que el potencial de óxido-reducción (ORP) no ha sido estudiado en gran medida, siendo de conocimiento las interacciones vía oxidativa o reductiva de las reacciones en las rutas metabólicas de los procesos. A partir de estos antecedentes surge el objetivo de este trabajo, el cual fue evaluar el efecto de agentes oxidantes y/o reductores en la producción de hidrógeno y metabolitos solubles asociados.

Experimentos fueron realizados para cumplir el objetivo en la producción de hidrógeno, los datos experimentales se obtuvieron vía fermentación oscura para un proceso por lotes, contando con un equipo AMPTs para su desarrollo, se utilizaron dos tipos de inóculos procedentes de distintos lodos de plantas de tratamiento, y glicerol como sustrato. Se analizaron variables ambientales como, pH, cantidad de biomasa y remoción de materia orgánica, y variables de respuesta como rendimientos de hidrógeno y formación de metabolitos.

El  $H_2O_2$  ofrece el mayor rendimiento de  $0,9 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glicerol}}$ , agentes como el  $K_3[Fe(CN)_6]$  y  $NaS \cdot 9H_2O$  presentaron cambios en el pH inicial disminuyendo la producción de  $H_2$ . La adición de agentes elimina vía solvatogénica de cultivos mixtos. Concluyéndose que el mayor impacto de la investigación se da en el rendimiento de  $H_2$ , más que en los metabolitos.

---

\* Trabajo de grado

† Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directores: Liliana del Pilar Castro (Universidad Industrial de Santander), Estela Tapias Venegas y María Cristina Schiappacasse (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso)

**ABSTRACT**

**TITLE:** EFFECT OF REDUCING AND OXIDIZING AGENTS IN HYDROGEN PRODUCTION<sup>‡</sup>

**AUTHOR:** MARÍA ALEJANDRA VESGA BARÓN<sup>§</sup>

**KEYWORDS:** Hydrogen, Oxidation-reduction potential, metabolites.

**DESCRIPTION:**

Hydrogen is a new source of clean energy. Its production via anaerobic digestion is important as it, simultaneously to hydrogen production, treats residues like glycerol in the production of biodiesel. Within the process of hydrogen production, there are process variables widely studied like pH, temperature, inoculum type, etc. The oxidation-reduction potential (ORP) ability to guide the metabolic production pathways has been previously studied in other processes, although it is important to notice that the oxidation-reduction potential (ORP) has not been studied at great lengths knowing the interactions either via oxidative or reductive reactions in the metabolic routes of the processes. The objective of this work arises from the aforementioned background and it encompasses the evaluation of the effect of oxidative and/or reducing agents in hydrogen production and associated soluble metabolites.

Experiments were performed to reach the objective in hydrogen production, experimental data were obtained via "dark fermentation" for processes per lots, using AMPTs equipment for its development, two types of inoculums were used that originated from different treatment plant muds, and the substrate was glycerol. Environmental variables were analyzed like pH, amount of biomass and removal of organic matter, and response variable like hydrogen yield and metabolite formation.

The  $H_2O_2$  offers the best yield of  $0,9 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{glycerol}}$ , agents like  $K_3[Fe(CN)_6]$  and  $NaS \cdot 9H_2O$  showed changes from the initial pH diminishing  $H_2$  production. The addition of agents eliminates via "salvatogenica" mixed cultures. In conclusion, the most impactful result of the investigation is shown in the yield of  $H_2$ , more than with metabolites.

---

<sup>‡</sup> Degree work

<sup>§</sup> Physics-Chemistry Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Directors: Liliana del Pilar Castro (Universidad Industrial de Santander), Estela Tapias Venegas and María Cristina Schiappacasse (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso)

## INTRODUCCIÓN

El hidrógeno se considera como la energía más atractiva para el futuro, debido a que su combustión no resulta contaminante liberando únicamente vapor de agua. Teniendo en cuenta que no se producen gases de efecto invernadero durante su combustión, ofrece un gran potencial para reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> que se generan durante la combustión de sus precursores de origen fósil. Adicionalmente, este compuesto puede almacenarse como gas a presión y como líquido, o distribuirse mediante gasoductos, por lo que se considera puede reemplazar al gas natural a largo plazo y es considerado un vector energético (herramienta que permite el transporte y/o el almacenamiento de energía) (Orecchini 2006; Edwards et al. 2008; Fierro 2011; Tapia-Venegas 2014).

Como precursores primarios para la obtención de hidrógeno, se cuenta con un amplio grupo tales como combustibles fósiles, energía nuclear y, con una penetración cada vez mayor, las energías renovables (eólica, solar, biomasa). Mediante estas alternativas, el coste del hidrógeno como portador de energía no contaminante será más estable que cualquier otra fuente. El hidrógeno se considera como un combustible ideal, su atractivo es aún mayor cuando se utiliza en las celdas de combustible (conversión de energía química a energía eléctrica), proporcionando una eficiencia energética superior a la de un motor térmico (Edwards et al. 2008; Andrews & Shabani 2012; Fierro 2011; Tapia-Venegas 2014).

Es conocido que el hidrógeno no se encuentra en estado libre en la Tierra, por lo que no es una energía primaria. Sin embargo, puede producirse a partir de distintos precursores mediante procesos químicos o bioquímicos. La vía seleccionada de producción de H<sub>2</sub> viene dictada por la

economía del proceso, las necesidades del mercado y también por las regulaciones ambientales. La producción de hidrógeno por rutas biológicas, se puede llevar a cabo mediante fermentación oscura. En este proceso, intervienen las variables pH, temperatura, tipo de inóculo y configuración del reactor. Por otra parte, el potencial redox se define como la transferencia de electrones llevando a cabo las reacciones dentro del sistema, en ese sentido el ORP es más sensible a cambios delicados del metabolismo intracelular. Por tanto, puede ser considerado como una variable más a evaluar. El proceso de producción de hidrógeno vía fermentación oscura se ve afectado por una serie de variables ambientales, que han sido estudiadas ampliamente. Sin embargo, el ORP ha sido un parámetro de control en los estudios reportados en la literatura, pero no se ha visto la influencia del mismo sobre los sistemas de producción de hidrógeno.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar el efecto de la adición de agentes oxidantes y reductores en la producción de  $H_2$ , a partir de glicerol por fermentación oscura en un sistema por lotes.

Para dar cumplimiento al objetivo general de la investigación se trazaron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el agente oxidante o reductor que favorezca la producción de  $H_2$  a partir de glicerol, para inóculo procedente de lodo aerobio y lodo anaerobio.
- Determinar el agente oxidante o reductor que favorezca la producción de un metabolismo soluble (AGV o alcohol) a partir de glicerol, para inóculo procedente de lodo aerobio y lodo anaerobio.
- Determinar el efecto global de los agente oxidante o reductor en un sistema productor de hidrógeno.

## 1. Marco teórico

### 1.1. Procesos biológicos de producción de hidrógeno

La producción de hidrógeno vía digestión anaerobia se define en dos grupos de tecnologías, las cuales están basadas en el tipo de necesidad lumínica del mecanismo de producción (tecnologías dependientes de la luz e independientes de la luz), dentro de los procesos independientes de la luz se encuentra la fermentación oscura y los procesos biofotólisis y fotofermentación, se destacan por requerir luz (Rahman et al. 2016).

El proceso de fermentación oscura es el más beneficioso y rentable, ya que no requiere de energía proveniente de la luz a diferencia de los procesos descritos anteriormente. El rendimiento de H<sub>2</sub> producto de este proceso es más alto que los procesos con requerimiento lumínico (Rahman et al. 2016). Adicionalmente, la fermentación oscura presenta mayores posibilidades de escalado y aplicación industrial a corto plazo, gracias a que posee similitudes con los procesos de digestión anaerobia convencional (Levin et al. 2004). Entre los diferentes mecanismos existentes para la producción de hidrógeno, la fermentación oscura es uno de los más interesantes debido a que se aprovechan residuos como materia prima.

**1.1.1. Fermentación oscura.** La producción de hidrógeno por este método está dada por bacterias anaeróbicas que no requieren luz y usan sustratos ricos en carbohidratos (Bedoya et al. 2007; Blanco Londoño & Rodríguez Chaparro 2012).

La producción de hidrógeno en la fermentación oscura no ocurre como un proceso natural, sino que es parte de un proceso más complejo como es la digestión anaerobia. En la digestión anaerobia intervienen diferentes grupos microbianos, de manera coordinada y secuencial, para descomponer la materia orgánica, en ausencia de oxígeno libre, propiciando la formación de metano y dióxido de carbono y el hidrógeno se produce como un producto intermedio (Pérez García et al. 2002).

Por lo tanto, para generar  $H_2$  a partir de un consorcio microbiano que realiza digestión anaerobia se debe favorecer el crecimiento de los productores de hidrógeno y la disminución de los consumidores del mismo que son los microorganismos metanogénicos (Rahman et al. 2016).

## **1.2. Glicerol como sustrato**

El 1,2,3-propanotriol, glicerina o glicerol es químicamente un alcohol, es obtenido de aceites y grasas. El glicerol es técnicamente un alcohol de azúcar, pero no se considera un carbohidrato; ya que junto con los ácidos grasos producto de la descomposición de los carbohidratos forman los triglicéridos. El glicerol es un producto químico útil ampliamente utilizado en la industria cosmética, automotriz, alimentaria, farmacéutica, y textil (Tapia-Venegas 2016).

Entre los biocombustibles, el biodiesel es ampliamente aceptado como un combustible que se puede utilizar directamente o como una mezcla sin comprometer las especificaciones del motor y su producción ha ido en aumento en muchas áreas del mundo. En Colombia, el cultivo comercial de palma de aceite se ha llevado a cabo por más de 50 años, aumentando en la última década a una tasa anual mayor al 8%, alcanzando un área cultivada de 470.000 hectáreas en 2015 (Castiblanco et al. 2014; Fedebiocombustibles 2015). Dicho crecimiento es el resultado de las políticas adoptadas por el gobierno colombiano que buscan reducir la dependencia de combustibles fósiles

y apoyar el desarrollo rural. El consumo de biocombustibles en Colombia esta principalmente asociado con el sector transporte, suceso de gran importancia debido a los programas de mezcla de biocombustibles (García et al. 2011).

El aumento de la producción de biodiesel, genera un aumento simultáneo de la producción de glicerol asociado. Sin embargo, el aumento de la producción de biodiésel ha llevado a la generación de grandes cantidades de glicerol, disminuyendo su costo y deben ser eliminados de alguna manera, para que no se convierta en un problema ambiental (Galadima & Muraza 2016; Tapia-Venegas 2014).

El glicerol puede ser convertido en una amplia gama de combustibles y petroquímicos, incluyendo diésel, nafta ligera, ácido succínico, gas de síntesis, oleofinas y poliésteres. Así mismo, es una prometedora fuente de carbono para producir hidrógeno, debido a que siendo un residuo, puede ser almacenado fácilmente durante un largo periodo de tiempo y coincide con ser un sustrato más reducido en azúcares, en ese sentido se puede utilizar como sustituto de los hidratos de carbono tradicionales (Davila-Vazquez et al. 2008; Ntaikou et al. 2010).

En la , se presentan las dos rutas metabólicas conocidas para la descomposición del glicerol, oxidativa y reductiva. En la descomposición reductiva, el glicerol se reduce en 3-hidroxi propionaldehído y 1,3-propandiol. Cuando se lleva a cabo la descomposición oxidativa, el glicerol es transformado a piruvato, a partir de este se obtiene formato, etanol, butirato, acetato e hidrógeno. La obtención de biocombustibles por la vía oxidativa (hidrógeno y etanol) la hace un proceso atractivo. Dentro de las consideraciones para direccionar la degradación de glicerol por la vía oxidativa es mantener una baja concentración de sustrato, ya que favorece el proceso frente a la degradación reductiva (da Silva et al. 2009).

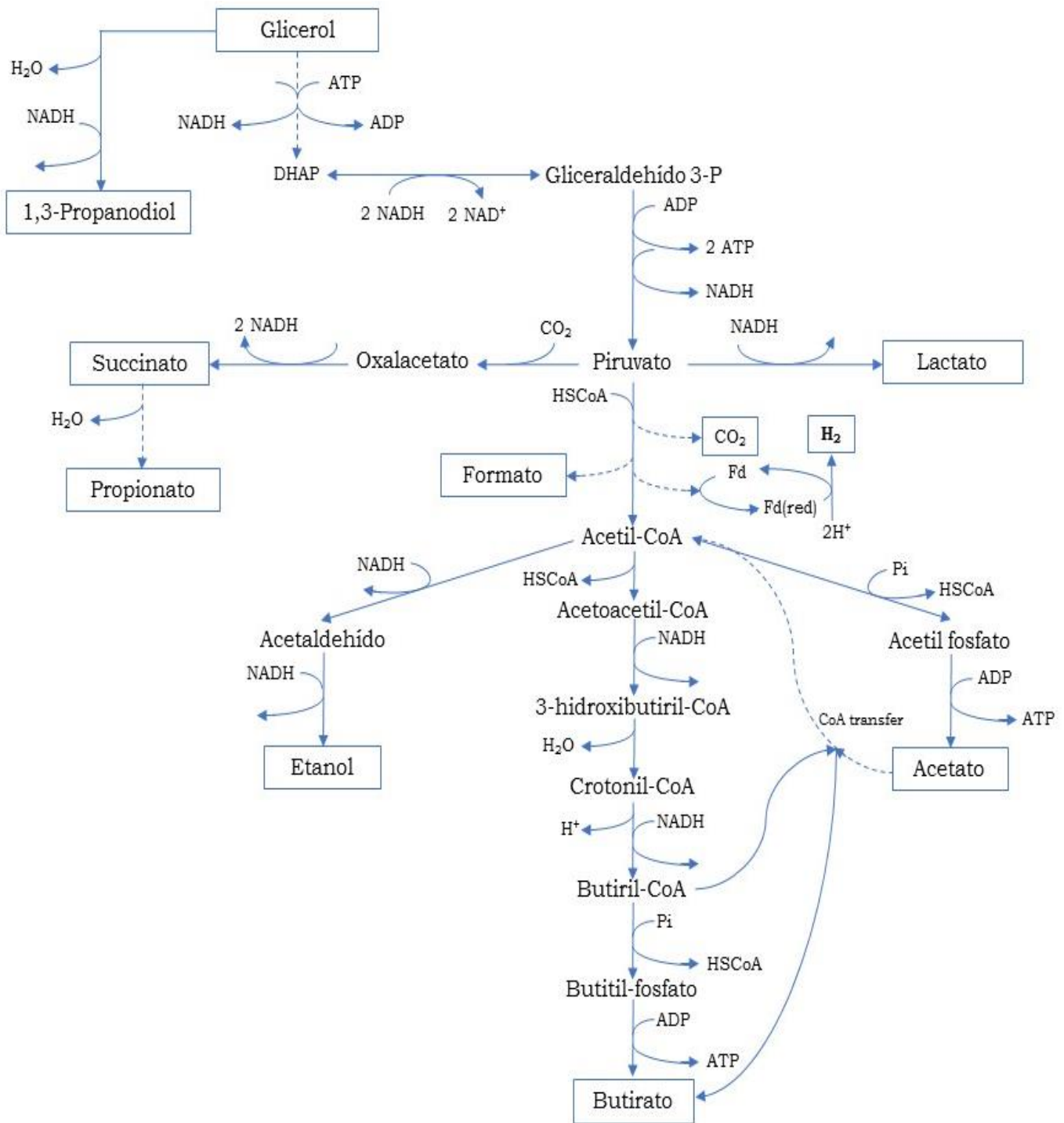


Figura 1. Ruta metabólica para la producción fermentativa de H<sub>2</sub> a partir de glicerol. Adaptado

de (Tapia-Venegas 2016).

Entre los microorganismos, de los cuales se tiene conocimiento sobre su capacidad para crecer en condiciones anaerobias, con glicerol como única fuente de carbono se encuentran, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasterianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* y *Lactobacillus reuteri* (Shams Yazdani & Gonzalez 2008).

El rendimiento máximo teórico de hidrógeno a partir de glicerol se encuentra en cuestionamiento, algunos autores mencionan 3 moles  $H_2$  moles<sup>-1</sup> glicerol cuando se obtiene solo acetato como subproducto, y de 1 moles  $H_2$  moles<sup>-1</sup> glicerol al obtener etanol como subproducto (Ito et al. 2005; Ntaikou et al. 2010).

### **1.3. Variables operacionales que afectan la producción de $H_2$**

**1.3.1. pH.** Posee un papel fundamental, ya que mantiene un crecimiento sostenible de las bacterias y su actividad enzimática, mientras evita el desarrollo de microorganismos indeseables. Los valores óptimos de pH varían desde 5,5 hasta 6,0. Como parámetro clave en la producción de hidrógeno, el pH influye directamente en la actividad de la hidrogenasa (Kothari et al. 2012; Ramírez-Morales et al. 2015).

**1.3.2. Temperatura.** Tiene una influencia en los cultivos mixtos, generalmente los estudios se han llevado a cabo en condiciones mesófilas (20-40 °C) y termófilas (45-80 °C). En general, se ha encontrado rendimientos superiores utilizando cepas termófilas, sin embargo, los cultivos

mesófilos presentan mayor velocidad de producción de hidrógeno (Rittmann & Herwig 2012; Ramírez-Morales et al. 2015).

**1.3.3. Concentración de sustrato.** El efecto de la tasa de carga orgánica (OLR) en la producción de hidrógeno también ha sido estudiado. En general, la tasa de producción de hidrógeno aumenta con el OLR hasta un valor máximo, después de este máximo el reactor entra en una condición de sobrecarga, que es causada por la baja TRH y/o saturación de sustrato (Shen et al. 2009; Sreethawong et al. 2010; Hafez et al. 2010; Ramírez-Morales et al. 2015).

**1.3.4. Potencial redox (ORP).** El ORP representa la suma de todos los procesos de óxido-reducción dentro de la célula y corresponde a la tendencia a adquirir electrones. Se requieren dos componentes para llevar a cabo una reacción de óxido-reducción, en la cual el compuesto reductor cede sus electrones al compuesto oxidante. Cada pareja redox tiene su valor ORP propio, cuanto mayor es la afinidad por los electrones, mayor será el ORP del par redox (Liu et al. 2013).

En comparación con el valor de pH que proporciona información de los protones, el ORP representa la actividad de los electrones, por tanto, el ORP es más sensible a cambios delicados del metabolismo intracelular (Liu et al. 2013).

- *Agente Oxidante:* Un agente oxidante es una sustancia que tiene la habilidad de oxidar otras sustancias, en ese sentido, un agente oxidante es una especie química que remueve un electrón de otras especies.

- *Agente reductor*: Un agente reductor coincide con tener un alto potencial de transferencia de electrones, en dicho sentido se reconoce por tener un valor de ORP negativo.

**1.3.4.1. Factores ambientales que afectan el ORP.** La temperatura y la relación de óxido-reducción de cualquier compuesto, juega un papel importante para modular el ORP de una solución. Adicionalmente, las condiciones de requerimientos de oxígeno y anaerobiosis de los microorganismos y cultivos involucrados en la fermentación son un factor a tener en cuenta (Liu et al. 2013) (Liu, Xue, Lin, & Bai, 2013).

En las fermentaciones anaeróbicas el efecto de los productos químicos, como los sustratos nutricionales del medio y metabolitos liberados en el caldo de fermentación, es considerable debido a la ausencia de oxígeno disuelto y diferente grado de reducción presentado por dichos productos químicos (Liu et al. 2013).

**1.3.4.2. Estrategias de control en el ORP.** Las estrategias implementadas para la regulación del ORP se centran principalmente en la forma de cambiar dicha relación, entre ellas se tiene la modificación celular a través de ingeniería metabólica e ingeniería de procesos (Liu et al. 2013). También está el control de ORP mediante rociado de gases y adición de reactivos que afectan en valor de ORP.

### Cepas Modificadas

El ORP puede ser controlado a nivel molecular mediante la alteración de la expresión de genes, ya que estos codifican enzimas clave para la transferencia de electrones y las reacciones redox. Tal estrategia se ha explorado principalmente con cepas como la *E. coli* y *S. cerevisiae* (Liu et al. 2013).

Aunque se dirija a unas pocas enzimas claves en la red metabólica entera, el control del ORP puede proporcionar efectos inesperados, lo que limita sus aplicaciones.

### Rociado de gases

Gases como O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y CO pueden ser burbujeados en sistemas de fermentación para controlar el ORP. El O<sub>2</sub> disuelto eleva la reducción, mientras el H<sub>2</sub> por su parte la disminuye. Además, los gases inertes como N<sub>2</sub> y He también pueden ser añadidos a los sistemas con el objeto de quitar el O<sub>2</sub> disuelto y el H<sub>2</sub>, afectando indirectamente el ORP (Liu et al. 2013).

Para el caso de las fermentaciones anaerobias, como la producción de butanol por *Clostridium* (estrictamente anaeróbico), el CO además de modificar el ORP, inhibe las hidrogenasas y en consecuencia la producción de H<sub>2</sub>. Por el contrario, la adición de N<sub>2</sub> modifica el ORP y mejora la producción de H<sub>2</sub> por fermentación, ya que no produce inhibición en las enzimas productoras de H<sub>2</sub> (Liu et al. 2013).

### Adición de reactivos

Los productos químicos con diferentes grados de reducción como el ferricianuro de potasio, viológeno de metilo y rojo neutro son reactivos redox, que se pueden complementar en sistemas de fermentación como portadores de electrones, afectando el ORP del medio ambiente y el metabolismo intracelular (Liu et al. 2013).

Los reactivos redox pueden complementar convenientemente con cualquier biorreactor y sistema de fermentación, pero existen dos desventajas con dicha estrategia:

- La adición de productos químicos potencialmente interfieren con las funciones fisiológicas de las células.
- Algunos reactivos químicos, son demasiado costosos para ser utilizados desde el punto de vista de aplicación industrial.

#### 1.3.4.3. Estudios reportados en la literatura

En la *Tabla 1* se presentan investigaciones que han centrado su estudio en el potencial redox, como parámetro de control o del proceso, se presentan las condiciones de los ensayos. Dentro de los estudios, el realizado por Liu et al. (2011) utiliza la microaireación como método de control del ORP para determinados valores, en ese sentido, el tipo de investigación a realizar se asemeja con dicho método de estudio.

*Tabla 1. Estudios reportados en la literatura de fermentación oscura donde se ha medido el ORP*

Microorganismo	Sustrato	Condiciones de operación	Método de control redox	Metabolito	Referencia
<i>E. coli</i>	Glucosa	Lote 1,5 l 200 rpm 37 °C	Ferricianuro potásico [K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> ] como agente oxidante Ditiotreitol (DTT) como agente reductor (-400 mV)	Succionato 28,6 g/l	(Liu et al. 2014)
<i>Corynebacterium crenatum</i>	Glucosa 40 g/l	Lote 200 rpm 30 °C	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> como agente oxidante	Succionato 21,5 g/l	(Chen et al. 2012)

			Na <sub>2</sub> S·7H <sub>2</sub> O agente reductor para mantener -300 mV de ORP		
<i>Levadura</i>	Glucosa 200 g/l	Lote 1 l 150 rpm	Microaireación para mantener -50 y -100 de ORP	79 g/l etanol (-50 mV) 66 g/l etanol (-100 mV) 68 g/l etanol (sin control, ORP medido 138 mV)	(Liu et al. 2011a)
<i>Lodo activo</i>	Melaza 6 gDQO/l	CSTR 35 °C pH 4,5 TRH 6 h	Sin control Valor medido -450 mV	H <sub>2</sub> y etanol	(Ren et al. 2010)
<i>Lodo activo</i>	Melaza 40 gDQO/l	CSTR 35 °C pH 5,5 TRH 3 h	Sin control Valor medido 400 mV	H <sub>2</sub> y acetato	(Lay et al. 2010)
<i>Lodo activo</i>	Sacaro- sa 20 gDQO/l	CSTR 35 °C pH 6,8 TRH 12 h a 2 h	Sin control Valor medido -524	H <sub>2</sub> y ácido butírico	(Lin et al. 2006)

#### 1.4. Microorganismos productores de H<sub>2</sub>

**1.4.1. Cultivos puros y mixtos para producir hidrógeno.** Para cultivos puros, dentro de los microorganismos anaerobios estrictos, los cuales son muy sensibles a la presencia de oxígeno, se encuentra el género *Clostridium*, dicho género ha sido uno de los más estudiados, tanto en cultivo por lotes como en continuo, utilizando glucosa como sustrato (Bedoya et al. 2007). Con respecto a los anaerobios facultativos, que presentan resistencia a la presencia de oxígeno y por lo tanto tienen la ventaja de consumir el oxígeno rápidamente en los biorreactores garantizando anaerobiosis, están *Enterobacter*, *E. coli* y *Citrobacter* (Bedoya et al. 2007). Las bacterias *Enterobacter* generalmente presentan rendimientos más bajos que la *Clostridium*, ya que se favorece la

producción de subproductos como el lactato. Por su parte, la *E. coli* produce  $H_2$  a partir de formiato en anaerobiosis y *Citrobacter* mediante reacciones de intercambio gaseoso (Bedoya, Castrillón, Ramírez, Vásquez, & Arias, 2008).

Para cultivos mixtos, se ha podido aislar microflora de cultivos mixtos de varias fuentes de desecho como lodos activados, lodos digeridos anaeróbicamente, compost de desechos, sedimentos de lagos y suelos de cultivos agrícolas. Esta microflora a menudo contiene bacterias no deseadas para la producción de hidrógeno como son los metanógenos, los cuales consumen el  $H_2$  producido y lo convierten a metano, por tanto se hace necesario la implementación de un pretratamiento con el objeto de enriquecer la microflora y/o al trabajar en un sistema continuo con un reactor de tipo CSTR se puede controlar disminuyendo los tiempos de retención hidráulica (HRT) (Bedoya et al. 2007). La estrategia utilizada para minimizar la presencia de los consumidores de hidrógeno, es tratar el inóculo antes del proceso o durante el mismo, dentro de los procesos de tratamiento se incluyen, la adición de inhibidores químicos, aplicación de choque térmico, adición de un ácido o base, aireación y control biocinético (Ntaikou et al. 2010; Wong et al. 2014).

A pesar de que un cultivo puro no requiere un pretratamiento, se contamina fácilmente, mientras un cultivo mixto permite el uso de sustratos no esterilizados y por ende menor requerimiento en equipo de proceso, al poseer menor complejidad técnica y económica, los cultivos mixtos son la opción más ventajosa (Yokoi et al. 2001; Wang 2008; Seppälä et al. 2011; Elsharnouby et al. 2013; Ramírez-Morales et al. 2015).

## 2. Metodología

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Ambiental (LBA) de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV), Chile. Esta investigación se desarrolló en 3 etapas: a) Planteamiento de la investigación; b) Desarrollo experimental y recolección de datos; y c) Determinación de los efectos producto de la adición de agentes oxidantes y reductores en la producción de hidrógeno.

### 2.1. Materiales

**2.1.1. Sustrato.** El sustrato utilizado fue glicerol comercial proporcionado por la empresa VIMARONI (Quilpué, Chile).

**2.1.2. Lodos.** El estudio se enfocó en dos tipos de inóculo, procedentes de diferentes lodos. El primero de ellos se conoce como Lodo anaerobio, proveniente de un reactor UASB (lodo granular) a escala industrial de la planta de tratamientos de la empresa “Chile Tabacos”, localizadas en Casablanca, Chile. Por su parte el Lodo aerobio, proviene del tratamiento secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales ubicada en la La Farfana, Santiago de Chile.

**2.1.3. Medio de Cultivo.** El sistema se enriqueció con un medio de alimentación compuesto de los siguientes macro y micronutrientes (en mg l<sup>-1</sup>): NH<sub>4</sub>Cl 900; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2020; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 900;

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 90; FeCl 23; NaCl 90; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 90; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 80; y tampón fosfato (en mgL<sup>-1</sup>) con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13800 y NaOH 1530.

**2.1.4. Agentes oxidantes y reductores.** En este trabajo se manejaron 4 agentes, tres de ellos correspondían con ser agentes oxidantes como el Ferrocianuro de potasio (K<sub>3</sub>[Fe(CN<sub>6</sub>)]), Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y Oxígeno (O<sub>2</sub>), y como agente reductor el Sulfuro de sodio hidratado (NaS·9H<sub>2</sub>O).

## 2.2. Metodología experimental

**2.2.1. Diseño experimental.** En la Tabla 2 se presentan las condiciones del sistema de experimentos, en él se cuenta con el tipo de lodo como factor y los diferentes agentes oxidantes/reductores como niveles.

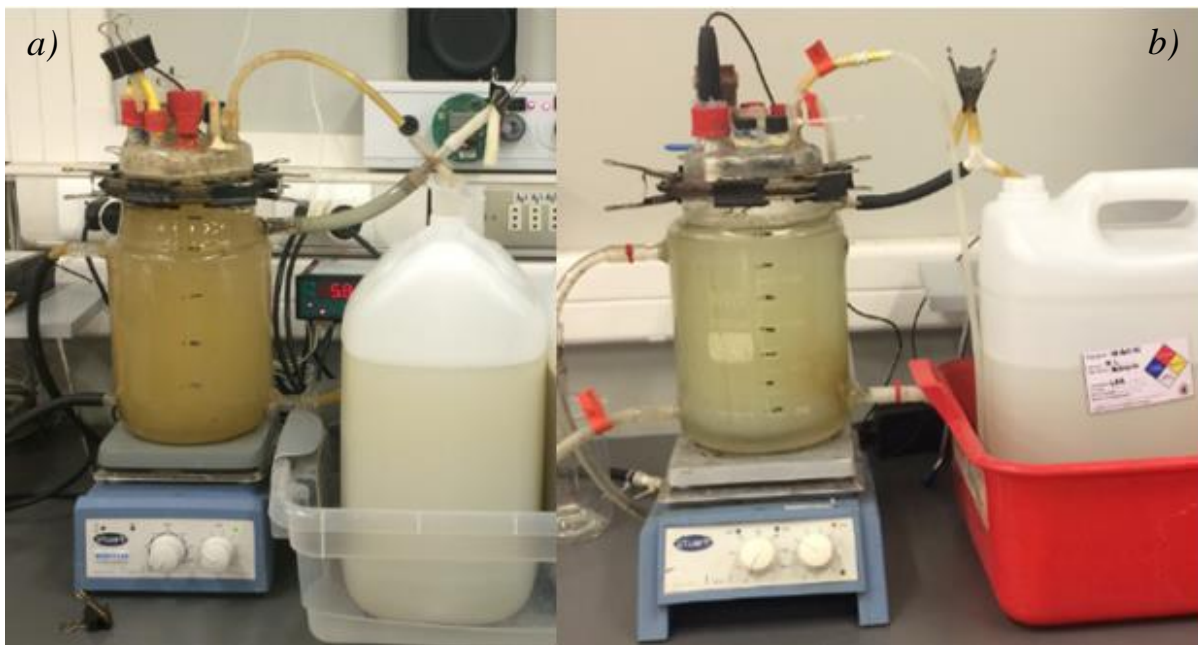
Tabla 2. Tratamientos del sistema

	<i>Tratamiento 1</i>	<i>Tratamiento 2</i>	<i>Tratamiento 3</i>	<i>Tratamiento 4</i>
	<i>K<sub>3</sub>[Fe(CN<sub>6</sub>)]</i>	<i>NaS·9H<sub>2</sub>O</i>	<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	<i>O<sub>2</sub></i>
	<i>Cantidad adicionada de agente</i>			
	<i>[g]</i>	<i>[g]</i>	<i>[ml]</i>	<i>[ppm]</i>
<b>SA</b>	0	0	0	0
<b>C<sub>1</sub></b>	5	1	10	-
<b>C<sub>2</sub></b>	10	5	30	-
<b>C<sub>3</sub></b>	20	10	100	8

SA: Control; C<sub>1</sub>: Concentración baja; C<sub>2</sub>: Concentración media; C<sub>3</sub>: Concentración alta; CA: Con agente

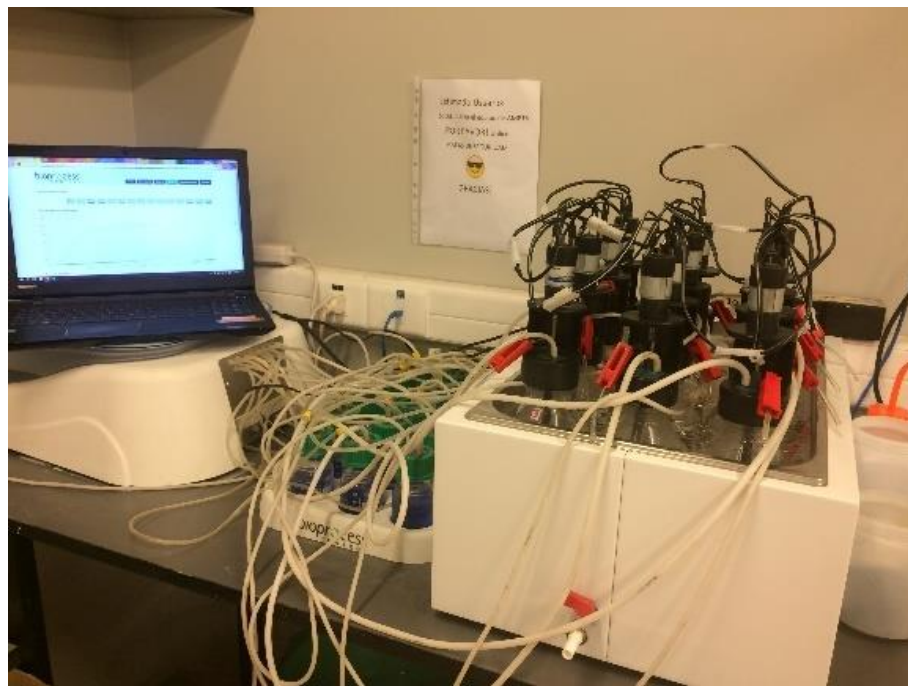
**2.2.2. Montaje experimental.** Los experimentos se efectuaron por triplicado, en botellas schott de 500 mL (300 mL de volumen de trabajo). Se adicionó en orden estricto, medio de cultivo, sustrato, inóculo y agente oxidante, finalmente se afora con agua destilada a 30 mL. Con el objetivo de evaluar los efectos de cada agente en la producción de hidrógeno, se realizó junto con cada experimento un triplicado adicional denominado control, en el cual la cantidad de agente fue sustituida agua destilada.

Los inóculos se obtuvieron a partir de la corriente de salida de un quimiostato de 3 L, operado a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , potencial redox de  $-300\text{ mV}$ , pH de 5,5, tiempo de retención sólidos de 12 h y concentración de biomasa de  $500\text{ mg}_{\text{SSV}}\text{L}^{-1}$ , para un lodo aeróbico o un lodo anaeróbico inicial. Se centrifugaron 250 mL del efluente, en consecuencia, la biomasa (pellet de la centrifugación) se adicionó en cada botella siendo diluida en agua destilada, la concentración inicial de lodo en cada botella fue de  $417\text{ mg}_{\text{SSV}}\text{L}^{-1}$  (patente 201402319, INAPI, Chile)(Tapia-Venegas et al. 2015).



*Figura 2.* Reactores CSTR proveedores de inóculos a) Lodo Aerobio b) Lodo Anaerobio

Las botellas se colocaron en un equipo Automatic Methane Potential Test system (AMPTs) (ver Figura 3). Se gasearon con nitrógeno durante 2 minutos para garantizar condiciones de anaerobiosis y posteriormente se cerraron sus válvulas. La temperatura se controló a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se mantuvo agitación intermitente cada 30 s. El tiempo de operación de cada fermentación lo estableció el termino en la producción de gas, usando como parámetro las curvas de acumulación de gas entregadas por el equipo AMPTs (Ver Anexo D).



*Figura 3.* Equipo AMPTs

Se cuantificó la variación del potencial redox y pH, medidos el día de montaje de las botellas (Día cero) y el día de finalización de producción de hidrógeno (Día final), adicionalmente se almacenaron muestras de cada botella (8 mL) correspondientes a ambos días, para posteriores análisis de concentración de materia orgánica, metabolitos y glicerol.

### 2.3. Métodos analíticos: Parámetros físico-químicos

El ORP y pH por un electrodo (Hanna Instruments). La materia orgánica fue determinada a través del método de demanda química de oxígeno (DQO) de acuerdo con los Métodos Estándares #5220 (2012). La biomasa definida por los métodos de SST y SSV se determinó de acuerdo con los Métodos Estándares #2540 D (2012). El caudal de biogás se midió con el equipo AMPTS II (Bioprocess Control, Suecia). La composición de biogás se determinó mediante cromatografía de gases utilizando Perkin Elmer Clarus 500, equipado con la columna Hayesep Q 4 m x 1 / 8"OD (VICI, Bandera, TX, US). Finalmente, la concentración de glicerol y metabolitos tales como ácidos grasos volátiles (AGVs) y etanol, se cuantificaron usando HPLC (columna Biorad HPX-87H, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.).

### 2.4. Parámetros para cuantificar la producción de hidrógeno

**2.4.1. Rendimiento de hidrógeno.** Para cada variante experimental se determinó el rendimiento de sustrato en hidrógeno. A partir del volumen acumulado de gas proporcionado por la interfaz del AMPTs, que al ser comparado con un estándar se determinó la cantidad que correspondía a hidrógeno, se calcularon las moles de hidrógeno. Se definió el glicerol consumido a partir del análisis de HPLC, con el peso molecular del glicerol se calcularon los moles consumidos. El rendimiento se evaluó mediante la siguiente expresión:

$$Rendimiento_{H_2} = \frac{moles_{producidos\ de\ H_2}}{moles_{glicerol\ consumido}}$$

Ecuación 3.1

### 3. Resultados y discusión

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en la investigación, se evaluaron tres efectos, producción de hidrogeno, producción de metabolitos y variables ambientales. Los resultados se presentan como las variables de respuesta para cada efecto.

#### 3.1. Efecto de agente oxidante/reductor en la producción de hidrógeno y remoción de glicerol

En la Tabla 3 se muestran los rendimientos de hidrógeno obtenidos para cada ensayo, estos estuvieron entre 0 a 0,9 moles<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glicerol</sub> dependiendo del agente adicionado.

Los ensayos con K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] como agente, presentaron el mayor tiempo de latencia en comparación a los demás agentes (Ver en Anexo D), así mismo el rendimiento de hidrógeno fue inferior a 0,04 mol/mol. Por otro lado, los ensayos con NaS·9H<sub>2</sub>O tuvieron rendimientos entre 0 a 0,29mol/mol siendo siempre inferiores a la producción del control (sin adicción de agente). La mayoría de los ensayos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, presentaron rendimientos de hidrogeno mayores con respecto al control entre 0,26 a 0,9 moles<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glicerol</sub>, tuvieron tiempos de latencia casi despreciables y generalmente presentaron los mayores porcentajes de degradación de sustrato glicerol sobre 95% superando a la degradación en el control.

Tabla 3. Resultados de cuantificación de H<sub>2</sub> producido

Medición del Experimento	<i>Agente</i>										
	<i>K<sub>3</sub>[Fe(CN<sub>6</sub>)]</i>				<i>NaS·9H<sub>2</sub>O</i>			<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>		<i>O<sub>2</sub></i>	
	<i>Control</i>	<i>Baja</i>	<i>Media</i>	<i>Alta</i>	<i>Baja</i>	<i>Media</i>	<i>Alta</i>	<i>Baja</i>	<i>Media</i>	<i>Alta</i>	<i>Alta</i>
	<i>Concentración de agente</i>										
	<i>Lodo aerobio</i>										
<b>Rendimiento de H<sub>2</sub></b>	0,34±	0,04±	0,03±	0,10±	0,29±	0,00±	0,00±	0,43±	0,44±	0,90±	0,49±
<b>[mol<sub>H<sub>2</sub></sub>mol<sup>-1</sup><sub>glicerol</sub>]</b>	0,05	0,01	0,01	0,00	0,06	0,00	0,00	0,03	0,13	0,04	0,09
<b>Degradación de glicerol [%]</b>	82,07	73,93	74,61	81,03	88,16	0,00	0,00	95,19	97,43	75,62	93,65
	<i>Lodo anaerobio</i>										
<b>Rendimiento de H<sub>2</sub></b>	0,28±	0,04±	0,02±	0,00±	0,08±	0,00±	0,00±	0,35±	0,26±	0,89±	0,72±
<b>[mol<sub>H<sub>2</sub></sub>mol<sup>-1</sup><sub>glicerol</sub>]</b>	0,08	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,04	0,07	0,06	0,13
<b>Degradación de glicerol [%]</b>	77,72	80,91	75,07	0,00	63,86	0,00	0,00	96,04	96,55	99,41	73,90

En comparación con ambos lodos, se observa un mayor rendimiento de hidrogeno para el lodo aerobio que el anaerobio (alrededor de un 18% más) y a su vez el efecto de los agentes oxidantes  $H_2O_2$  y  $O_2$  alcanza mayores rendimientos con lodo aerobio, aunque en algunos casos casi no hay diferencia (concentración  $H_2O_2$  alta).

Los rendimientos para la producción de  $H_2$  obtenidos en los experimentos se encuentran dentro de los reportados por la literatura tal como se muestra en la Tabla 3, siendo 0,04 y 0,9  $mol_{H_2}/mol_{glicerol}$  el mínimo y máximo alcanzado. Se logró alcanzar un rendimiento máximo de 0,9  $mol_{H_2}/mol_{glicerol}$ , este rendimiento fue alcanzado por Varrone et al. (2013) para un lodo activo procedente de una planta de tratamiento de aguas, con  $15\text{ gL}^{-1}$  de glicerol y un enriquecimiento del inóculo como tratamiento, en consideración la adición de  $H_2O_2$  supera el enriquecimiento del inóculo frente a la alimentación de sustrato. Tanto el  $H_2O_2$  como el  $O_2$ , exhiben rendimientos superiores a  $0,45\text{ mol}_{H_2}/mol_{glicerol}$ , siendo mayores que los alcanzados con estudios en los que se llevó a cabo un tratamiento del inóculo con shock térmico o con bajos TRH, indicativo de que la adición de agentes oxidantes favorece el proceso de producción de  $H_2$  en un proceso por lotes.

### **3.2. Efecto de agente oxidante/reductor en la producción de metabolitos**

Los metabolitos producidos en los ensayos se exhiben en las Figuras Figura 4 y Figura 5, donde las concentraciones de metabolitos obtenidos se presentan en unidades de  $g_{DQO}L^{-1}$  para realizar su comparación.

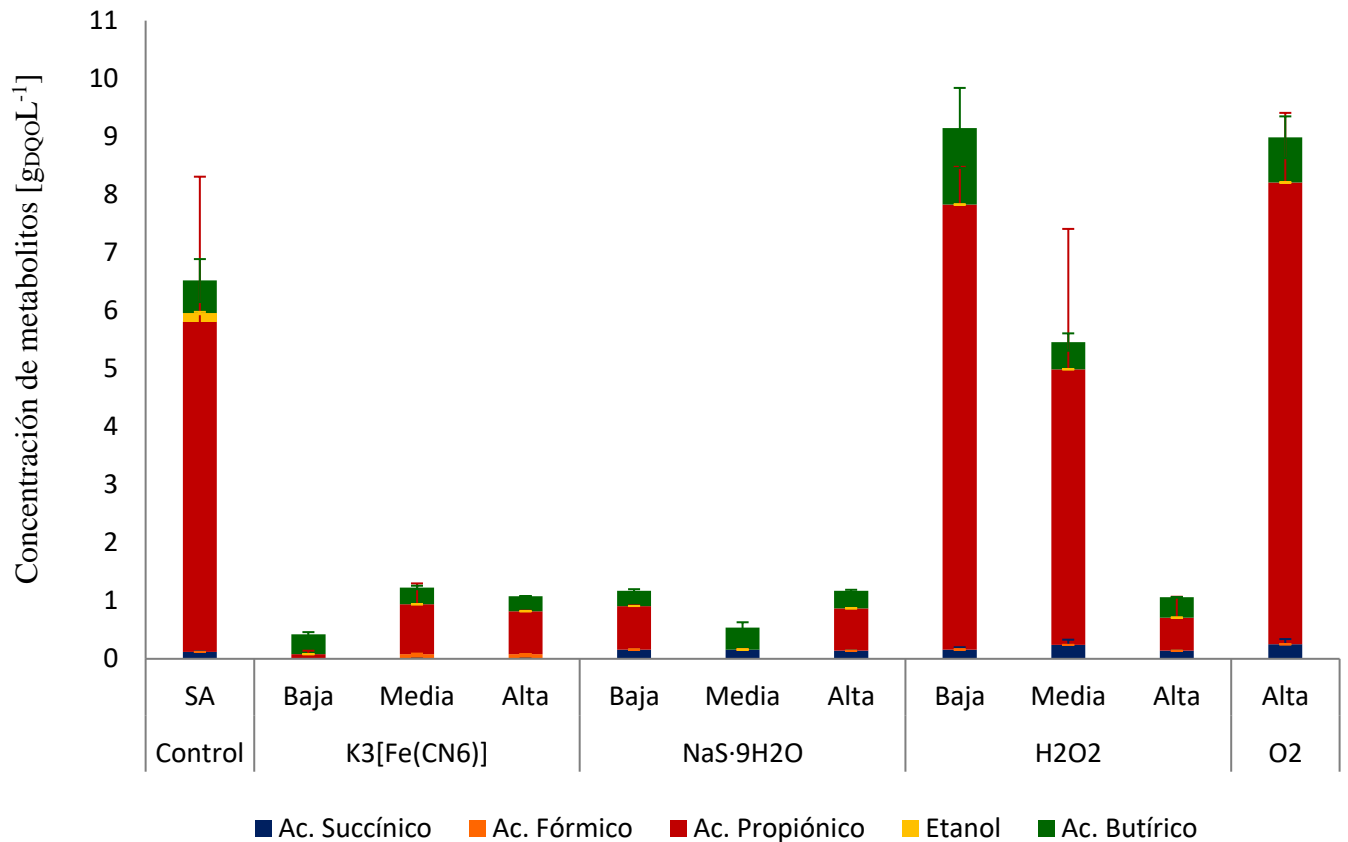


Figura 4. Concentración de metabolitos para inóculo de lodo aerobio.

La adición de los agentes pretendía direccionar las vías metabólicas para favorecer la producción de un metabolito en mayor concentración, la concentración de metabolitos estuvo en un rango de 0 a 7,96 gDQO/L.

En el control se observó la producción principalmente de ácido propiónico, ácido succínico, etanol y ácido butírico, en cambio en la mayoría de los ensayos con adición de agentes oxidantes se mantuvo la producción de ácido propiónico, succínico y butírico, pero se inhibió la

producción de etanol eliminando así la vía solvatogénica de cultivos mixtos. Al comparar los metabolitos se determina que la producción de ácido fórmico se considera despreciable ante los demás ácidos.

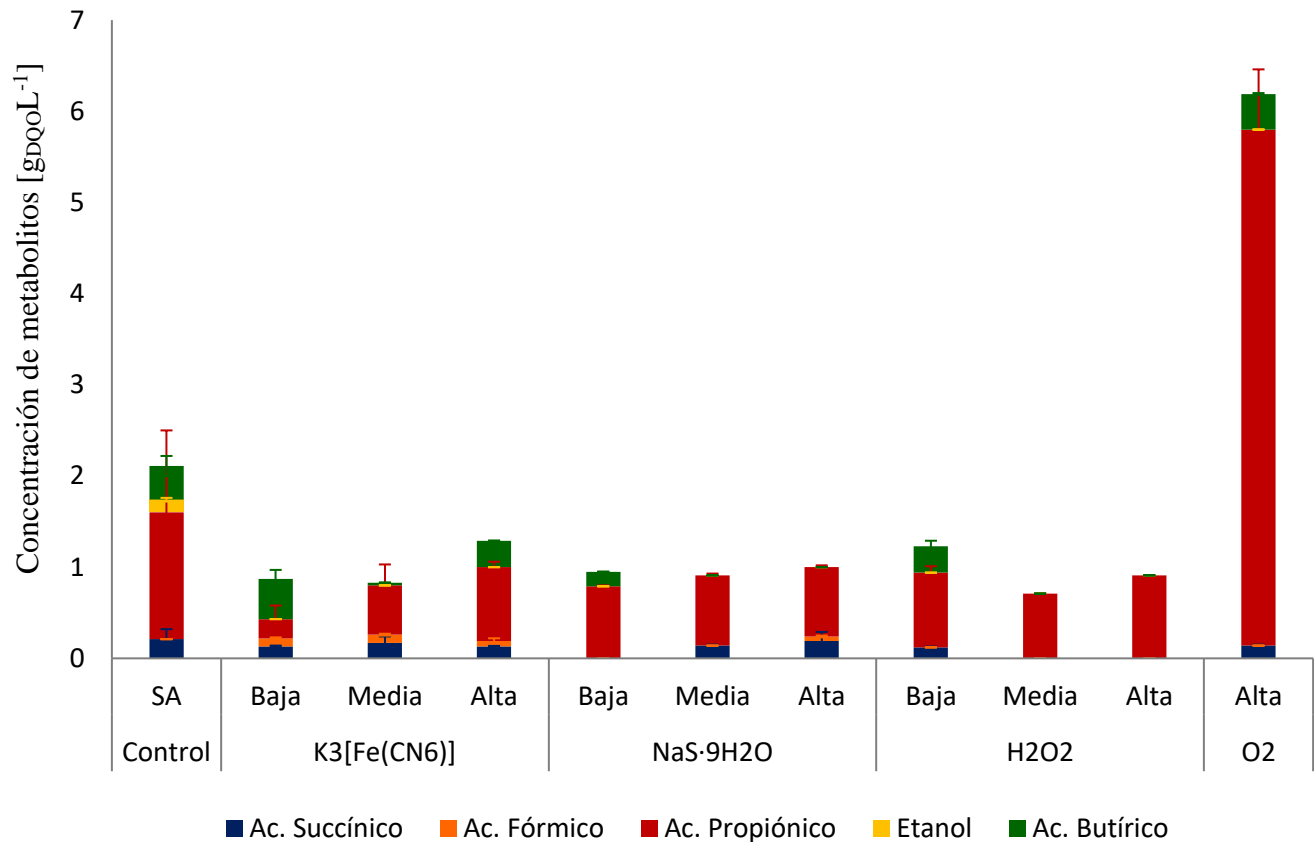


Figura 5. Concentración de metabolitos para inóculo de lodo aerobio.

Específicamente, para el experimento con inóculo de lodo aerobio y adición de agente K<sub>3</sub>[Fe(CN<sub>6</sub>)] no se obtuvo producción de ácido succínico. Para los experimentos con inóculos de lodo anaerobio con adición de NaS·9H<sub>2</sub>O o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se favorece la producción de butiratos, lo que se podría correlacionar con el bajo rendimiento de hidrógeno obtenido para estos ensayos.

Finalmente, la producción de ácido propiónico se destaca como la mayor para todos los ensayos, sobresale que para la experiencia con inóculo aerobio y O<sub>2</sub> como agente se encuentra la mayor producción de dicho metabolito siendo de 7,96 g<sub>DQO</sub>/L, mostrándose que en este caso la vía estaría preferentemente direccionada a este metabolito.

La literatura que reporta los metabolitos producto de la fermentación para producción de hidrogeno se presentan en las Tablas 1 y 4. A diferencia de la mayoría de los estudios realizados, el tratamiento de adición de agentes oxidantes y reductores elimino la vía solvatogénica de los cultivos mixtos. Únicamente se tenía reporte para cultivos puros con *E. coli* y *Corynebacterium crenatum* en los que se obtuvo succinato como metabolito, en esta investigación se obtuvo el mismo metabolito en cultivos mixtos, con esto se cree que se favoreció en especial el crecimiento de alguno de dichos microorganismos dentro del cultivo mixto (Ver Tabla 1 y Tabla 4).

*Tabla 4.* Rendimientos de hidrógeno para fermentación con glicerol informados en la literatura. Las principales condiciones de operación y los metabolitos más abundantes también son indicados.

Inóculo	Tratamiento	Condiciones de operación	Concentración de glicerol [gL <sup>-1</sup> ]	Rendimiento de hidrógeno [molH <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> glicerol]	Metabolito	Referencia
<i>Lodo anaerobio y Lodo acidogénico</i>	Bajo TRH	Quimiostato TRH 10 h pH 8,0 T 30°C	4	0,05	Etanol y 1,3 propanodiol	Temudo et al. 2008
<i>Lodo anaerobio</i>	Shock térmico	Batch pH 6,0 T 37 °C	10	0,41	1,3 propanodiol y Lactato	Seifert et al. 2009

<i>Lodo activo de planta de tratamiento de aguas</i>	Enriquecimiento del inóculo	Batch pH inicial 8,0 T 37°C	15	0,9	NR	Varrone et al. 2013
<i>Lodo anaerobio</i>	Bajo TRH	Quimiostato TRH 12 h pH 5,5 T 37°C	6	0,4	Etanol y acetato	Tapia-Venegas et al. 2015
<i>Lodo aerobio</i>	Agente oxidante (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 333 mL L <sup>-1</sup> )	Batch pH inicial 6,3 T 37°C	10	0,9	Ácidos succínico, propiónico y butírico	Este estudio
<i>Lodo anaerobio</i>	Agente oxidante (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 333 mL L <sup>-1</sup> )	Batch pH inicial 6,3 T 37°C	10	0,89	Ácido propiónico	Este estudio
<i>Lodo aerobio</i>	Agente oxidante (O <sub>2</sub> 27 ppm mL <sup>-1</sup> )	Batch pH inicial 6,5 T 37°C	10	0,49	Ácidos succínico y propiónico	Este estudio
<i>Lodo anaerobio</i>	Agente oxidante (O <sub>2</sub> 27 ppm mL <sup>-1</sup> )	Batch pH inicial 6,2 T 37°C	10	0,72	Ácidos succínico, propiónico y butírico	Este estudio
<i>Lodo aerobio</i>	Agente oxidante (K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 67 gL <sup>-1</sup> )	Batch pH inicial 10,4 T 37°C	10	0,10	Ácidos fórmico, propiónico y butírico	Este estudio
<i>Lodo anaerobio</i>	Agente oxidante (K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 17 gL <sup>-1</sup> )	Batch pH inicial 10,5 T 37°C	10	0,04	Ácidos succínico, fórmico, propiónico y butírico	Este estudio
<i>Lodo aerobio</i>	Agente reductor (NaS·9H <sub>2</sub> O 3 gL <sup>-1</sup> )	Batch pH inicial 10,4 T 37°C	10	0,29	Ácidos succínico, propiónico y butírico	Este estudio
<i>Lodo anaerobio</i>	Agente reductor (NaS·9H <sub>2</sub> O 3 gL <sup>-1</sup> )	Batch pH inicial 7,5 T 37°C	10	0,08	Ácidos propiónico y butírico	Este estudio

NR: No reportado.

Adaptado de (Tapia-Venegas et al. 2015).

Los bajos rendimientos de  $H_2$  obtenidos por el agente  $NaS \cdot 9H_2O$  destacan la alteración que dicho agente produce en el sistema, al compararla con la baja producción de butiratos de la experiencia concuerda con estudios anteriores, en ellos se estipula que la producción de butírico es de gran importancia por la correlación directa entre la concentración de butirato y el rendimiento de hidrógeno en estudios realizados con cultivos mixtos, lo que sugiere que el butirato puede ser una principal vía metabólica para producir  $H_2$  (Rafrafi et al. 2013; Guo et al. 2014) conducta que requiere de análisis.

### 3.3. Variables ambientales

Los valores obtenidos de las variables ambientales fueron tabulados por tipo de inóculo, se presentan en la Tabla 5, en ella se encuentran las mediciones de pH, potencial redox y remoción de materia orgánica, como variables de respuesta a cambios notables en el sistema.

**3.3.1. Redox.** Para el control (muestra sin adición de agente oxidante o reductor), el redox obtuvo un máximo de 159,7 [mV] en el día inicial y un mínimo de 123,9 [mV] el día final, lo cual indica que no hay una variabilidad significativa. Con respecto a la adición de agentes, se presenta una disminución promedio del redox en 141,0 [mV] para el  $K_3[Fe(CN)_6]$  y en 210,0 [mV] para el  $H_2O_2$ . Sin embargo, en el caso del oxígeno se obtuvo un incremento promedio de 169,7 [mV]. Los datos de naturaleza negativa obtenidos por el  $NaS \cdot 9H_2O$ , concuerdan con su característica de agente reductor, estos varían desde -153,7 hasta -520,5 [mV].

Tabla 5. Resultados de variables ambientales

Medición del Experimento	Agente										
	$K_3[Fe(CN)_6]$				$NaS \cdot 9H_2O$			$H_2O_2$			$O_2$
	Control	Baja	Media	Alta	Concentración de agente			Baja	Media	Alta	Alta
<i>Lodo aerobio</i>											
Redox inicial [mV]	159,7	355,7	375,1	418,6	-295,7	-421,3	-471,7	290,4	324,2	321,3	174,4
Redox final [mV]	132,3	195,9	246,6	294,7	-386,8	-404,4	-460,1	87,6	250,7	147,9	275,4
pH inicial	6,47	10,49	10,45	10,40	12,08	13,19	13,41	6,44	6,42	6,34	6,47
pH final	5,16	5,07	5,22	6,54	12,20	13,49	13,94	4,49	4,62	5,09	4,55
DQO inicial [gO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> ]	12,0± 6,3	12,9± 1,1	17,3± 4,5	25,3± 3,6	6,2± 0,4	7,9± 0,9	18,6± 5,3	8,6± 0,1	11,3± 2,3	13,7± 0,7	10,53± 1,9
Remoción DQO [%]	34,10	40,41	24,08	3,65	0,00	0,00	0,00	60,38	58,18	67,15	69,07
<i>Lodo anaerobio</i>											
Redox inicial [mV]	151,0	364,6	388,8	412,5	-303,3	-454,8	-520,5	281,9	281,6	295,6	44,6
Redox final [mV]	123,9	197,2	252,0	283,5	-153,7	-461,1	-488,1	81,0	67,5	83,2	82,9
pH inicial	6,47	10,59	10,57	10,52	7,75	13,09	13,82	6,45	6,42	6,33	6,20
pH final	5,16	4,89	4,95	5,85	5,30	13,12	13,76	5,20	6,17	5,45	4,44
DQO inicial [gO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> ]	7,3 ±1,3	4,5± 2,7	1,4± 0,0	21,6± 1,4	8,6± 0,7	16,0± 2,5	14,9± 4,6	9,3± 0,7	8,8± 1,0	12,2± 2,3	8,5± 1,6
Remoción DQO [%]	32,60	40,95	6,00	3,84	19,67	0,00	0,00	93,07	79,62	80,56	20,51

Según (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo 2009), la energía libre de Gibbs necesaria para llevar a cabo las fermentaciones para la producción de  $H_2$  se encuentra alrededor de -300 [kj/reacción], las tomas finales de potencial redox para los agentes oxidantes se encontraron determinados por valores positivos, pero disminuyeron en la mayoría de los casos con respecto a su medida inicial, por tanto se cree que a lo largo del proceso se favoreció la condición estipulada para la fermentación, y en el caso de un proceso en continuo se podría verificar dicha postulación.

**3.3.2. pH.** Se observa que los pHs iniciales para cada ensayo fueron muy diferentes encontrándose entre 6 a 13. El control tuvo un pH inicial de 6,47 y aunque para los ensayos con adición de agentes hubo también un ajuste de pH inicial, la adición del agente modifico el pH en especial para los agentes  $K_3[Fe(CN_6)]$  y  $NaS \cdot 9H_2O$  en donde el pH fue superior a 7,75. El  $K_3[Fe(CN_6)]$  como agente basifica el sistema alcanzando un pH cercano a 10,0. Por otra parte, el  $NaS \cdot 9H_2O$  alcanzo un pH superior a 12,0.

El rango para el cual se favorece el crecimiento microbiano del proceso satisface la condición de pH entre 5,5 y 6,0 necesaria para la producción de hidrógeno (Kothari et al. 2012; Ramírez-Morales et al. 2015). Por otra parte, el  $NaS \cdot 9H_2O$  alcanzo un pH superior a 12,0; de la literatura se conoce que a pHs menores de 4,0 y mayores de 12,0 se inhibe por completo la producción de hidrógeno (Mulin Cai et al. 2004; Bedoya et al. 2007), hecho que se evidencio en la experiencia.

**3.3.3. Materia orgánica.** La medición del DQO facilitó el cálculo del porcentaje de materia orgánica removido del sistema, así como el rendimiento del mismo. En ese sentido, el  $\text{NaS}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  obtuvo un porcentaje de remoción nulo, por su parte el  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  alcanzó una remoción cercana al 30%, lo que coincide con el valor teórico para la producción de  $\text{H}_2$ . Particularmente el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{O}_2$  enseñaron remociones superiores al 30%, dichos resultados presentan inconsistencia en comparación con la literatura, se denota dicho efecto a interferencias en la metodología de medición.

La remoción de materia orgánica de un 30% para el agente reductor  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  coincide con Tapia-Venegas et al. (2015) donde se estipula que la cantidad de DQO recuperada en  $\text{H}_2$  del proceso de fermentación representa sólo un máximo de 33% de la DQO. Por su parte agentes como  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$  no se acercan a dicha consideración, con lo cual se sugiere que estos datos deben ser revisados y por ende no se asumen como válidos para la investigación.

### Conclusiones

- Los agentes oxidantes  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$  favorecen la producción de  $\text{H}_2$  mediante el aumento en el rendimiento con respecto al control, para inóculos de lodo aerobio y anaerobio.
- Los agentes redox eliminan la vía solvatogénica de la fermentación, el mayor metabolito producido es ácido propiónico, alcanzando su mayor concentración con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- Mediante la adición de agentes, el mayor impacto se da en el rendimiento de  $\text{H}_2$  más que en los metabolitos, ya que el DQO no se direccionó a un solo metabolito.

### **Perspectivas**

Producto de este trabajo realizado surgen algunas recomendaciones generales sobre potenciales temas de investigación relacionados con los resultados obtenidos, estas se detallan a continuación:

- Realizar una evaluación económica con el objeto de determinar el mejor agente oxidante entre el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{O}_2$ .
- Para agentes que propicien cambios en el pH inicial, como el caso de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$  y  $\text{NaS}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , se propone restituir nuevamente el pH luego de la adición del agente dentro del rango óptimo de producción de  $\text{H}_2$ .
- Evaluar para un proceso en continuo la aplicación de los agentes como pretratamiento inicial o como adición intermitente al proceso.

### Bibliografía

Aki, H. et al., 2006. Fuel cells and energy networks of electricity, heat, and hydrogen in residential areas. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(8), pp.967–980. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360319905004027>.

American Public Health Association., A.P.H. et al., 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 22nd ed., [American Public Health Assn.].

Andrews, J. & Shabani, B., 2012. Re-envisioning the role of hydrogen in a sustainable energy economy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(2), pp.1184–1203. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.137>.

Asada, Y. et al., 2006. Hydrogen production by co-cultures of *Lactobacillus* and a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), pp.1509–1513.

Bedoya, A. et al., 2007. Aproximación Al Estado Del Arte Biological Production of Hydrogen : a Literature Survey. *Dyna*, pp.137–157. Available at: <http://www.google.com.co/url?sa=t&rct=j&q=producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http://dyna.unalmed.edu.co/ediciones/154/articulos/a14v75n154/a14v75n1>.

Bioprocess Control, 2014. Ampts II. Operation and Maintenance Manual. *Network*. Available at: [www.bioprocesscontrol.com](http://www.bioprocesscontrol.com).

Bisaillon, A., Turcot, J. & Hallenbeck, P.C., 2006. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), pp.1504–1508.

Blanco Londoño, S.A. & Rodríguez Chaparro, T., 2012. Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 20(3), pp.398–411. Available at: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-33052012000300014&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-33052012000300014&lng=en&nrm=iso&tlng=en) [Accessed August 29, 2016].

Castiblanco, C., Moreno, A. & Etter, A., 2014. Impact of policies and subsidies in agribusiness: The case of oil palm and biofuels in Colombia. *Energy Economics*, 49, pp.676–686. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eneco.2015.02.025>.

Chang, J.S., Lee, K.S. & Lin, P.J., 2002. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), pp.1167–1174.

Chen, W. et al., 2005. Fermentative hydrogen production with CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(10), pp.1063–1070. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319904003192>.

Chen, X. et al., 2012. Effects of culture redox potential on succinic acid production by *Corynebacterium crenatum* under anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 47(8), pp.1250–1255. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.026>.

Collet, C. et al., 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(14), pp.1479–1485.

Davila-Vazquez, G. et al., 2008. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives.

*Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(1), pp.27–45. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11157-007-9122-7> [Accessed August 29, 2016].

Edwards, P.P. et al., 2008. Hydrogen and fuel cells: Towards a sustainable energy future. *Energy Policy*, 36(12), pp.4356–4362.

Elsharnouby, O. et al., 2013. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12), pp.4945–4966. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.032>.

Fang, H.H.P. & Liu, H., 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82(1), pp.87–93. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401001109>.

Fedebiocombustibles, 2015. Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia. Available at: [http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar\\_info-titulo-Biodiesel.htm](http://www.fedebiocombustibles.com/v3/estadistica-mostrar_info-titulo-Biodiesel.htm).

Fierro, J., 2011. El hidrógeno: metodologías de producción. *Lychnos*, 6, pp.50–54. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4158108> [Accessed January 19, 2017].

Galadima, A. & Muraza, O., 2016. A review on glycerol valorization to acrolein over solid acid catalysts. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.

García, A.E. et al., 2011. The current status of liquid biofuels in Chile. *Energy*, 36(4), pp.2077–2084. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2010.06.005>.

Gavala, H.N., Skiadas, I. V. & Ahring, B.K., 2006. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*,

31(9), pp.1164–1175.

Guo, X. et al., 2014. Direct, nonoxidative conversion of methane to ethylene, aromatics, and hydrogen. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6184), pp.616–9. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/344/6184/616>.

Hafez, H. et al., 2010. Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(1), pp.81–92. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.051>.

Hussy, I. et al., 2005. Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(5), pp.471–483.

Ishikawa, M. et al., 2006. Development of a compact high-density microbial hydrogen reactor for portable bio-fuel cell system. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), pp.1484–1489.

Ito, T. et al., 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), pp.260–265.

Kothari, R. et al., 2012. Fermentative hydrogen production - An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), pp.2337–2346. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.002>.

Levin, D.B. et al., 2006. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), pp.1496–1503.

Levin, D.B., Pitt, L. & Love, M., 2004. Biohydrogen production: Prospects and limitations to

- practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), pp.173–185.
- Lin, C.Y. et al., 2006. Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochemistry*, 41(4), pp.915–919.
- Liu, C.G. et al., 2013. Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. *Biotechnology Advances*, 31(2), pp.257–265. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.11.005>.
- Liu, C.G., Lin, Y.H. & Bai, F.W., 2011a. A kinetic growth model for *Saccharomyces cerevisiae* grown under redox potential-controlled very-high-gravity environment. *Biochemical Engineering Journal*, 56(1–2), pp.63–68.
- Liu, C.G., Lin, Y.H. & Bai, F.W., 2011b. Development of redox potential-controlled schemes for very-high-gravity ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*, 153(1–2), pp.42–47. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.03.007>.
- Liu, G.G.Z. & Shen, J.J.Q., 2004. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of bioscience and bioengineering*, 98(4), pp.251–256. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16233701>.
- Liu, R. et al., 2014. Effects of redox potential control on succinic acid production by engineered *Escherichia coli* under anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, 49(5), pp.740–744. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.010>.
- Mathews, J. & Wang, G., 2009. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), pp.7404–7416. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.078>.

Mulin Cai, Junxin Liu, \* and & Wei, Y., 2004. Enhanced Biohydrogen Production from Sewage Sludge with Alkaline Pretreatment.

Ntaikou, I., Antonopoulou, G. & Lyberatos, G., 2010. Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), pp.21–39. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12649-009-9001-2> [Accessed August 29, 2016].

Oh, Y.K. et al., 2003. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*, 28(12), pp.1353–1359.

Orecchini, F., 2006. The era of energy vectors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(14), pp.1951–1954.

Pérez García, M. et al., 2002. Digestión Anaerobia Termofílica de lodos de EDAR. *Retema: Revista técnica de medio ambiente*, ISSN 1130-9881, Año n<sup>o</sup> 15, N<sup>o</sup> 90, 2002, págs. 8-24, 15(90), pp.8–24.

Rafrafi, Y. et al., 2013. Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12), pp.4975–4985.

Rahman, S.N.A. et al., 2016. Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, pp.137–162. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032116303756>.

Ramírez-Morales, J.E. et al., 2015. Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Science and Technology*,

71(9), pp.1271–1285.

Redondas Monteserín, V., 2013. Obtención de hidrógeno mediante la fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero.

Redwood, M.D. & Macaskie, L.E., 2006. A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), pp.1514–1521.

Ren, N.Q. et al., 2010. Biological hydrogen production in continuous stirred tank reactor systems with suspended and attached microbial growth. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(7), pp.2807–2813. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.010>.

Rittmann, S. & Herwig, C., 2012. A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production. *Microbial cell factories*, 11(1), p.115. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3443015&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Seppälä, J.J. et al., 2011. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(17), pp.10701–10708.

Shams Yazdani, S. & Gonzalez, R., 2008. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion of glycerol to ethanol and co-products. *Metabolic Engineering*, 10(6), pp.340–351.

Shen, L., Bagley, D.M. & Liss, S.N., 2009. Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(9), pp.3689–3696. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.03.006>.

da Silva, G.P., Mack, M. & Contiero, J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), pp.30–39. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>.

Sreethawong, T. et al., 2010. Hydrogen production from glucose-containing wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of COD loading rate, nitrogen content, and organic acid composition. *Chemical Engineering Journal*, 160(1), pp.322–332. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2010.03.037>.

Tapia-Venegas et al., 2015. Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), pp.761–785.

Tapia-Venegas, E. et al., 2015. Adaptation of acidogenic sludge to increasing glycerol concentrations for biohydrogen production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), pp.8295–8308.

Tapia-Venegas, E., 2014. *Incremento de la producción de hidrógeno a partir de glicerol mediante control biocinético del lodo anaerobio*. Available at: <https://dspace.conicyt.cl/handle/10533/93982> [Accessed August 29, 2016].

Valdez-Vazquez, I. & Poggi-Varaldo, H.M., 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(5), pp.1000–1013.

Wang, A., 2008. Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture—*Clostridium acetobutylicum* X9X9 and *Ethanoigenens harbinense* B49B49. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2), pp.912–917. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319907005952>.

Wong, Y.M., Wu, T.Y. & Juan, J.C., 2014. A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, pp.471–482. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>.

Yokoi, H. et al., 2001. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1), pp.58–63.

Zhang, Z.-P. et al., 2006. Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry*, 41(10), pp.2118–2123.

## **Anexos**

### **Anexo A. Rutas metabólicas para la producción de H<sub>2</sub>**

#### **A1. Glucosa como sustrato**

El proceso inicia con la hidrólisis del sustrato en materiales disueltos más simples, la glucosa es el más ejemplificado. En ese caso, se llevan a cabo una serie de reacciones enzimáticas, donde por medio de la vía metabólica de glucólisis (vía de Embden-Meyerhof) se convierte la glucosa en dos moléculas de piruvato, dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH (Bedoya et al. 2007).

Los estudios estequiométricos en microorganismos productores de hidrógeno, indican que la producción de hidrógeno por vía microbiana está basada principalmente en el metabolismo anaerobio del piruvato formado mediante el catabolismo de diferentes sustratos. La degradación anaerobia del piruvato formado se cataliza por uno de los sistemas enzimáticos, como Piruvato-formiato-liasa (PFL) o Piruvato-ferredoxina-óxido-reductasa (PFOR). Los microorganismos facultativos generan hidrógeno utilizando el sistema PFL, mientras que los anaerobios estrictos lo obtienen utilizando el sistema PFOR (Redondas Monteserín 2013; Ramírez-Morales et al. 2015).

En una de las rutas el piruvato interacciona con el sistema enzimático PFOR produciendo la descarboxilación oxidativa del piruvato, dando lugar a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y acetil coenzima A (Acetil-CoA). Los electrones generados son transferidos a la ferredoxina (Fd) que es reducida (Fd(red)), debido al bajo potencial redox de la Fd(red), una hidrogenasa puede oxidarla generando hidrógeno (Figura A1. Ruta A). Además, dos moles de NAD<sup>+</sup> son reducidos durante la descarboxilación oxidativa del piruvato a NADH, el cual proporciona equivalentes reductores para

la síntesis de hidrógeno en la segunda ruta metabólica (Redondas Monteserín 2013; Ramírez-Morales et al. 2015).

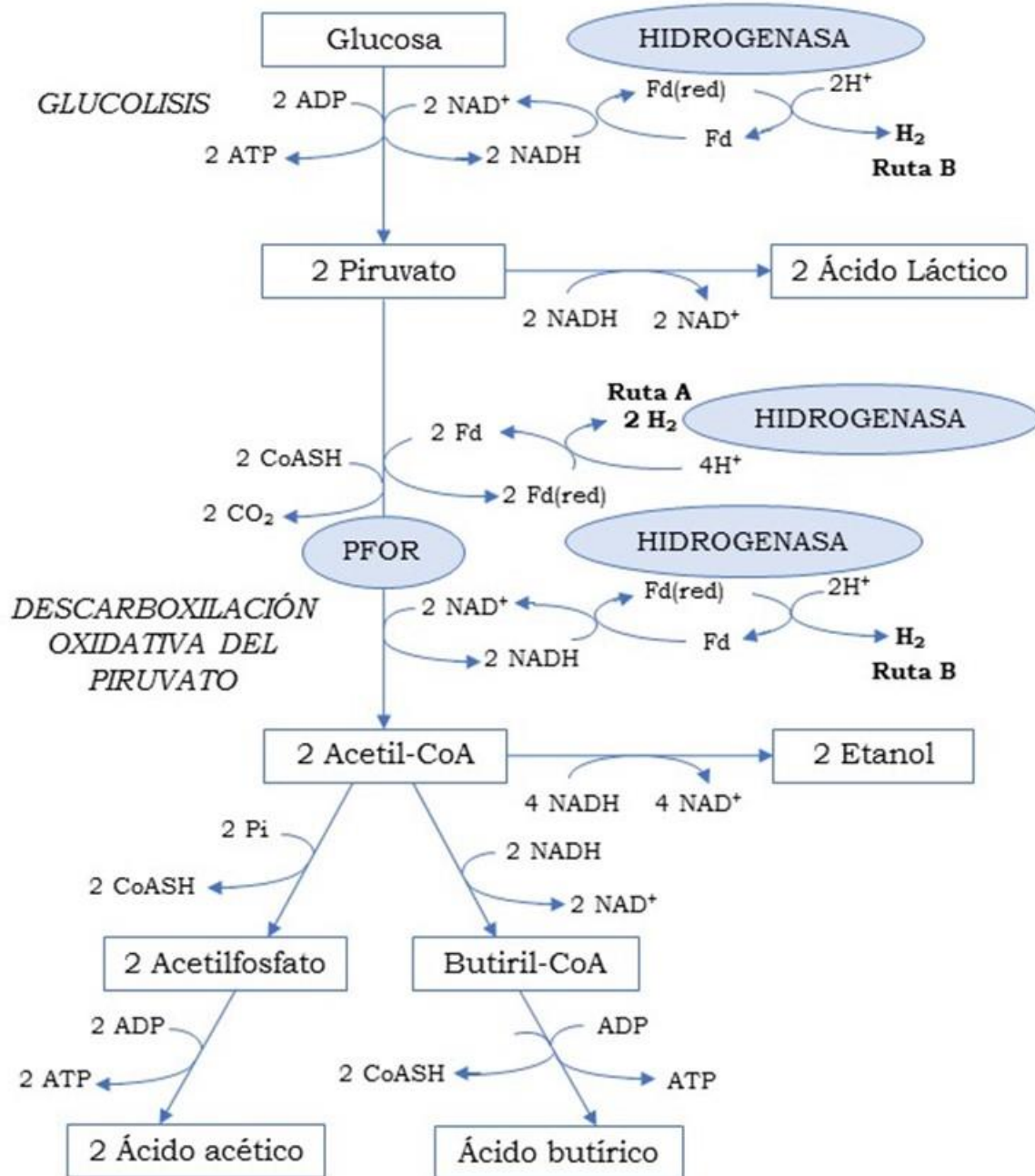


Figura A1. Ruta metabólica para la producción fermentativa de H<sub>2</sub> a partir de glucosa en sistemas

PFOR. Adaptado de (Redondas Monteserín 2013)

Así, en la segunda ruta el NADH formado durante la glucólisis y la descarboxilación oxidativa del piruvato es utilizado para producir hidrógeno por medio de la hidrogenasa (Figura A1. Ruta B), permitiendo a su vez regenerar el NAD<sup>+</sup>, en este paso el NADH es oxidado por la ferredoxina a NAD<sup>+</sup> y de nuevo el hidrógeno puede ser producido por la oxidación de la Fd(red) vía hidrogenasa (Redondas Monteserín 2013; Ramírez-Morales et al. 2015)(Tapia-Venegas et al. 2015; Redondas Monteserín 2013).

La Figura A1 presenta un esquema de las rutas metabólicas para la producción de H<sub>2</sub> en microorganismos anaerobios estrictos con la formación de ácido acético y ácido butírico como productos finales de la fermentación, en él se presentan las dos rutas para el sistema PFOR mencionadas anteriormente.

La Figura A2 da lugar a las rutas metabólicas para la producción de H<sub>2</sub> en microorganismos anaerobios facultativos, como *Enterobacter*, *E. coli* y *Citrobacter*, mediante el sistema PFL la fermentación tiene como productos finales al ácido acético y etanol.

En las bacterias facultativas el metabolismo está bajo el control estricto de la presión de oxígeno, lo que corresponde al sistema enzimático PFL. Muchas de las bacterias, especialmente los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, pueden metabolizar el piruvato en ácido fórmico y otros productos mediante las rutas metabólicas representadas en la Figura A2, para ello el piruvato es convertido en ácido fórmico y Acetil-CoA por la acción del sistema PFL. El ácido fórmico es oxidado a CO<sub>2</sub> por medio del sistema formiato-hidrógeno-liasa (FHL). Este complejo enzimático está constituido por formiato-deshidrogenasa e hidrogenasa permitiendo la producción de hidrógeno. Los rendimientos de producción de hidrógeno en las bacterias facultativas están limitados por la incompleta degradación del ácido fórmico a través del sistema FHL y por la

formación de ácido láctico y etanol para regenerar el  $\text{NAD}^+$  (Redondas Monteserín 2013; Ramírez-Morales et al. 2015).

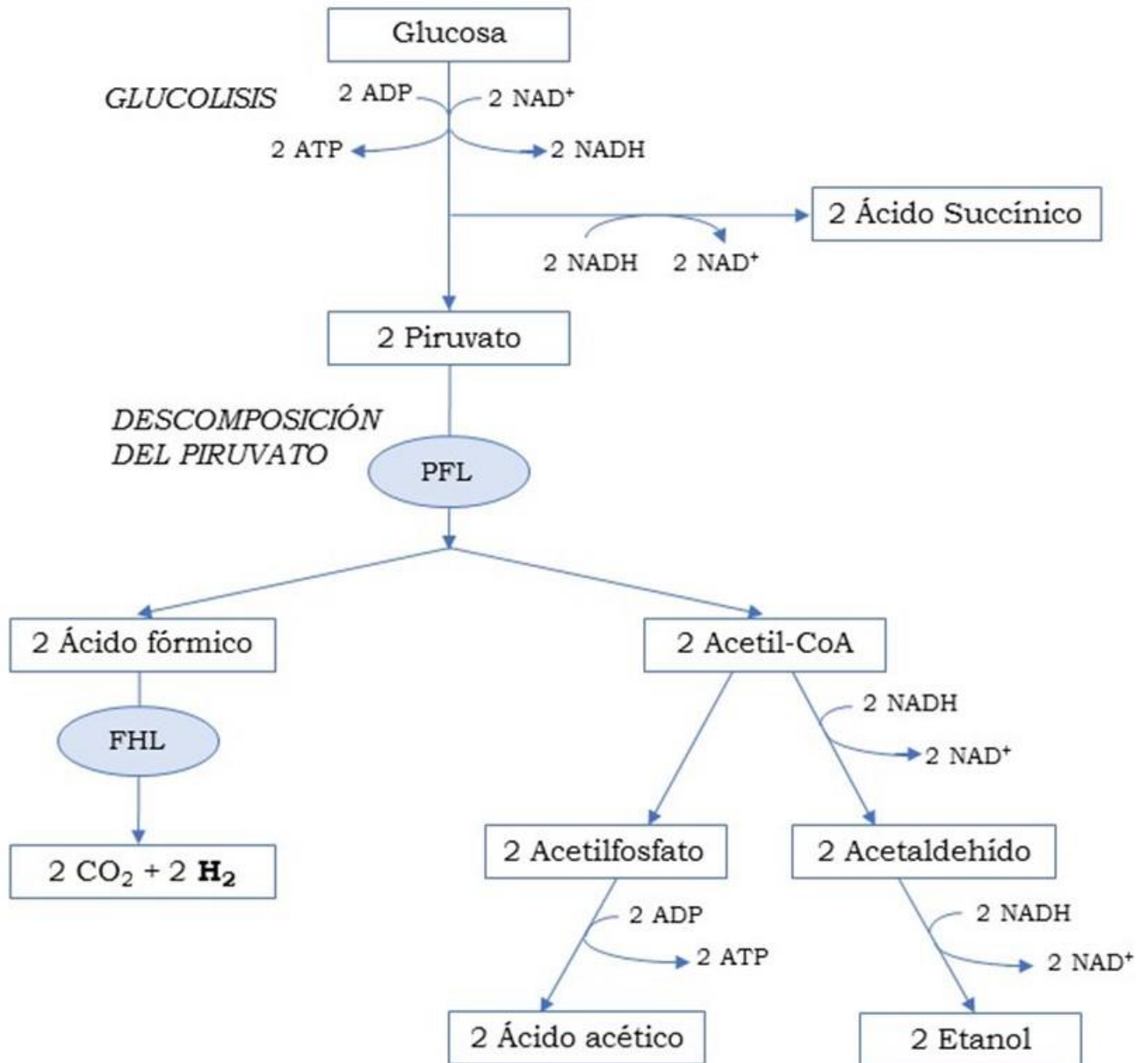


Figura A2. Ruta metabólica para la producción fermentativa de  $\text{H}_2$  a partir de glucosa en sistemas

PFL. Adaptado de (Redondas Monteserín 2013)

Se ha demostrado que la vía del ácido acético permite un mayor rendimiento de H<sub>2</sub> que la del ácido butírico, y al potenciar dicha vía mejora considerablemente su producción. A su vez, para lograr óptimos rendimientos de H<sub>2</sub> se debe evitar la producción de etanol, ácido propiónico y ácido láctico, ya que ellos consumen intermedios bioquímicos hidrogenados tales como el NADH (Redondas Monteserín 2013).

Entonces, esos rendimientos teóricos están basados en el conocimiento de su metabolismo y se puede aumentar mediante el diseño de vías metabólicas que convierten la glucosa en hidrógeno (Mathews & Wang 2009). En la Tabla A6 se presentan tabulados rendimientos de H<sub>2</sub> para ciertos microorganismos según la literatura.

Tabla A6. Rendimiento para diferentes cultivos y sustratos en procesos por lotes y continuos

Microorganismos	Sustrato	Rendimiento H <sub>2</sub>		Autores	
<b>Proceso por lotes</b>					
<b>C u l t i v o s</b>	<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Sacarosa	2.78	[mol H <sub>2</sub> /mol sacarosa]	(Liu & Shen 2004)
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	Almidón	194	[ml H <sub>2</sub> /g almidón]	(Chen et al. 2005)
	<i>Clostridium saccharoperbutyl acetonicum</i>	Suero de leche	2.8	[mol H <sub>2</sub> /mol lactosa]	(Yokoi et al. 2001)
	<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Fibras de madera (DLWs)	1.6	[mol H <sub>2</sub> /mol glucosa]	(Levin et al. 2006)
<b>P u r o s</b>	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>Rodhobacter sp.M19</i>	Residuos de almidón de papa	7	[mol H <sub>2</sub> /mol glucosa]	(Ishikawa et al. 2006)
	<i>E. coli</i>	Glucosa	2.4	[mol H <sub>2</sub> /mol glucosa]	(Bisaillon et al. 2006)
	<i>E. coli</i>	Glucosa	2	[mol H <sub>2</sub> /mol glucosa]	(Aki et al. 2006)

<i>E. coli</i> MC13-4	Glucosa	1.27	[mol H <sub>2</sub> /mol glucosa]	(Redwood & Macaskie 2006)	
<b>Procesos en continuo</b>					
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Medio comercial	0.0574	[mol H <sub>2</sub> /mol sustrato]	(Collet et al. 2004)	
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC8244	Glucosa	0.9	[mol H <sub>2</sub> /mol glucosa]	(Zhang et al. 2006)	
<b>Proceso por lotes</b>					
C u l t i v o s  M i x t o s	Glucosa	1.4	[mol H <sub>2</sub> /mol glucosa]	(Oh et al. 2003)	
	Sacarosa	1.74	[mol H <sub>2</sub> /mol sacarosa]	(Chen et al. 2005)	
	Sacarosa	5.64	[mol H <sub>2</sub> /mol sacarosa]	(Hussy et al. 2005)	
	Sacarosa y desecho de piña	2.46	[mol H <sub>2</sub> /mol sacarosa]	(Asada et al. 2006)	
	<b>Procesos en continuo</b>				
	Sacarosa	1.6	[mol H <sub>2</sub> /mol sacarosa]	(Chang et al. 2002)	
	Sacarosa	4.48	[mol H <sub>2</sub> /mol sacarosa]	(Zhang et al. 2006)	
	Agua residual	3.15	[mol H <sub>2</sub> /mol sacarosa]	(Fang & Liu 2002)	
	Agua residual	1.12	[mol H <sub>2</sub> /mol sacarosa]	(Hussy et al. 2005)	
	Glucosa	2.1	[mol H <sub>2</sub> /mol glucosa]	(Liu & Shen 2004)	
Glucosa	1.9	[mol H <sub>2</sub> /mol glucosa]	(Gavala et al. 2006)		

*Adaptado de (Bedoya et al. 2007)*

### A1.1. Producción de H<sub>2</sub> en la vía metabólica

La generación de acetyl-CoA se presenta a través de dos reacciones, en dicha sección de la ruta metabólica se presenta la producción de H<sub>2</sub>. La primera reacción es catalizada por medio de la enzima Piruvato-ferredoxina-óxido-reductasa, donde el ferredoxín es la coenzima que actúa como receptor de electrones. El acetyl-CoA puede ser metabolizado a acetato o a butirato (Figura A1), en

los dos casos de la reoxidación de cada mol de ferredoxín se genera 1 mol de  $H_2$  con la ayuda de la enzima hidrogenasa (Blanco Londoño & Rodríguez Chaparro 2012).

Si el acetato es el producto final, se genera 1 mol extra de  $H_2$  de la reducción de cada mol de NADH a  $NAD^+$  generando de esta manera una producción de  $H_2$  total de 4 moles  $H_2$ /mol de glucosa consumida. Si el butirato es el producto final, el NADH es empleado para la oxidación del acetyl-CoA a butirato, por tanto, la producción de  $H_2$  será de 2 moles/mol de glucosa consumida. Dependiendo de las condiciones de cultivo, así como del tipo de microorganismos, se puede generar simultáneamente acetato y butirato produciendo entre 2 y 4 moles de  $H_2$ , se ha establecido para cultivos mixtos el rendimiento máximo experimental con butirato como el principal subproducto es de 2,5 mol  $H_2$ /mol hexosa, (Blanco Londoño & Rodríguez Chaparro 2012).

La otra forma de generación de acetyl-CoA conduce a la formación de formiato, la reacción es catalizada por la enzima Piruvato-formiato-liasa, de aquí se obtiene 2 moles de  $H_2$ / mol glucosa consumida (Figura A2) (Blanco Londoño & Rodríguez Chaparro 2012).

## **Anexo B. Metodología experimental**

### **B1. Inóculo para producir hidrógeno**

El estudio se enfoca a dos tipos de inóculo, procedentes de diferentes lodos. El primero de ellos se conoce como Lodo anaerobio, debido a que corresponde con ser un consorcio microbiano proveniente de un reactor industrial que degrada materia orgánica en condiciones anaerobias, los microorganismos se relacionan simbióticamente, metabolizando la materia orgánica en ausencia

de oxígeno a través de etapas sucesivas. En este caso se tomó desde un reactor UASB (lodo granular) a escala industrial de la planta de tratamientos de la empresa “Chile Tabacos”, Chile.

Por su parte el Lodo aerobio, pertenece a un consorcio microbiano proveniente de un reactor industrial que degrada materia orgánica en condiciones aerobias, los microorganismos se relacionan simbióticamente, metabolizando la materia orgánica en presencia oxígeno generando dióxido de carbono y produciendo una gran cantidad de biomasa en comparación con sistemas anaerobios. El lodo proviene del tratamiento secundario de la planta de tratamiento de aguas residuales “La Farfana”, Chile.

### **B1.1. Reactor CSTR**

Para cada una de las experiencias, se realizó el montaje de un reactor en continuo, uno para cada tipo de lodo. Se contó con un reactor de vidrio de aproximadamente 3 litros. Antes de la puesta en marcha, se ejecutó el procedimiento de eliminación de fugas, una vez acondicionado el reactor para prevenir fugas, se adicionan 500 ml de lodo, se afora el reactor hasta 2 litros con medio de cultivo, en la Tabla B1 se presenta la composición del mismo, tanto las condiciones de operación como el medio de cultivo y demás parámetros fueron tomados de Tapia-Venegas et al. (2015). La puesta en marcha del reactor consta de tres etapas:

*Etapa inicial:* El pretratamiento del inóculo consiste en un enriquecimiento aerobio como etapa inicial, se realizó en un cultivo por lotes aireado con el inóculo y medio a 8,2 ppm de oxígeno disuelto (100% OD) (Tapia-Venegas 2014). Se inicia el funcionamiento de la bomba de pH, para controlarlo en 5,5 y se enciende el sistema para mantener la temperatura a 37°C.

Primera etapa: El sistema de producción de hidrógeno con el inóculo tratado, son iniciados con una primera etapa por lotes anaerobia por 24 h, con las condiciones que el medio le proporciona (Tabla B2), pH controlado a 5,5, y temperatura de 37 °C.

*Tabla B1. Medio de cultivo Reactores CSTR*

<b>Nutriente</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Concentración [mg/l]</b>
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	10.000
Cloruro de amonio	NH <sub>4</sub> Cl	1.000
Fosfato de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	100
Cloruro de sodio	NaCl	10
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10
Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	9,4
Cloruro de hierro	FeCl	2,78

*Adaptado de (Tapia-Venegas et al. 2015)*

Segunda etapa: En modo continuo con glicerol a una concentración de 10 g/l, macro y micro-nutrientes (Tabla B1), se ajustaron las condiciones del reactor, estas son presentadas en la Tabla B2.

*Tabla B2. Condiciones de operación Reactores CSTR*

Glicerol	10 g/l
TRH	12 h
pH	5,5
Flujo alimentación	0,17 l/h

El efluente del reactor proporciona el inóculo, para ello se centrifugan 250 ml del mismo a 3500 rpm durante 10 min, se retira el sobrenadante y el inóculo en forma de pellet se retira con agua destilada, para posteriormente ser adicionado en cada schott o vial.

## **B2. Tratamientos**

### **B2.1. Tratamiento 1: Adición de agente oxidante: Ferricianuro de potasio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ )**

Sal de color rojo brillante, soluble en agua, su solución muestra fluorescencia verde-amarilla, se utiliza como agente oxidante en química orgánica, además de como componente base en la preparación del reactivo de Drabkin, utilizado para pruebas cuantitativas de hemoglobina en sangre. Autores como Liu et al. (2014) y Chen et al. (2012), utilizan ferricianuro de potasio como agente oxidante, para la producción de ácido succínico, controlando el ORP del sistema. Se determinó la cantidad de agente necesario para obtener un cambio considerable en el ORP de la experiencia.

### **B2.2. Tratamiento 2: Adición de agente reductor: Sulfuro de sodio hidratado ( $NaS \cdot 9H_2O$ )**

El sulfuro de sodio comercial, es una mezcla concentrada de varias formas hidratadas, se presenta en forma de escamas de color amarillo. Son sales solubles en agua, ligeramente en alcohol e insoluble en éter. Entre sus aplicaciones, se encuentra en la industria de la pulpa y papel en el proceso kraft, en el tratamiento de aguas como un agente eliminador de oxígeno y como un precipitante de metales, para destacar en algunas ocasiones se utiliza como agente reductor en la producción de aminocompuestos. En el estudio realizado por Chen et al. (2012), el sulfuro de sodio

es utilizado como agente reductor, en el control del ORP en la producción de ácido succínico. Debido a sus condiciones físicas (forma de escama), se consideró para su uso realizar una dilución con agua destilada y agitación, antes de ser agregado en cada botella schott.

### **B2.3. Tratamiento 3: Adición de agente oxidante: Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

El peróxido de hidrógeno, o conocido comúnmente como agua oxigenada, es un líquido ligeramente viscoso e incoloro, conocido por ser un poderoso oxidante. Se encuentra en bajas concentraciones en muchos productos domésticos, para usos medicinales y como blanqueador de vestimentas y el cabello. En la industria, se usa en concentraciones más altas para blanquear telas y pasta de papel, y como componente de combustibles para cohetes y para fabricar espuma de caucho y sustancias químicas orgánicas. A diferencia de los agentes mencionados anteriormente, el peróxido de hidrógeno se encuentra en estado líquido, lo que facilitó su aplicación en las botellas.

### **B2.4. Tratamiento 4: Adición de agente oxidante: Oxígeno (O<sub>2</sub>)**

El oxígeno es elemento más abundante en la corteza terrestre, es un gas incoloro e inodoro, conocido como un fuerte agente oxidante. La producción mundial de oxígeno se consume en la producción de acero y en la industria química, adicionalmente, se usa para aplicaciones medicinales, oxicorte, como oxidante en combustible de cohetes y en tratamiento de aguas.

La adición de oxígeno como agente se realizó por medio de una bomba de oxígeno, las ppm de O<sub>2</sub> adicionadas se midieron a través de un sensor de oxígeno disuelto, para este caso el control de agente adicionado pretendía gran desviación en los datos, por tanto se hizo necesario el cambio

estipular una nueva medición de la variable de estudio, con lo cual se limitó el estudio a con oxígeno (saturación 100%) o sin oxígeno (control).

### **B3. Protocolo para montaje de ensayos**

El montaje inicial de cada ensayo se estipuló con el nombre de Día cero, el protocolo llevado a cabo se desarrolló en varias secciones y se realizó de la misma forma para cada práctica, este se presenta a continuación:

#### **B3.1. Montaje previo**

Para realizar el montaje de cada ensayo, se hizo necesario contar con anterioridad con algunos materiales, como es el caso del medio de cultivo (aproximadamente 1200 ml) y el inóculo. Se prepararon 2 litros de medio de cultivo según las especificaciones presentadas en la Figura 5. Para el inóculo, se colocó un bidón en la salida del reactor 24 horas previas al montaje de botellas, con el objeto de recolectar su efluente, el cual proporcionará el inóculo.

**B3.1.1. Montaje de botellas.** En cada uno de los schott, se llevaron a cabo los siguientes pasos en ese orden:

1. Añadir 100 ml de solución de medio de cultivo.
2. Añadir 2,4 ml de glicerol puro.
3. Adicionar inóculo.

4. Añadir agente oxidante/reductor (para el control no aplica).
5. Aforar con agua destilada hasta 300 ml.
6. Nitrogenar la botella por 1 minuto aproximadamente y cerrarla.

### **B3.2. Montaje AMPTs**

Para este tipo de ensayos se hizo necesario la utilización del equipo Automatic Methane Potential Test system (AMPTs II), de la empresa bioprocess CONTROL, su principio de medición está basado en el desplazamiento de volumen, mientras al conjunto realiza la recolección de los datos de manera automática. En la Figura B2 se presenta el equipo AMPTs.

#### **B3.2.1. Incubación (Unidad A)**

Los viales se introdujeron por las rendijas de la Unidad A (Figura B2), estos se incubaron a una temperatura de 37°C mediante un baño María. Antes de ser introducidas, cada botella fue sellada con un tapón de goma, dicho tapón consta de 2 tubos huecos de metal, en uno de ellos se conectó una válvula manual utilizada para adicionar nitrógeno al sistema, asegurando anaerobiosis en el mismo; al otro tubo se conectó una manguera que enlaza el vial con la Unidad de absorción de gas (Unidad B- Figura B2); sobre dicho tapón se coloca una tapa con una varilla de metal agitadora conectada al soporte del motor, con el objeto de agitar en intervalos constantes el contenido de cada schott.



*Figura B2.* Montaje experimental del AMPTs. Adaptado de (Bioprocess Control 2014)

### **B3.2.2. Absorción de CO<sub>2</sub> (Unidad B)**

La Unidad B (Figura B2) cuenta con viales de 100 ml, cada uno de ellos corresponde a cada botella colocada en la unidad de incubación, se agregaron a estos 80 ml de una solución de NaOH 3M, la tapa de cada vial cuenta con dos tubos huecos de metal, uno de ellos conecta la Unidad A con la Unidad B, donde el biogás producido pasa a través de la solución alcalina y el CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S son retenidos, permitiendo que solo el metano y el hidrógeno pasen a la siguiente unidad (Unidad B con Unidad C- Figura B2).

### **B3.2.3. Medición de volumen de gas (Unidad C)**

En la Unidad C (Figura B2), el volumen de metano o hidrógeno es medido a través de un sistema de multiceldas por desplazamiento de volumen de agua y flotación, un pulso digital es generado cuando cierta cantidad de volumen de gas se libera en cada celda. La unidad posee un sistema de

adquisición de datos y una interfaz donde se pueden almacenar temporalmente, monitorear y analizar los resultados. Al finalizar las conexiones de las 3 unidades, y realizar el montaje de todas las botellas, se inició el control del hidrógeno producido, por medio de la interfaz.

## **Anexo C. Metodología analítica: Parámetros físico-químicos**

### **C1. Potencial de óxido-reducción (ORP)**

El potencial redox es una forma de cuantificar si una sustancia es un fuerte agente oxidante o un fuerte agente reductor.

#### *Fundamento*

Dado que los procesos de óxido-reacción implican transferencia de electrones, la medición de la separación de carga resultante puede ser cuantificada por el voltaje medido entre la pareja. El potencial redox, es una forma de medir la energía química de oxidación-reducción mediante un electrodo, convirtiéndola en energía eléctrica, el electrodo usa un metal noble como elemento de medición (American Public Health Association. et al. 2012).

#### *Procedimiento*

##### *Calibración del equipo con solución tampón:*

1. Presionar la tecla CAL del equipo.

2. Lavar el electrodo con agua destilada (AD), secarlo cuidadosamente con papel absorbente, introducirlo en la solución tampón y esperar a que el valor se estabilice en la pantalla, oprimir CRM.

3. Retirar el electrodo, enjuagarlo con AD y secarlo.

*Determinación del ORP de la muestra:*

1. Introducir el electrodo en la muestra a analizar y anotar el primer valor que aparezca en la pantalla.

2. Registrar el dato, sacar el electrodo, enjuagarlo con AD, secarlo y transcurridos 30 segundos se introduce nuevamente, anotando el primer valor indicado.

3. Registrar el dato, sacar el electrodo, enjuagarlo con AD, secarlo en la solución de almacenamiento. Apagar y desconectar.

## **C2. pH**

El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una muestra, ésta depende de la concentración de iones de hidrógeno presentes.

*Fundamento*

La medida del pH está dada por la diferencia de potencial existente entre un electrodo indicador de vidrio y un electrodo de referencia, sumergidos en una misma solución, como función lineal del

pH de ésta. La medida de la diferencia es detectada, enviada al sistema de medición y se visualiza en la pantalla del equipo en unidades de pH (American Public Health Association. et al. 2012)

### Procedimiento

#### *Calibración del equipo con soluciones tampón:*

1. Presionar la tecla CAL del equipo.
2. Lavar el electrodo con agua destilada (AD), secarlo cuidadosamente con papel absorbente, introducirlo en la solución de pH 7.0 y esperar a que el valor se estabilice en la pantalla (hasta que la palabra READY aparezca), oprimir CRM.
3. Retirar el electrodo, enjuagarlo con AD y secarlo.
4. Introducir el electrodo en la solución de pH 4.0. Esperar a que el valor aparezca en la pantalla y se estabilice, Presionar CRM. Retirarlo, enjuagar con AD y secar.
5. Introducir el electrodo en la solución de pH 10.0. Esperar a que el valor aparezca en la pantalla y se estabilice, Presionar CRM. Retirarlo, enjuagar con AD y secar.

#### *Determinación del pH de la muestra:*

1. Introducir el electrodo en la muestra a analizar y esperar hasta que el valor aparezca en la pantalla y se estabilice.
2. Registrar el dato, sacar el electrodo, enjuagarlo con AD, secarlo y dejarlo en la solución que está en el recipiente de almacenamiento junto al equipo. Apagar y desconectar.

### C3. Materia orgánica

#### Método DQO (Demanda Química de Oxígeno)

##### Fundamento

La DQO es un método basado en la medición del oxígeno equivalente de la materia orgánica que está presente en la muestra y que es posible de ser oxidada a través de un agente oxidante muy fuerte (dicromato en presencia de ácido sulfúrico). De esta forma para muestras de una fuente específica, el DQO puede ser relacionado empíricamente con el contenido de materia orgánica de las muestras o el carbono orgánico total (American Public Health Association. et al. 2012).

##### Procedimiento

Inicialmente se contaba con dos soluciones para realizar el análisis:

*Solución digestora standard de dicromato de potasio:* Para su preparación, se añadió 4,913 g de  $K_2Cr_2O_7$ , previamente secado a  $103^\circ C$  por dos horas, a aproximadamente 500 ml de agua destilada, 167 ml de  $H_2SO_4$  concentrado y 33.3 g de  $HgSO_4$ . Se disolvió y dejó enfriar a temperatura ambiente, finalmente se diluyó a 1 L.

*Reactivo de ácido sulfúrico (solución catalítica):* Se añaden 5,5 g de  $AgSO_4$  por cada kg de  $H_2SO_4$  concentrado. Se dejó reposar por cinco días, hasta que el  $AgSO_4$  se disolvió totalmente.

Una vez preparadas las soluciones, y contando con la muestra diluida, se adicionó 2,5 ml de la muestra y 1,5 ml de la solución digestora. Posteriormente, se agregó cuidadosamente 3,5 ml de solución catalítica. Se cerraron y agitaron fuertemente los tubos, para lograr una mezcla perfecta de ambas fases. Se colocaron los tubos en el digestor a  $150^\circ C$  por dos horas. Se retiraron los tubos y dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó la medición de la absorbancia de las muestras en un espectrómetro visible modelo 6715, de la empresa JENWAY, se configuró para una longitud de onda de 600 nm. En cubetas de cuarzo se colocó determinada cantidad de muestra, inicialmente se pasó el blanco, con el objeto de calibrar el equipo y posteriormente cada muestra. Se realizó por triplicado para cada alícuota de los schott. El equipo determino la absorbancia de cada muestra en nm, con la curva de calibrado realizado con anterioridad y el factor de dilución de la muestra se determinó la DQO en mg O<sub>2</sub>/l.

#### **C4. Composición de la muestra (Concentración de AGVs, etanol y glicerol)**

##### **Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

###### Fundamento

Los estudios reportados en literatura cuantifican la concentración de AGVs, por medio de cromatógrafos de gases con un detector FID (detector de ionización de flama) o con un HPLC con fase móvil de ácido sulfúrico.

Al igual que los ácidos grasos volátiles, los estudios reportados en literatura cuantifican la concentración de etanol, por medio de cromatógrafos de gases con un detector FID o con un HPLC con fase móvil de ácido sulfúrico, y como patrón interno se utiliza metanol.

En literatura el glicerol se mide por medio de HPLC o kit que mide mediante un método colorimétrico la concentración de glicerol con un rango de detección. En un cromatógrafo de HPLC

las muestras líquidas se inyectan con detector RID (detector de índice de refracción), y continuamente se mide el índice de refracción del efluente.

Para el análisis de HPLC, las muestras líquidas se inyectan a altas temperaturas en el cromatógrafo, produciéndose vaporización de los distintos compuestos presentes, luego estos penetran la columna cromatográfica donde son arrastrados por un gas portador, siendo separados de acuerdo a la afinidad que cada uno de ellos presenta con el relleno de la columna. Como técnica para la cuantificación de los peaks dibujados por el integrador, se seleccionó la del patrón interno. Como patrón interno puede ser usado, dependiendo del tipo de muestra, una mezcla de componentes propios a detectar (American Public Health Association. et al. 2012).

### Procedimiento

#### *Preparación de curva patrón*

Se preparó una solución con agua destilada, de cada uno de los compuestos que se quieren medir, con el objeto de determinar los tiempos de aparición de cada compuesto en el cromatograma, en la Tabla C1 se presentan el tiempo aproximado en el cual se deben encontrar los peaks para cada metabolito en específico.

*Tabla C1. Metabolitos y sus tiempos de retención*

<b>Metabolito</b>	<b>Tiempo [min]</b>
Ácido cítrico	9,4
Ácido succínico	14,1
Glicerol	15,3
Ácido fórmico	16,2
Ácido acético	17,5

1,3 Propanodiol	20,0
Ácido propiónico	20,6
Etanol	24,7
Ácido butírico	25,2

Se realiza una solución patrón de concentración conocida, se adicionan 0,5 g de cada uno de los compuestos descritos en la Tabla C1 y se afora hasta 100 ml con agua destilada. Posteriormente se realizan disoluciones de la solución patrón a concentraciones de 0,5/0,7/0,9/1,125/2,5 g/l, dichas muestras se llevaron al cromatógrafo. Posteriormente, se realizó una curva patrón graficando la relación de las áreas de los peaks versus la concentración del compuesto conocido.

#### *Preparación de muestras*

Las muestras se filtraron con un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ , se rellenaron los viales para cromatografía y se insertaron en el equipo, este lee automáticamente cada una de las muestras.

#### *Preparación del equipo cromatográfico*

Se utilizó el Cromatógrafo Perkin Elmer series 200 HPLC, columna BioRad HPX-87-H, con temperatura de horno 35°C, detector HP1100 RID 45°C con volumen de inyección 20  $\mu\text{l}$ , Fase móvil de 5 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y flujo de 0,5 ml/min. Los pasos llevados a cabo para la manipulación del equipo se resumen en los siguientes ítems, y se deben seguir en su orden estricto:

1. Encender el PC.
2. Corroborar que todas las conexiones expuestas del equipo estén correctamente conectadas.
3. Encender las interfaces.
4. Encender bomba y Autosampler.

5. Colocar la fase móvil previamente desgasificada (se debe hacer con agua miliQ), se pueden usar canal A o B, ya que para esta metodología no se utilizan gradientes, el canal C debe estar siempre sumergido en la fase móvil.

6. Purgar la bomba (se hace cada vez que se cambie la fase móvil).

– Abrir en la bomba el tapón de descarga (girarlo una vez es suficiente) y ponerle una jeringa de 100 mL (sin aguja) para recolectar la fase móvil desechada durante la purga.

– En la bomba se presiona el botón “PURGE”, se selecciona el canal al cual fue conectada la fase móvil (A o B), se regula el flujo de la bomba generalmente a 5 ml/min y se presiona ENTER.

– Cuando en la jeringa se hayan recolectado 20 ml de fase móvil, se detiene la purga en STOP.

7. Colocar la columna

– Se debe procurar que quede bien conectada y dentro del equipo para que pueda estar siempre a la temperatura adecuada de trabajo, en este caso 35°C.

– Comprobar si hay fugas en las conexiones, para esto se debe programar la bomba a 2 ml/min.

– Conectar la salida de la columna al detector correcto, en este caso IR.

8. Encender el peltier y el detector IR.

– El peltier debe ser puesto a la temperatura adecuada, en este caso 45°C y se revisa que los demás parámetros estén bien según polaridad, respuesta, etc.

9. Purgar el detector IR.

– En el detector presionar PURGA.

– Regular la bomba al flujo de trabajo y presionar ponerla a funcionar.

- La purga al detector se hace por 10 min, luego se desactiva.

10. Estabilización del detector IR.

– Todo bien conectado, se deja encendida la bomba al flujo de trabajo hasta que el detector esté estable (1 hora) y se aprecie una línea recta, si no está en cero, en el detector se presiona AUTOZERO.

- Pasado este tiempo el equipo estará listo para usarse.

11. Mientras el detector se estabiliza.

– Colocar las muestras a medir en viales que tengan tapas y septas con apertura, ya que la jeringa de inyección de muestra es de punta redonda y puede romperse si las septas son tradicionales.

– Crear el método de trabajo en el Autosampler ingresando la cantidad de muestras a medir, el volumen a inyectar y el tiempo que se analizará cada muestra.

– En la bomba también se debe verificar que esté correcto el tiempo de análisis de cada muestra, además, se debe colocar la presión máxima de trabajo, la que depende del tipo de columna que se esté usando, en este caso es de 1 200 Psi.

– Cargar el método en el PC, con la cantidad correcta de muestras a analizar (debe coincidir con lo puesto en el Autosampler).

12. Comenzar a medir.

- Corroborar que el detector esté estabilizado.

– Lavar la jeringa de inyección, para esto se debe presionar en el Autosampler FLUSH (durante la medición se esté ejecutando está se lavará automáticamente cada cierto tiempo).

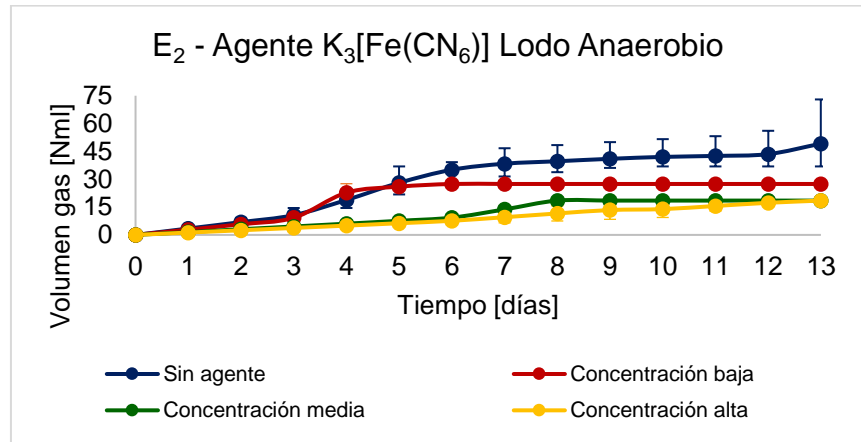
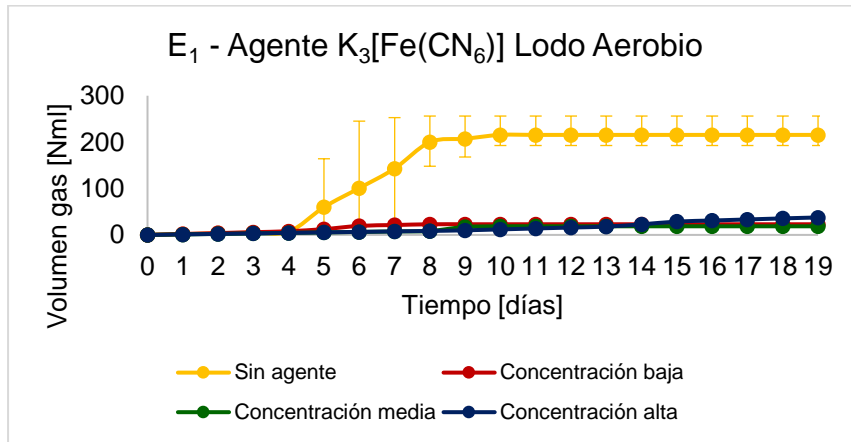
– Cuando este todo listo, bien revisado en el Autosampler se presiona START y el equipo comenzará a medir.



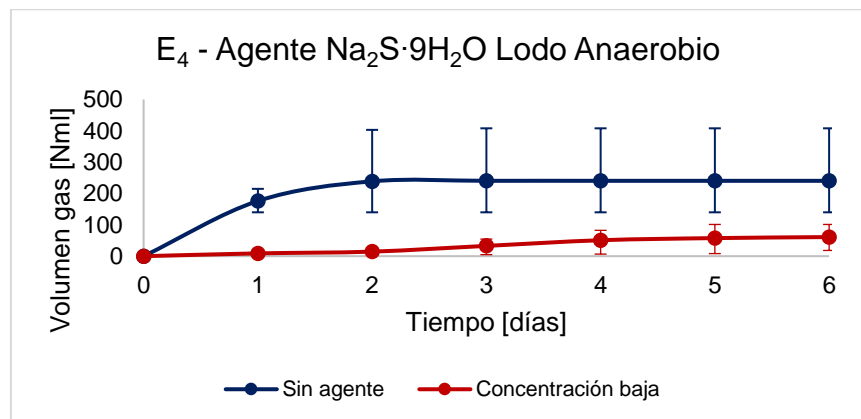
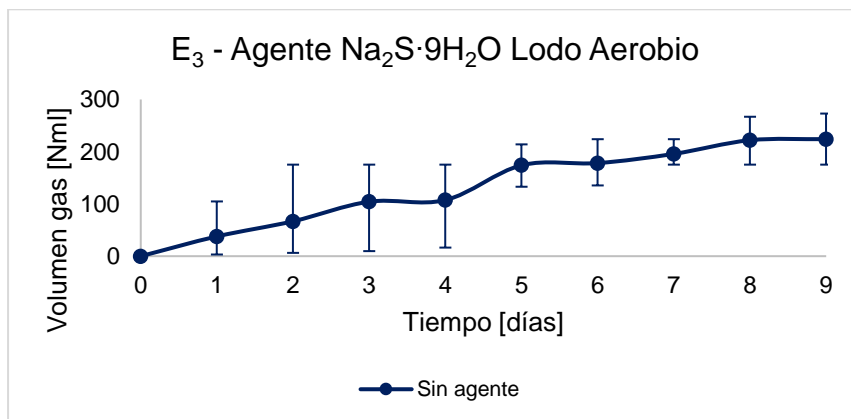
*Figura C1.* Equipo para cromatografía HPLC

**Anexo D. Curva de acumulación de gas (AMPTs)**

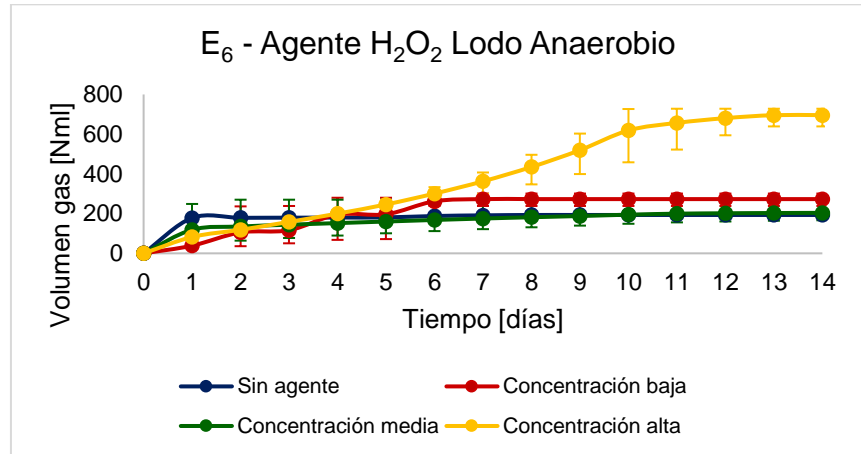
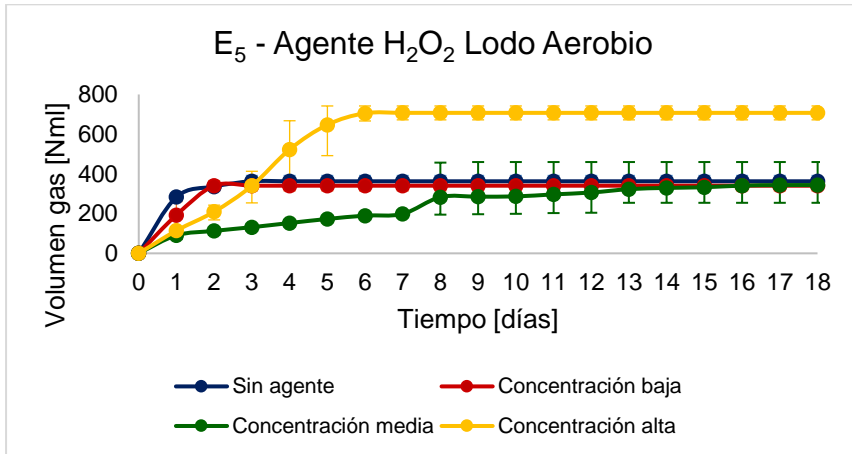
**D1. Tratamiento con agente oxidante: Ferricianuro de potasio ( $K_3[Fe(CN)_6]$ )**



**D2. Tratamiento con agente reductor: Sulfuro de sodio hidratado ( $Na_2S \cdot 9H_2O$ )**



**D3. Tratamiento con agente reductor: Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**



**D4. Tratamiento con agente oxidante: Oxígeno (O<sub>2</sub>)**

