Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Trabajo de Tesis presentado para obtener el título de

Magíster en Biotecnología

Producción de biohidrógeno a partir de suero lácteo utilizando un reactor UASB y un reactor de lecho fijo.

Verónica Perna

Orientador de Tesis: Dra. Claudia Etchebehere

Co- orientador de Tesis: Dra. Liliana Borzacconi

Tribunal:

Dra. Lyliam Loperena, Facultad de Ingeniería, UdelaR.

Dra. M. Bernadete Varesche, Escola de Engenharia de São Carlos – USP, Brasil.

Dr. Marcelo Zaiat, Escola de Engenharia de São Carlos – USP, Brasil.

Financiación: Beca de Maestría Nacional de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)

Montevideo, 2011

Agradecimientos

A todos los integrantes del LPB de la USP de São Carlos de Brasil, por la ayuda dentro y fuera del Instituto.

A los integrantes de la Cátedra de Microbiología del tercer piso de Facultad de Química y del Departamento de Reactores de Facultad de Ingeniería de Montevideo que colaboraron de alguna manera con la realización de este proyecto, en especial a Jorge Wenzel por su tiempo al comienzo de este trabajo.

A los profesores: Claudia Etchebehere, Elena Castelló y Liliana Borzacconi por la oportunidad de trabajar en este proyecto, y de Brasil Marcelo Zaiat y M. Bernadete Varesche por toda la atención y ayuda brindadas.

A mis padres y amigos, entre ellos muy especialmente a María Lucia Micucci de Brasil.

A Carolina Zampol, por toda la ayuda durante mi estadía en Brasil.

A Santiago Álvarez y Emilio Pirotto, por los envíos de suero y la atención ante solicitudes realizadas.

Y a todos aquellos que de alguna forma contribuyeron con la realización de este trabajo.

Resumen

Debido al agotamiento de las fuentes de energía derivadas del petróleo y a la búsqueda de tecnologías más limpias es de interés mundial la investigación y desarrollo de combustibles renovables. Entre éstos el hidrógeno promete ser la base de la futura matriz energética ya que su utilización no genera problemas de emisión de gases de efecto invernadero. Una de las formas de producir hidrógeno es utilizando bacterias anaeróbicas que fermentan sustratos ricos en carbohidratos dando como productos finales H_2, CO_2 y ácidos grasos volátiles. Mediante este proceso es posible obtener un producto con valor agregado a partir de materia orgánica de desechos (por ejemplo de efluentes industriales ricos en carbohidratos). Sin embargo, para que este proceso ocurra es necesario inhibir los procesos que consumen hidrógeno (como la metanogénesis y acetogénesis) y favorecer aquellas fermentaciones que produzcan hidrógeno.

El suero de queso ha constituido un tema de preocupación para el país en lo que refiere a su disposición. Se estima en 300 millones los litros de suero de quesería producidos anualmente en Uruguay. Si bien es un sustrato fácilmente biodegradable, su composición, caracterizada por una alta concentración de carbohidratos y baja capacidad buffer, determina que sea fácilmente acidificable presentando problemas de inestabilidad al aplicar sistemas anaerobios metanogénicos. Una solución a este problema sería realizar el tratamiento en dos etapas una acidogénica en la cual se puede producir hidrógeno y la siguiente metanogénica. El objetivo de este trabajo fue por lo tanto estudiar la posibilidad de obtener hidrógeno a partir de suero de queso crudo generado en una industria láctea de nuestro país. Se estudiaron dos tipos de reactores con retención de células, un reactor UASB y un reactor de lecho fijo.

El reactor UASB fue inoculado con compost sin tratamiento térmico y alimentado con suero de queso crudo a dos cargas orgánicas, de 20 y 30 gDQO /Ld. Los intentos por aumentar la carga a 40 gDQO/Ld fueron fallidos debido a una caída abrupta del pH deteniéndose la producción de gas. La producción de hidrógeno fue muy variable, a la carga de 30 gDQO/Ld se constataron los mayores valores que fueron en promedio 0,7 LH_2/Ld, alcanzando un valor máximo de 2 LH_2/Ld. Con la misma carga orgánica, el rendimiento fue en promedio de 0,7 mol de hidrógeno/mol de lactosa llegando a un máximo de 1,9 mol de hidrógeno/mol de lactosa. Se detectaron principalmente ácido butírico y acético en el efluente, en una relación HAc: HBu de 0,4 en promedio.

Mediante técnicas de biología molecular (T-RFLP y clonado de genes del ARNr de 16S) se observó una comunidad microbiana cambiante dentro del reactor, con predominio de bacterias fermentadoras algunas de ellas productoras de hidrógeno (*Clostridium, Ruminococcus y Enterobacter*) y otros no hidrogenogénicos (*Dialister ,Prevotella, Acetobacter, Bifidobacterium y Lactococcus*). Además se aislaron microorganismos productores de hidrógeno de los géneros *Klebsiella, Proteus y Enterobacter,* y no productores de los géneros *Enterococcus, Chryseobacterium, Leuconostoc y Pseudomonas.*

Para determinar el aporte de los microorganismos que entran al reactor con la alimentación se estudió la comunidad microbiana de una muestra de suero de queso crudo. Los resultados mostraron el predominio de tres organismos afiliados a los géneros *Buttiauxella* (habitual contaminante de la leche) *y Streptococcus* (utilizado como starter en la producción de quesos). Estos organismos fueron detectados en muy baja proporción (menos de un 15%) en las muestras de biomasa del reactor tomadas durante la operación. Sin embargo, el continuo aporte de estos organismos con la alimentación podría ser una de las causas del bajo rendimiento en hidrógeno.

En la segunda parte de esta tesis se operó un reactor de lecho fijo inoculado con suero de queso crudo fermentado por tres días al aire y alimentado con suero de queso en polvo a tres cargas orgánicas de 20, 30 y 40 gDQO/Ld. El incremento en la carga orgánica y el ajuste del pH a valores encima de 5 tuvieron un efecto positivo en la producción de hidrógeno, llegando a valores promedios de 1,1 LH_2/Ld y rendimiento de 0,9 mol de H_2 por mol de lactosa a la máxima carga orgánica aplicada. La producción de hidrógeno fue estable en toda la operación sin detectarse problemas de producción de metano, taponamiento del soporte o producción de alcoholes. Mediante T-RFLP y asilamientos se observó que la biomasa del reactor fue enriquecida en organismos fermentadores productores de hidrógeno (*Clostridium y Klebsiella)* y no productores de hidrógeno (*Enterococcus, Streptococcus, Pseudomonas, Achromobacter, Micrococcus y Lactobacillus).* Estos microorganismos no hidrogenogénicos pueden competir por el sustrato disminuyendo la eficiencia del proceso.

Para evaluar la proporción de bacterias productoras de hidrógeno en la comunidad se determinó el número de copias del gen de la Fe-Fe hidrogenasa/ngDNA mediante PCR en tiempo real. Esta proporción se incrementó durante la operación indicando un enriquecimiento de la comunidad en bacterias productoras de hidrógeno. La mayor proporción se obtuvo cuando la carga fue de 40 gDQO/Ld, coincidente con el incremento en la producción de ácido butírico e hidrógeno. Se detectaron genes de bacterias productoras de hidrógeno en todo el reactor pero en mayor proporción en las muestras de la biomasa suspendida extraídas del medio del reactor sugiriendo cierta estratificación de la biomasa.

Comparando la operación de ambos reactores, en el reactor de lecho fijo la operación fue más estable que en el UASB, si bien no se llegó a valores puntuales de producción de hidrógeno tan altos. Además tuvo mejor respuesta al incremento de carga lo que sería una ventaja en lo que respecta al tamaño de los reactores y ahorro de agua, lo que hace esta alternativa más económica. Si bien se evitó la persistencia de metano en ambos reactores, se observa la presencia de microorganismos no productores de hidrógeno que compiten con el sustrato disminuyendo el rendimiento. Es necesario entonces más estudios para poder dilucidar las óptimas condiciones para que esta flora competidora se minimice.

Índice

1 Introducción....8
1.1 Situación energética actual. Política energética Nacional....8
1.2 Oferta de energía nacional....8
1.3 El hidrógeno....11
1.4 El suero de queso....13
1.5 Degradación anaerobia de materia orgánica....14
1.6 Fermentación oscura....15
1.7 Bases moleculares de la producción de hidrógeno por fermentación....16
1.8 Producción de hidrógeno en bio-reactores con retención de biomasa....20
1.8.1 Reactor Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)....20
1.8.2 Reactor de Lecho fijo (RLF)....22
1.9 Parámetros operativos relevantes en la producción de hidrógeno....24
1.9.1 Inóculo....24
1.9.2 pH....26
1.9.3 Carga orgánica de entrada....27
1.9.4 Temperatura....28
1.9.5 Producción de hidrógeno utilizando suero de queso como sustrato....29
1.10 Bases de los métodos de biología molecular para estudio de reactores....32
1.10.1 Terminal Restriction Fragment length Polymorphism (T-RFLP)....33
1.10.2 Construcción de bibliotecas de clones y análisis de las secuencias....33
1.10.3 PCR en tiempo real (Real- Time PCR)....35
2 Objetivos generales....38
2.1 Objetivos específicos de la operación del reactor UASB....38
2.2 Objetivos específicos de la operación del reactor de lecho fijo....38
2.3 Preguntas a responder....38
3 Estrategia experimental....39
3.1 Estrategia UASB....39
3.2 Monitoreo del reactor....39
3.3 Estrategia RLF....40
3.4 Monitoreo del reactor....40
4 Materiales y métodos....41
4.1 Operación y monitoreo del reactor UASB....41

4.1.1 Reactor UASB 41
4.1.2 Sustrato 42
4.1.3 Inóculo 42
4.1.4 Análisis 42
4.2 Operación y monitoreo del Reactor de lecho fijo 47
4.2.1 Reactor de lecho fijo 47
4.2.2 Muestreo del reactor 49
4.2.3 Sustrato 50
4.2.4 Inóculo 51
4.2.5 Análisis 52
5 Resultados UASB 59
5.1 Operación del reactor 59
5.1.1 Etapas de operación 59
5.1.2 pH 60
5.1.3 Carga orgánica aplicada 61
5.1.4 Producción de gas 63
5.1.5 Producción de ácidos 66
5.1.6 Correlación entre los ácidos formados y la producción de hidrógeno 69
5.2 Seguimiento de la población bacteriana 72
5.2.1 Análisis de la comunidad microbiana por T- RFLP del gen del ARNr de 16S 72
5.2.2 Biblioteca de clones 74
5.2.3 Fermentación natural del suero (alimentación) durante el almacenamiento 76
5.2.4 Caracterización de los aislamientos 77
5.2.5 Análisis filogenético 79
5.2.6 Biomasa 81
6 Discusión UASB 85
7 Resultados RLF 90
7.1 Operación del reactor 90
7.1.1 pH 90
7.1.2 Remoción de DQO 91
7.1.3 Producción de gas 92
7.1.4 Proporción de hidrógeno en el biogás 92
7.1.5 Velocidad de producción de hidrógeno 93
7.1.6 Sólidos volátiles 94

7.1.7 Productos de fermentación: ácidos grasos y alcoholes 95
7.2 Seguimiento de la población bacteriana 101
7.2.1 Cuantificación del gen de Fe-Fe hidrogenasa mediante Real-time PCR 101
7.2.2 Análisis de la comunidad microbiana por T- RFLP del gen del ARNr de 16S ... 103
7.2.3 Caracterización de los aislamientos 107
7.2.4 Análisis filogenético 109
8 Discusión RLF 111
9 Comparación UASB y RLF 114
10 Conclusiones 117
11 Perspectivas 118
12 Financiación 118
13 Trabajos citados 119
Preparación de los viales 132

1 Introducción

1.1 Situación energética actual. Política energética Nacional

El tema energético es complejo por lo multidimensional. Pueden visualizarse al menos seis aspectos temáticos diferentes a tener en cuenta.
El primero es el geopolítico: el acceso a las fuentes de energía primaria plantea a muchos países una seria dificultad (el 92% de la energía primaria que consume el mundo es en base a petróleo, gas natural, carbón y uranio, materias primas que se encuentran muy desigualmente repartidas a escala mundial). El segundo aspecto es tecnológico: no alcanza con poseer (o importar) el energético primario; también es necesario acceder a la tecnología para transformar la energía primaria en secundaria y útil. El tercero es económico: debido a la demanda mundial creciente, tanto las fuentes energéticas como las tecnologías son cada vez más caras. El cuarto aspecto es ético: el 92% de la energía primaria consumida mundialmente no es renovable; la humanidad está gastando en un par de siglos lo que a la naturaleza le llevó millones de años desarrollar, por lo que su uso debe realizarse de manera responsable. El quinto aspecto es el medioambiental: la producción y el uso de la energía son los principales responsables de las emisiones humanas de dióxido de carbono, el de mayor impacto sobre el cambio climático global (el 60% de las emisiones humanas de dióxido de carbono se generan durante la producción y el uso de la energía). El sexto y último aspecto es el social: el acceso a la energía es muy desigual en el mundo y también dentro de cada país; grandes sectores de la población mundial carece de un acceso adecuado a la energía (unos mil setecientos millones de seres humanos viven, desde el punto de vista energético; como en el siglo XVIII: carecen de electricidad y la única energía a la que acceden es leña que consiguen cerca de sus casas).
Esta característica multivariada y compleja es el origen de las dificultades que atraviesa el mundo en materia de energía. Pero al mismo tiempo, la política energética puede constituirse en un poderoso instrumento para desarrollar un país y promover la igualdad social. Por otro lado, la política energética puede convertirse en una herramienta para promover la igualdad al interior de cada sociedad, impulsando la integración social, promoviendo hábitos de consumo saludable y, en definitiva, para mejorando la calidad de la democracia (MIEM/Banner).

1.2 Oferta de energía nacional

La matriz energética o balance energético nacional sintetiza la información anual de oferta y demanda de energía a nivel nacional, desagregada por fuente y sector de consumo. La Dirección Nacional de Energía elabora y publica anualmente el Balance Energético Nacional, contándose con información desde el año 1965 al 2009 (MIEM/DNE/Estadística).

Si se analiza el abastecimiento de energía por fuente, se observa la gran dependencia del país de las fuentes de energía importadas. En la Figura 1 se observa la estructura de abastecimiento de energía para el año 2009, destacándose la importancia de los hidrocarburos: petróleo y derivados (58,4%) y gas natural (1,4%). La electricidad importada participó en el 2009 solamente con un 3,1%. La oferta propia del país está constituida por la producción de electricidad de origen hidráulico y eólico con un 11% y de biomasa (leña y residuos de biomasa) con un 26,1%. Es muy destacable el crecimiento relativo de la biomasa en el abastecimiento, pasando de un 16 – 19% en los años 2006 y 2007 a un 26,1% en el 2009. Se destaca que el grado de dependencia respecto a los combustibles fósiles es significativo. En cuanto a la participación del gas natural en la matriz energética no ha sido significativa hasta el momento, participando en el 2009 con un 1,4% dados los problemas de su importación desde Argentina, único proveedor actual (MIEM/DNE/Estadística).

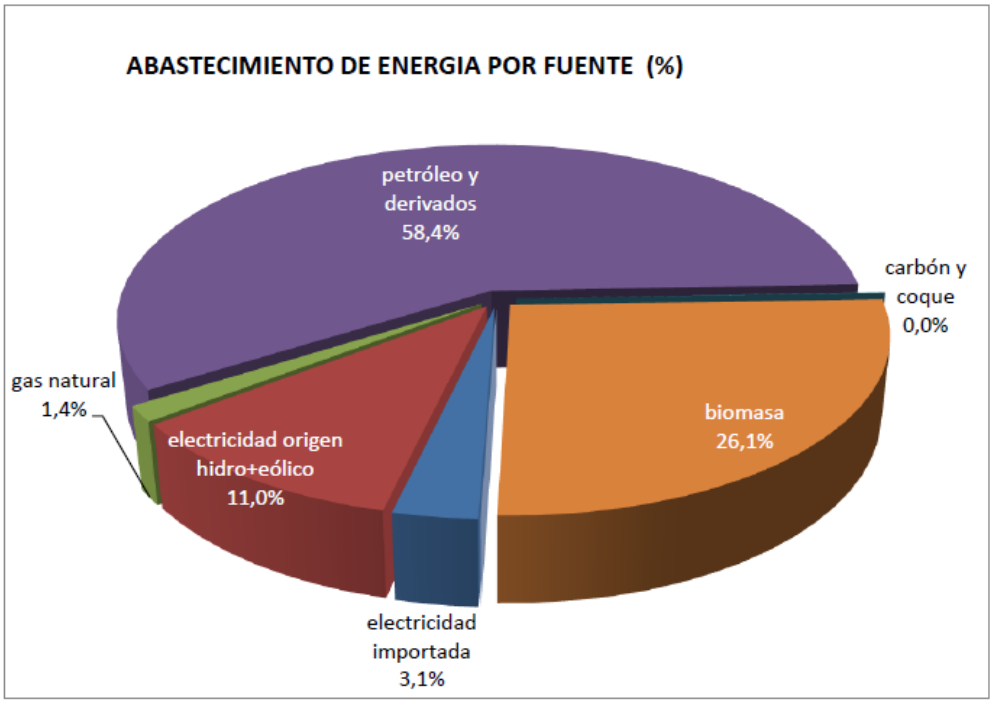

Figura 1- Abastecimiento de energía por fuente (%). Fuente: Balance energético 2009 (MIEM/DNE/Estadística).

Si se analizan las importaciones de petróleo y derivados respecto al saldo de la balanza comercial, se observa que en el año 2009 representaron el 21% del total de importaciones del país y el 25% del total de las exportaciones realizadas ese año. En la figura 2 se observa la evolución de esa participación desde 1970. La dependencia del país en cuanto al abastecimiento de petróleo y derivados desde el exterior y su incidencia en el balance comercial, plantean la necesidad de continuar desarrollando políticas tendientes a atenuar los impactos del consumo de petróleo en la economía (MIEM/DNE/Estadística).

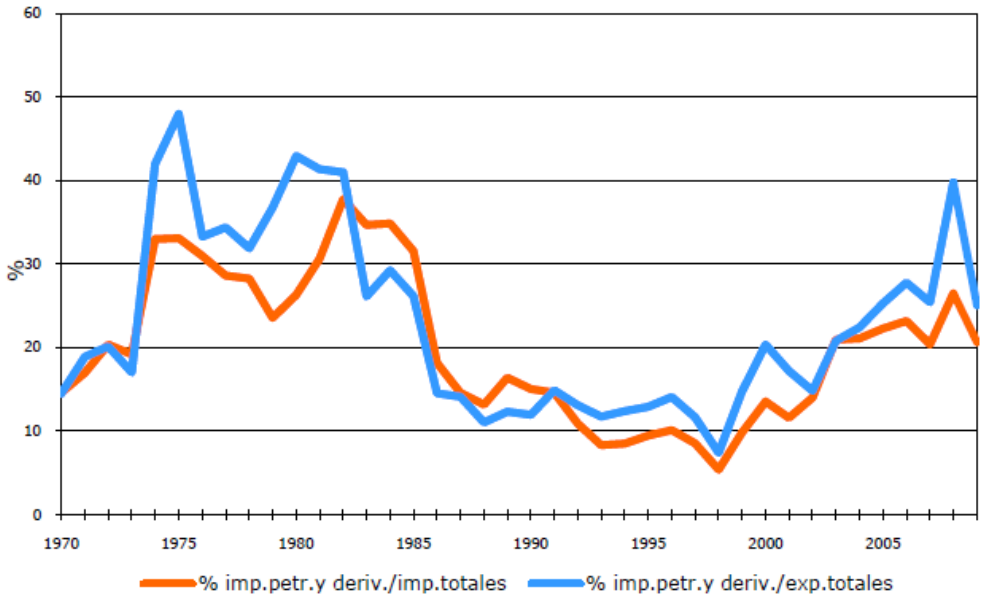

Figura 2- Porcentaje de importación de petróleo y derivados sobre total de importaciones y exportaciones. Fuente: Balance energético 2009 (MIEM/DNE/Estadística).

Esta Tesis se enmarca en un proyecto que combina la producción de un combustible renovable y el tratamiento de un residuo industrial, y por lo tanto es compatible con la política energética que fue presentada por la Dirección Nacional de Energía y Tecnología Nuclear al Poder Ejecutivo y aprobada por el mismo en el año 2008.

El objetivo central de la Política Energética es la satisfacción de todas las necesidades energéticas nacionales, a costos que resulten adecuados para todos los sectores sociales y que aporten competitividad al país, promoviendo hábitos saludables de consumo energético, procurando la independencia energética del país en un marco de integración regional, mediante políticas sustentables tanto desde el punto de vista económico como medio ambiental, utilizando la política energética como un instrumento para desarrollar capacidades productivas y promover la integración social (MIEM/Banner).

Cabe destacar dentro de los objetivos particulares que se encuentran detallados en la Política mencionada, que en el número 9 dentro del ítem "Eje de la Oferta de Energía" se hace referencia directa al hidrógeno:

" 9) Mantener un trabajo permanente de prospectiva tecnológica de manera que el país se encuentre preparado para incorporar nuevas formas de energía (biocombustibles de segunda y tercera generación, hidrógeno, energía undimotriz, energía geotérmica, energía solar fotovoltaica y de concentración, etc.)" (MIEM/Banner).

Para cumplir el objetivo central se han fijado metas en el corto, mediano y largo plazo y como se menciona a continuación se prevén experiencias piloto con nuevas fuentes de energía en el mediano plazo:

"Metas al 2020…

…El país ha desarrollado planes piloto mediante el uso de nuevas fuentes de energía y/o tecnologías en desarrollo." (MIEM/Banner).

Dentro de las líneas de acción se destacan las siguientes de la revisión de diciembre de 2009:

" 19) Diseñar mecanismos que promuevan la utilización industrial de residuos sólidos o líquidos con alto contenido biológico (en tambos, frigoríficos y otras agroindustrias) para generación de biogás a ser utilizado en sus procesos industriales.

25) Profundizar el trabajo de prospectiva energética y tecnológica, para planificar adecuadamente la introducción de nuevas alternativas energéticas para el largo plazo.

27) Mejorar el vínculo entre el sector educativo y los temas energéticos." (MIEM/Banner)

Por todo lo anteriormente expuesto y además de las ventajas asociadas a la producción de combustibles renovables, el presente proyecto se encuentra enmarcado en la Política Energética del Uruguay. Forma parte de una acción conjunta de los diferentes actores nacionales, dirigida a aumentar la eficiencia y la diversidad de la matriz energética, la búsqueda de la disminución de la dependencia del petróleo y la contribución al desarrollo sostenible.

1.3 El hidrógeno

El hidrógeno es un elemento químico ligero, estable y poco reactivo a temperatura ambiente. Se lo puede obtener a partir de agua, en cantidades casi ilimitadas utilizando fuentes de energía renovables como la energía hidráulica, eólica y solar. También se lo puede obtener de sustancias fósiles como el petróleo y gas natural y de alcoholes como el metanol o etanol (CNEA, 2009).

El H_2 es usado como materia prima en la industria química, metalúrgica, electrónica y alimenticia, entre otras (Zittel & Wurster, 1996).

De los diferentes combustibles renovables que se encuentran hoy en investigación y desarrollo, el hidrógeno promete ser la base de la futura matriz energética. Si bien este gas no se encuentra libre en la naturaleza, se puede obtener a partir de compuestos en los que se encuentra combinado. Posee la ventaja de ser una fuente de energía limpia ya que durante su utilización no libera CO_2 (gas de efecto invernadero) y posee una alta densidad energética por unidad de masa, 122 kJ/g (Das & Veziroglu, 2001).

Dicho gas se puede producir a partir de fuentes primarias de energía tales como combustibles fósiles (carbón, petróleo o gas natural), de diferentes intermediarios (productos de refinería,

amoniaco, metanol). A éste se lo suele llamar hidrógeno negro. También puede ser obtenido a partir de fuentes alternativas y renovables (biomasa, biogás, bioalcoholes y materiales de desecho). En este caso se lo llama hidrógeno verde. Finalmente, el hidrógeno azul es el que se obtiene por electrólisis del agua (CNEA, 2009).

En el caso de producción biológica de hidrógeno, se utilizan algas o bacterias dentro de reactores en presencia de luz, o bacterias creciendo por fermentación oscura (Levin, Pitt, & Love, 2004) (Kapdan & Kargi, 2006). Los carbohidratos y algunos desechos de la industria alimentaria son sustratos apropiados para la producción de hidrógeno (Claassen, Budde, van Niel, & de Vrije, 2005) (Svensson & Karlsson, 2005). El CO_2 producido durante estos procesos es carbono neutral ya que forma parte del ciclo del carbono (Hawkes, Hussy, Kyazze, Dinsdale, & Hawkes, 2007).

Como se observa en la Tabla 1 donde se resumen los distintos métodos de producción de H_2 y el estado de desarrollo de cada uno, la mayoría de los métodos de obtención están en la etapa de investigación y desarrollo. Solamente los métodos de reformado de hidrocarburos y de electrolisis del agua están en la etapa comercial (CNEA, 2009).

Tabla 1- Métodos de obtención de hidrógeno (CNEA, 2009).

Proceso de producción de H_2	Estado de desarrollo
Reformado de hidrocarburos con vapor de agua	Comercial
Oxidación parcial de hidrocarburos	Investigación y Desarrollo
Reformado seco de metano	Investigación y Desarrollo
Reformado de alcoholes[1] con vapor de agua	Investigación y Desarrollo
Gasificación del carbón	Investigación y Desarrollo
Electrolisis del agua	Comercial
Ciclos termoquímicos	Investigación y Desarrollo
Procesos electrocatalíticos	Investigación y Desarrollo
Procesos fotoelectroquímicos	Investigación y Desarrollo
Procesos fotobiológicos	Investigación y Desarrollo

Actualmente y para el futuro inmediato la única opción económica viable es la producción de H_2 desde combustibles fósiles. Pero la producción por estos métodos implica derivar hidrocarburos hacia un uso distinto del que tienen actualmente y extiende la dependencia económica de los combustibles fósiles (CNEA, 2009).

La producción de H_2 por reformado de hidrocarburos genera, además, contaminantes y gases de efecto invernadero. A largo plazo el hidrógeno deberá producirse a partir de fuentes renovables de energía, una vez que las tecnologías relacionadas estén completamente desarrolladas y puedan responder a los requerimientos de la demanda energética (CNEA, 2009).

1.4 El suero de queso

El suero de queso ha constituido un tema de preocupación para el país en lo que refiere a su disposición. En los últimos tiempos se ha incorporado la ultrafiltración y la nanofiltración para tratar el mismo. El proceso que sigue el concentrado por ultrafiltración y el de nanofiltración es el secado (secado spray). En ambos casos se obtienen productos en polvo, en el caso de la ultrafiltración se produce WPC (concentrado de proteínas de suero) y en el caso de la nanofiltración DWP (suero en polvo parcialmente desmineralizado) (Castro, 2010).

Se estima en 300 millones los litros de suero de quesería producidos anualmente en Uruguay que está concentrada en algunos departamentos de la cuenca lechera del país.

Tabla 2- Producción de suero en las principales plantas queseras Fuente: Proyecto final de carrera "Obtención de etanol a partir de lactosuero" Cátedra Proyecto industrial- Facultad de Ingeniería, UDELAR- Año 2005.

Planta	Ubicación	Producción m^3/año
Conaprole	San Ramón	70000 (1)
Conaprole	Villa Rodríguez	47500 (1)
Bomprole	Libertad	51000 (2)
Parmalat	Nueva Helvecia	47500 (2)
Helvética	Cardona	16000 (2)
Calcar	Carmelo	21900 (3)
Claldy	Young	29200 (4)
Pili	Paysandú	30200 (5)

(1) Fuente: Conaprole (2)Fuente: Aldo Ibarra (3) Fuente: Calcar (4) Fuente: Claldy (5) Fuente: Pili

En la Tabla 2 se observa la producción de suero de queso en las plantas industriales productoras de queso más importantes en Uruguay en el año 2005, siendo la planta de Conaprole de San Ramón una de las que genera mayor volumen en el país.

La composición en base seca del suero de queso es la siguiente: lactosa 70 – 72 %, proteínas 8 - 10% y sales minerales 12 -15 % (Panesar, Kennedy, Gandhi, & Bunko, 2007). Si bien es un sustrato fácilmente biodegradable, su composición, caracterizada por una alta concentración de carbohidratos y baja capacidad buffer, determina que sea fácilmente acidificable presentando problemas de inestabilidad al aplicar sistemas anaerobios de alta carga (Mallo, 1998). Debido a esto, el tratamiento en dos etapas una primera etapa acidogénica y luego una segunda etapa metanogénica sería el más adecuado. La etapa acidogénica se puede realizar con producción de hidrógeno, obteniendo una fuente de energía en este tratamiento.

Diferentes autores han ensayado el tratamiento en dos etapas con suero de queso (Venetsaneas, Antonopoulou, Stamatelatou, Kornaros, & Lyberatos, 2009), (Cota-Navarro, Carrillo-Reyes, Davila-Vazquez, Alatriste-Mondragón, & Razo-Flores, 2010) concluyendo que esta podría ser una configuración viable para el tratamiento de este efluente. Si bien es necesario realizar más estudios para optimizar los rendimientos.

Debido a la importancia del problema de la disposición de suero de queso para el país y a los antecedentes de problemas de acidificación de reactores metanogénicos se decidió estudiar la factibilidad de producir hidrógeno utilizando suero de queso crudo como sustrato, siendo éste el objetivo principal de esta Tesis.

1.5 Degradación anaerobia de materia orgánica

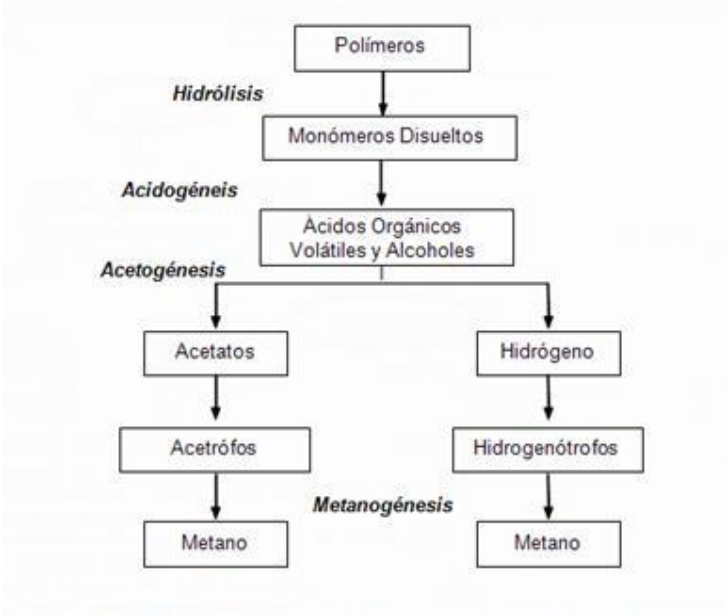

Figura 3- Etapas de la degradación anaerobia de la materia orgánica (extraído de Menes, 2007).

En un sistema de tratamiento anaerobio, en el que se encuentra completa la cadena bacteriana que degrada la materia orgánica, ocurren una serie de reacciones producidas por distintos grupos de bacterias (Menes, 2007). Como se observa en la Figura 3, las etapas son las siguientes:

1) Hidrólisis y fermentación

   Durante la primera etapa se produce la hidrólisis se los polímeros complejos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos) a oligómeros y monómeros (azúcares, aminoácidos, purinas, pirimidinas, ácidos grasos y glicerol). Los monómeros generados pueden ser fermentados por las bacterias fermentadoras primarias a ácidos grasos volátiles, lactato, alcoholes, succinato, etc., algunas de ellas produciendo hidrógeno.

2) Acetogénesis

En esta etapa los alcoholes y los ácidos grasos, producto de la fase de hidrólisis y fermentación, son posteriormente degradados a acetato e hidrógeno y CO_2 por un grupo de bacterias fermentadoras especializadas llamadas fermentadoras acetogénicas. Los ácidos grasos de cadena larga son degradados por un proceso conocido como β- oxidación, en el cual se liberan sucesivamente cadenas de acetato. Si la cadena tiene un número impar de carbonos además de los productos anteriores se genera propionato. Podemos distinguir entre las bacterias acetogénicas dos grupos: las reductoras obligadas de protones o sintróficas obligadas y las reductoras facultativas. Las primeras solo pueden transferir los equivalentes de reducción al hidrógeno, reacción de la cual obtienen muy poca energía. Las reductoras facultativas pueden usar aceptores de electrones alternativos al H^+ cuando la concentración de H_2en el medio es elevada. Un ejemplo de estas son algunas bacterias sulfato reductoras que pueden actuar como sintróficas en ausencia de sulfato (Menes, 2007).

3) Metanogénesis

Finalmente, los productos de la etapa anterior: acetato, H_2/CO_2 pueden ser convertidos directamente por las archaeas metanogénicas a CH_4 y CO_2. Los organismos metanogénicos pertenecen al Dominio Archaea y si bien presentan gran diversidad estructural, están muy relacionadas filogenéticamente (Menes, 2007).

1.6 Fermentación oscura

En este proceso, una variedad de diferentes microorganismos pueden degradar anaeróbicamente sustratos ricos en carbohidratos, obteniendo hidrógeno y otros productos, principalmente ácidos grasos de cadena corta (láctico, acético, butírico, etc.) (Figura 4). La distribución de los productos puede ser diferente dependiendo del microorganismo, del estado de oxidación del sustrato y condiciones ambientales (pH y presión parcial de H_2) (Hallenbeck & Ghosh, 2009).

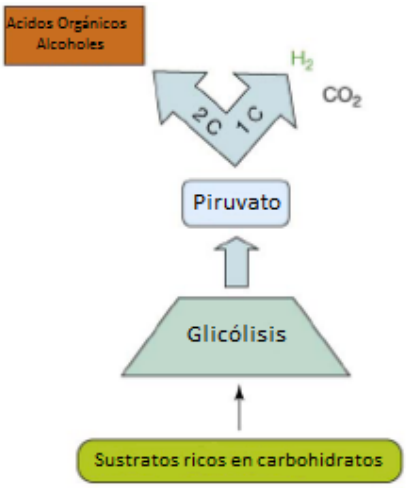

Figura 4- Esquema del proceso de fermentación oscura (Hallenbeck & Ghosh, 2009).

Durante este proceso se busca inhibir la metanogénesis por lo que, en los reactores de producción de hidrógeno se producen solamente las etapas de hidrólisis y fermentación descritas en 1.5, llevadas a cabo por bacterias hidrolíticas y fermentadoras.

Bacterias hidrolíticas y fermentadoras

Se encuentran dentro de este grupo bacterias anaerobias facultativas como las Enterobacterias, bacterias del ácido láctico, y bacterias anaerobias estrictas como organismos de los géneros *Clostridium, Bacteroides*, *Propionibacterium* y *Selenomonas* entre otros.

Las Enterobacterias como *E. coli* tienen la enzima formiato liasa responsable de la generación de H_2 a partir de formiato. Las bacterias del ácido láctico producen a partir de azúcares ácido láctico y ácido láctico y etanol según sean homo o heterofermentativas. Las bacterias del género *Selenomomas* y *Propionibacterium* fermentan el ácido láctico con generación de H_2 y acetato, o acetato y propionato (Soubes, 1994).

1.7 Bases moleculares de la producción de hidrógeno por fermentación

La producción de hidrógeno por microorganismos tiene como base a la enzima hidrogenasa. Esta enzima es de extrema complejidad considerando que lleva a cabo la simple reacción: $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$.

Todas las hidrogenasas conocidas contienen centros metálicos activos y las enzimas activas son sintetizadas por medio de procesos que involucran enzimas auxiliares y pasos de maduración de proteínas. Estos centros metálicos son extremadamente o moderadamente lábiles al oxígeno, por lo tanto muchas hidrogenasas son sensibles al oxígeno y son irreversiblemente

destruidas por exposición al mismo. Hay dos tipos básicos de hidrogenasas denominadas según el sitio activo que contienen: las Fe- hidrogenasas y las Ni- Fe hidrogenasas. Las Ni- Fe hidrogenasas incluyen las que tienen Se también como parte de su sitio activo. Se han encontrado Ni- Fe o Ni- Fe- Se hidrogenasas en microorganismos que toman poder reductor del H_2. Sin embargo, algunos probablemente puedan producir H_2. Un ejemplo de esto sería la hidrogenasa 3 del complejo formiato hidrógeno liasa de las Enterobacterias, la cual, en base a su secuencia es una Ni- Fe hidrogenasa, y está asociada a la producción de hidrógeno (Hallenbeck, 2005).

Las Fe-hidrogenasas en general cumplen la función de remover el exceso de equivalentes reductores producidos durante fermentaciones por bacterias anaerobias estrictas. Varios transportadores de electrones han sido implicados en la reducción de la hidrogenasa, incluyendo ferredoxina y flavodoxina. El NADH también puede servir para reducir la hidrogenasa en algunos casos a través de la acción de la NADH: ferredoxina-oxidorreductasa (Hallenbeck P. C., 2005).

La producción fermentativa de hidrógeno usualmente proviene de la ruptura glicolítica de azúcares, derivando del metabolismo anaerobio del piruvato, que se forma durante el catabolismo de varios sustratos. La ruptura del piruvato es catalizada por alguno de los dos sistemas enzimáticos siguientes:

$$1 - Piruvato + CoA \xrightarrow{PFL} acetil - CoA + formiato$$

$$2 - Piruvato + CoA + 2Fd(ox) \xrightarrow{PFOR} acetil - CoA + CO_2 + 2Fd(red)$$

En ambos casos, el piruvato originado en la glicolisis es usado, en ausencia de oxígeno, para producir acetil- CoA, del cual se puede derivar ATP y formiato o Fd (red) a partir de los cuales se realiza la producción de hidrógeno (Hallenbeck, 2005).

Las bacterias entéricas producen hidrógeno a partir de formiato y los anaerobios estrictos a partir de Fd (red). Los rendimientos globales en este tipo de metabolismos son relativamente bajos, 1 o 2 hidrógenos producidos por molécula de piruvato. Esto se debe a que la consecuencia natural de la fermentación no es producir hidrógeno sino biomasa celular. Una porción del sustrato es utilizado en ambos casos para producir ATP dando como producto acetato que es excretado (Hallenbeck, 2005).

Las bacterias entéricas producen formiato y acetil- CoA a partir de piruvato por la piruvato: formiato liasa (PFL) (Figura 5). El formiato es luego transformado a hidrógeno y CO_2 por el complejo de la formiato: hidrógeno liasa (FHL) en condiciones ácidas cuando la concentración de formiato es alta. La degradación del formiato en la mayoría de las condiciones no se produce completamente obteniendo una cantidad de hidrógeno inferior a la estequiométrica. Otro factor que potencialmente reduce el rendimiento en hidrógeno es el hecho de que la lactato deshidrogenasa es inducida bajo condiciones ácidas y el potencial reductor presente en el piruvato es perdido por su conversión a lactato (Hallenbeck, 2005).

Las bacterias entéricas que llevan a cabo la fermentación ácido mixta producen además otros productos de fermentación como lactato, etanol, acetato, formiato, succinato y butanodiol

(Figura 5), de manera que se obtendrá una mezcla de productos. La proporción relativa de estos productos depende del estado de oxidación del sustrato, que controla la cantidad de productos reducidos de forma de balancear la fermentación regenerando el NAD para la futura glicolisis. El rendimiento máximo de hidrógeno que pueden producir las bacterias entéricas a partir de glucosa es 2 moles de H_2 por mol de glucosa, pero en la práctica solo la mitad de esta cantidad es observada (Hallenbeck, 2005).

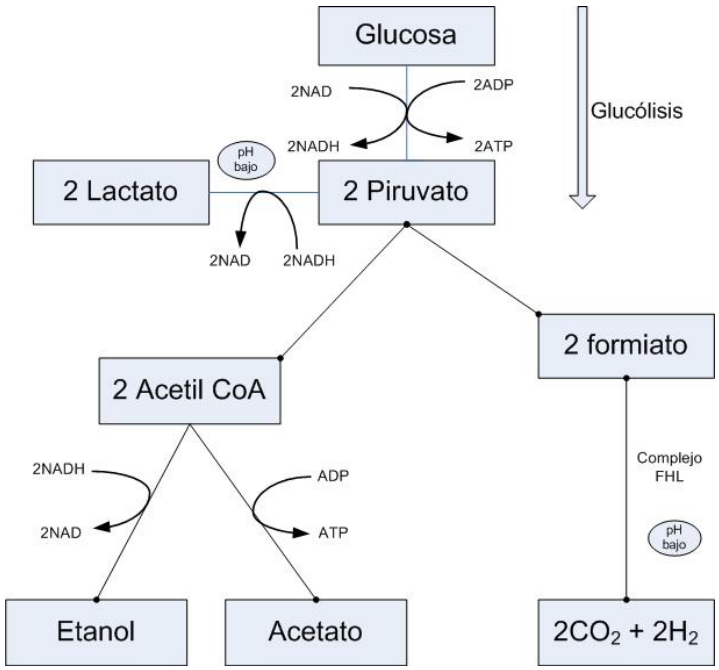

Figura 5- Producción de hidrógeno durante la fermentación realizada por bacterias entéricas.

Otras fermentaciones, típicas de *Clostridium*, se dan por medio de la ruptura del piruvato por la piruvato: ferredoxina-oxidorreductasa (PFOR), generando ferredoxina reducida (Fd red) y acetil- CoA (Figura 6). La Fd (red) deriva en la producción de hidrógeno a través de la hidrogenasa, produciéndose además una variedad de productos que pueden ser potencialmente generados a partir de acetil- CoA. La producción de acetato permite la síntesis de ATP, y una variedad de productos reducidos pueden ser producidos para generar NAD necesario para balancear próximas glucolisis. Dependiendo de las especies y de las condiciones ambientales, se puede generar etanol, butirato, butanol y acetona. Poco o nada de hidrógeno se produce durante las fermentaciones que producen solventes. La proporción relativa de los productos de fermentación depende del pH, con formación de solventes (butanol) favorecida a bajos pH (debajo de 4,5). El acetato y butirato son producidos durante fermentaciones que producen H_2 (Hallenbeck, 2005).

$$glucosa + H_2O \rightarrow 2acetato + 2CO_2 + 4H_2 \quad \Delta G^{0'} = -182{,}4kJ$$

$$glucosa \rightarrow butirato + 2CO_2 + 2H_2 \quad \Delta G^{0'} = -257{,}1kJ$$

Los rendimientos de producción de hidrógeno llevado a cabo por algunos *Clostridium* son menores que en las fermentaciones en las que el producto es acetato y a menudo se observa una mezcla de ambos productos:

$$4glucosa \rightarrow 2acetato + 3butirato + 8CO_2 + 8H_2$$

En la reacción anterior el rendimiento son 2 mol H_2 / mol de glucosa. Aproximadamente el 50% de los *Clostridium* aislados a la fecha llevan a cabo la fermentación butírica.

El máximo rendimiento de la ruptura del piruvato son dos hidrógenos por mol de glucosa. El hidrógeno adicional en la fermentación con producción de acetato puede ser producido por la acción de la NADH: ferredoxina-oxidorreductasa la cual recicla NAD y produce Fd (red) que deriva en la producción de H_2. En teoría estas fermentaciones son capaces de generar 4 H_2 por mol de glucosa. Esto es el denominado "límite de Thauer" (Thauer, Jungerman, & Decker, 1977). Sin embargo, bajo condiciones estándar la reducción de hidrogenasa por NADH es desfavorable y solo procede a presiones bajas de hidrógeno, debajo de 10^{-3} atm. Estas bajas presiones son alcanzadas por ejemplo en sistemas metanogénicos, donde el consumo de hidrógeno por las archaeas metanogénicas permite la producción de hidrógeno a partir de NADH (Hallenbeck, 2005).

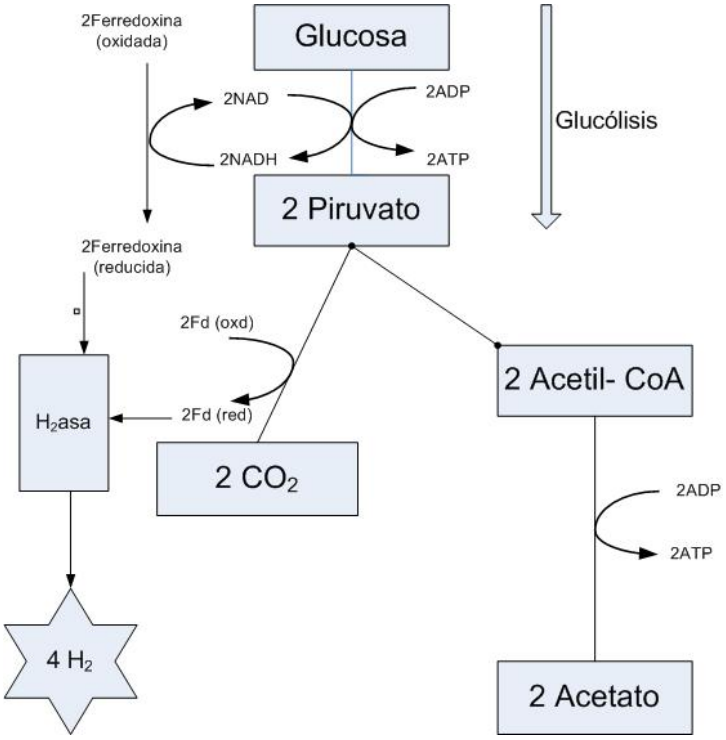

Figura 6- Producción de hidrógeno durante la fermentación acética realizada por *Clostridium*.

Por lo descripto anteriormente el rendimiento de producción de hidrógeno va a estar muy afectado por el tipo de microorganismo involucrado y la vía metabólica que predomine para

ese microorganismo en las condiciones en que se cultiva. Siendo el metabolismo con mayor rendimiento la fermentación acética y butírica.

1.8 Producción de hidrógeno en bio-reactores con retención de biomasa

La mayoría de los estudios de producción de H_2 vía fermentación oscura fueron realizados en cultivos en batch debido a su simple operación y control. Sin embargo, las operaciones a mayor escala requieren procesos continuos por razones prácticas de ingeniería. El reactor continuo agitado (RCA) es el sistema continuo más ampliamente estudiado para la producción fermentativa de H_2 (Wang & Wan, 2009).

Sin embargo, los reactores con inmovilización de células proveen una alternativa a los RCA, porque son capaces de mantener mayores concentraciones de biomasa a menores tiempos de retención hidráulicos, sin el lavado de los microorganismos. La inmovilización celular puede ser alcanzada formando gránulos, biofilms o biopartículas atrapadas en gel (Li & Fang, 2007).

En este trabajo de Tesis se trabajó con dos reactores con retención de biomasa, por lo tanto se va a profundizar en la utilización de estos dos tipos de reactores para producir hidrógeno.

1.8.1 Reactor Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)

Un reactor UASB es un reactor continuo cuya principal característica es la retención de biomasa sin necesidad de un soporte gracias a la formación de gránulos o “pellets”, lo que lo hace más económico y le da ventajas técnicas frente a otros tipos de reactores. Este punto es también su principal limitante ya que la selección y correcta operación del reactor UASB dependerá de la capacidad de sedimentar que logren sus aglomerados celulares, ya sea como gránulos o flóculos densos (Noyola, 1994).

El reactor es alimentado por abajo y la descarga del efluente se produce en la parte superior del reactor (Figura 7). Posee un separador gas- líquido- sólido cuya función es separar y descargar el biogás del reactor, evitar el posible lavado de flóculos o gránulos mediante su decantación, prevenir el lavado de lodo granular flotante, sirve para detener expansiones excesivas del manto de lodo (Noyola, 1994).

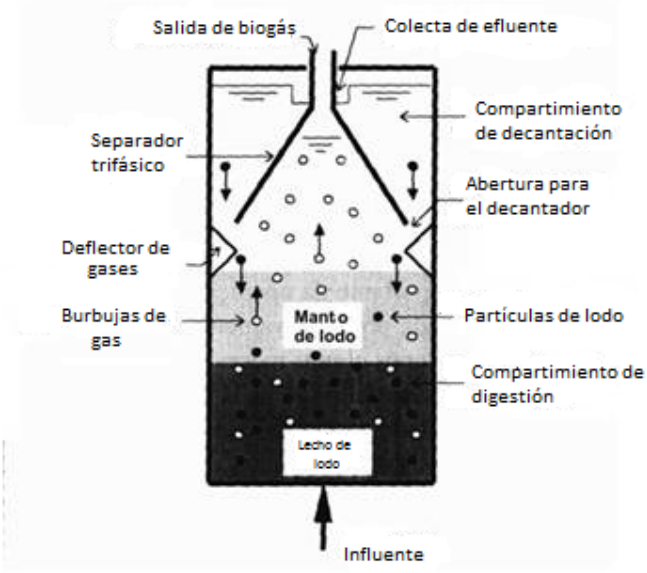

Figura 7- Esquema reactor UASB (De Lemos Chernicharo, 1997).

Los reactores UASB han sido ampliamente utilizados para la producción de metano, pero aún son pocos los trabajos que utilizan esta configuración de reactor para producir hidrógeno.

En este sentido, Fang y colaboradores (Fang, Liu, & Zhang, Characterisation of a hydrogen-producing granular sludge., 2002) demostraron que la biomasa en reactores de producción de hidrógeno también podría desarrollar gránulos con una alta actividad. En un experimento de 90 días, estos autores operaron un UASB inoculado con biomasa de un reactor de tratamiento de un efluente doméstico no tratado térmicamente. El reactor fue operado a 26°C, con 6 h de tiempo de residencia hidráulico (TRH), con una biomasa de 20 g/L de SSV, utilizando como sustrato sacarosa en una concentración que varió entre 2 a 12 g/L. Se observaron gránulos durante el día 15 y el día 60 cuando el reactor estaba operando a una carga orgánica de 49 g/Ld, con un 97% de conversión de sacarosa, un rendimiento H_2 de 2,2 mol/mol hexosa consumida. El tamaño promedio de los gránulos fue de 1,6 mm. El estudio microbiológico realizado mediante clonado y secuenciación, mostró que el 69,1% de los clones pertenecieron a 4 especies de *Clostridium* de la familia *Clostridiaceae* y un 13,5% de *Sporolactobacillus recemicus* dentro del grupo *Bacillus /Staphylococcus.*

Otros autores (Chang & Lin, 2004) también utilizaron un reactor UASB para producir H_2 a partir de sacarosa (20 g de DQO/L), trabajaron a tiempos de retención hidráulicos entre 4 y 24 h obteniendo una velocidad de producción máxima a un tiempo de residencia hidráulico (TRH) de 8 horas correspondiente a 53,5 mmol H_2/d alcanzando 42,4 % (v/v) de H_2 en el gas de salida. Las autores reportan que observaron el desarrollo de gránulos visibles después de 120 días de operación.

Gavala y colaboradores (Gavala, Skiadas, & Ahring, 2006) compararon la performance de un reactor continuo agitado con un UASB ambos alimentados con glucosa utilizando distintos tiempos de retención (2h, 6h y 12 h). Obtuvieron mayor velocidad de producción de hidrógeno en el UASB que en el continuo agitado (19,05 y 8,42 mmol H_2/Lh respectivamente) operando a

bajos TRH (2 h), pero el rendimiento fue mayor en el RCA que en el UASB a todos los TRH ensayados. En este trabajo se concluye además que la configuración del UASB es más estable que la del RCA. Además, operaron el RCA en condiciones termófilas obteniendo una velocidad de producción de hidrógeno de 104 mmolH_2/hLg VSS comparado con 12 mmolH_2/hLg VSS en condiciones mesófilas a un TRH de 6 h. No se detectó metano en ninguno de los sistemas.

Estos trabajos demuestran que es posible utilizar los reactores UASB para producir hidrógeno pero es necesario estudiar las óptimas condiciones de trabajo para cada efluente.

1.8.2 Reactor de Lecho fijo (RLF)

Los primeros trabajos de filtros anaerobios datan de finales de la década de los 60, y desde entonces han tenido una aplicación creciente, representando hoy una tecnología avanzada para el tratamiento de los efluentes domésticos y de una diversidad de efluentes industriales. El filtro anaerobio ascendente es básicamente una unidad de contacto, en la cual los efluentes pasan a través de una masa de sólidos biológicos contenida dentro del reactor (Figura 8). La biomasa contenida dentro del reactor se puede presentar de tres formas (De Lemos Chernicharo, 1997):

- como una fina capa de biofilm adherido a la superficie del soporte
- como biomasa dispersa retenida e los intersticios del material soporte
- como flóculos o gránulos retenidos en el segundo fondo, abajo del material soporte

Los compuestos orgánicos solubles contenidos en el efluente entran en contacto con la biomasa, difundiendo a través de la superficie del biofilm o del lodo granular, siendo entonces convertidos en productos intermedios y finales, y en reactores metanogénicos en metano y dióxido de carbono (De Lemos Chernicharo, 1997).

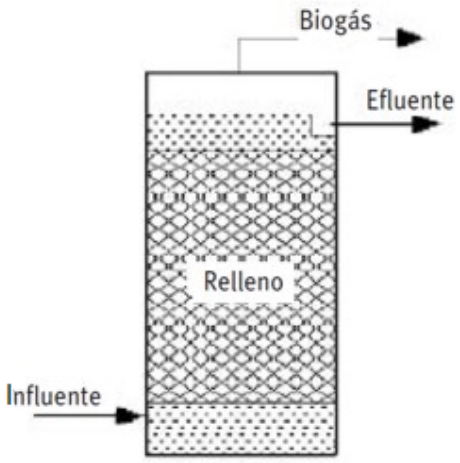

Figura 8- Esquema de un reactor de lecho fijo de flujo ascendente.

La finalidad del material soporte es retener sólidos en el interior del reactor. Varios tipos de material soporte han sido utilizados como medio soporte en reactores biológicos, incluyendo: cuarzo, bloques cerámicos, cáscara de ostras y mejillones, piedra caliza, anillos plásticos, cilindros huecos, bloques de PVC, granito, esferas de polietileno, bambú, etc. (De Lemos Chernicharo, 1997).

El material soporte puede ser fabricado con material reciclado, lo que resulta en bajos costos en la construcción del reactor. Por otra parte, el material de embalaje puede ayudar a la selección de las poblaciones microbianas adecuadas (Silva, Hirasawa, Varesche, Foresti, & Zaiat, 2006).

La colmatación o taponamiento del medio soporte ha sido una de las principales preocupaciones de los proyectistas y usuarios de filtros anaerobios. Estos problemas son más inherentes a los filtros anaerobios con flujo ascendente, empacados con piedras y grava (De Lemos Chernicharo, 1997).

Para minimizar los efectos de colmatación deben ser previstos dispositivos de limpieza a lo largo del lecho, a fin de promover la retirada de los sólidos en exceso del lecho (De Lemos Chernicharo, 1997).

Los reactores de lecho empacado son una buena alternativa para producir hidrógeno a partir de aguas residuales, debido a su simple construcción y al aumento del tiempo de retención celular que es esencial para la producción de hidrógeno (Leite, Fernandes, Pozzi, Barboza, & Zaiat, 2008) (Chang, Lee, & Lin, 2002) (Lee K. , Lo, Lo, Lin, & Chang, 2003) (Yokoi, Aratake, Hirose, Hayashi, & Takasaki, 2001) (Rachman, Nakashimada, Kakizono, & Nishio, 1998) (Kumar & Das, 2001) (Lin, Lee, Tseng, & Shaio, 2006). Esta configuración fue probada con éxito para producir hidrógeno a partir de diferentes sustratos, la mayoría sintéticos (Chang, Lee, & Lin, 2002) (Lee K. , Lo, Lo, Lin, & Chang, 2003) y algunas aplicaciones con residuos industriales (Peixoto, Saavedra, Varesche, & Zaiat, 2010)(Tabla 3).

Como se observa en la Tabla 3, la mayoría de los trabajos de producción de hidrógeno realizados en reactores de lecho fijo han utilizado sustratos definidos artificiales (glucosa y sacarosa) y muy pocos se han realizado utilizando efluentes reales. Por lo tanto para estudiar la aplicación de este tipo de reactores a escala real es necesario realizar más trabajo utilizando efluentes reales.

Tabla 3- Antecedentes de utilización de reactores de lecho fijo para producción de hidrógeno vía fermentación oscura.

Material soporte	Sustrato	Inóculo	Carga	TRH	Rendimiento máximo	Velocidad máxima	Referencia
Polietileno de baja densidad	Agua residual semi sintética de industrias de refrigerantes con y sin agregado de nutrientes	Fermentación del influente.	103 gDQO/Ld	0,5 h	3,5 mol H_2/mol sac	9,6 LH_2/Ld	(Peixoto, Saavedra, Varesche, & Zaiat, 2010)
Polietileno de baja densidad	Sacarosa y urea	Fermentacióndel influente.	24 gDQO/(L.d)	2 h	3,5 molH_2/mol sac (C/N de 137)	3,9 LH_2/Ld (C/N de 140)	(Anzola, 2010)
Esferas de arcilla (4,8-6,3 mm)	Glucosa y nutrientes.	Fermentación del influente.	102,7 g DQO/Ld	0,5 h	2,48 mol H_2/mol de glucosa	-	(Leite, Fernandes, Pozzi, Barboza, & Zaiat, 2008)
Poliuretano	Glucosa	*Clostridium tyrobutyricum*	5; 6,7 ;12,6; 30; 40; 60; 120 gDQO/Ld	24; 18; 9,5; 4;3; 2; 1 h	223 mL/g gluc (1,6 mol H_2/mol gluc)	7,2LH_2/Ld	(Jo, Lee, Park, & Park, 2008)

1.9 Parámetros operativos relevantes en la producción de hidrógeno

1.9.1 Inóculo

Un buen inóculo para reactores de producción de hidrógeno debe ser rico en bacterias hidrogenogénicas y sin organismos que consuman hidrógeno como las archaeas metanogénicas y las bacterias homoacetogénicas. Para obtener este tipo de inóculo es posible recurrir a fuentes naturales que tengan estas características o realizar tratamientos a la biomasa para eliminar los microorganismos no deseados (Hawkes, Hussy, Kyazze, Dinsdale, & Hawkes, 2007). Una amplia gama de fuentes naturales ha sido utilizada para inocular reactores para la producción de H_2, incluyendo microflora mixta, lodos de tratamiento de efluentes doméstico, suelos (Hawkes, Dinsdale, Hawkes, & Hussy, 2002), compost de estiércol de ganado (Fan, Kan, & Lay, 2006) y sedimentos de ríos (Zuo, Zuo, Zhang, & Chen, 2005). Los inóculos son comúnmente tratados previamente para seleccionar formadores de esporas y destruir las bacterias metanógenicas.

Lin y Chou (Lin & Chou, 2004) investigaron el tratamiento con ácido (HCl a pH 3-4 durante 24 h) de los lodos activados de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. Este inóculo se utilizó para desarrollar el carrier- induced granular sludge bed reactor (CIGBR) (Lee K.-S. , Lo, Lo, Lin, & Chang, 2004) (Lee, Wu, Lo, Lo, Lin, & Chang, 2004). En un artículo posterior, Lin y colaboradores (Lin, Lee, Tseng, & Shaio, 2006) recomendaron un pre-tratamiento básico en lugar de ácido, y consiguieron un lodo sin actividad metanogénica después de la incubación del efluente doméstico con NaOH 1M durante 24 h.

Sin embargo, el tratamiento térmico para enriquecer en microorganismos esporulados es más frecuente, aunque hay variaciones en cuanto a la temperatura y el tiempo en el que se debe aplicar. El tratamiento térmico del inóculo a escala industrial sería técnicamente más difícil que el tratamiento ácido o básico, de manera que es importante determinar cuánto mejora la producción de hidrógeno en la práctica y evaluar su costo beneficio (Hawkes, Hussy, Kyazze, Dinsdale, & Hawkes, 2007).

Castelló y colaboradores estudiaron el efecto del tratamiento térmico del inóculo (Castelló, Bonner, Crolla, Paolino, & Borzacconi, 2008), operaron dos reactores UASB a escala de laboratorio inoculados uno con un lodo granular proveniente de un reactor metanogénico y otro con el mismo lodo tratado térmicamente (100^{o}C, 45 min), observando que luego de casi 1 mes después del arranque la capacidad para producir hidrógeno no se vio afectada, detectando en ambos reactores la presencia de metano y baja producción de hidrógeno.

Alternativamente a los cultivos mixtos, muchos investigadores se han focalizado en el uso de cultivos puros de especies productoras de hidrógeno. Los principales argumentos para su uso son, la selectividad de sustratos, la fácil manipulación de su metabolismo alterando las condiciones de crecimiento, los mayores rendimientos de producción de hidrógeno observados debido a la reducción en la formación de productos no deseados así como también la repetitividad del proceso. Pero por otro lado, los cultivos puros son sensibles a la contaminación y su uso demanda en la mayoría de los casos, condiciones asépticas, lo cual significa un aumento en los costos de proceso (Ntaikou, Antonopoulou, & Lyberatos, 2010).

Hay una amplia gama de microorganismos capaces de producir hidrógeno mediante fermentación oscura. Estos incluyen anaerobios estrictos (como *Clostridium* y bacterias del rumen), anaerobios facultativos (como bacterias entéricas como *E. coli*, *Enterobacter, Citrobacter*), e incluso aerobios (*Alcaligenes, Bacillus*). Dentro de las bacterias productoras de hidrógeno, *Clostridium* y *Enterobacter*, son los más ampliamente estudiados. Especies del género *Clostridium* tales como: *C. butyricum, C. acetobutyricum* y *C. beijerinckii, C. thermolacticum, C. tyrobutyricum, C. thermocellum* y *C. paraputrificum* son ejemplos de microorganismos anaerobios estrictos formadores de esporas, que generan hidrógeno. Paralelamente, anaerobios facultativos, como *E. coli* y especies del género *Enterobacter*, tales como *E. aerogenes* y *E. cloacae* también se han utilizado para producción de hidrógeno (Ntaikou, Antonopoulou, & Lyberatos, 2010).

1.9.2 pH

Numerosos autores han usado bajo pH y cortos tiempos de retención hidráulica en reactores continuos agitados o una combinación de ambos para evitar la metanogénesis (Valdez-Vazquez, Rios-Leal, Esparza-Garcia, Cecchi, Pavan, & Poggi-Varaldo, 2004).

Fang y Liu (Fang & Liu, 2002) observaron producción de metano en un RCA para producción de hidrógeno a partir de un cultivo mixto mesófilo cuando el pH se incrementó a 6, aún cuando el TRH se mantuvo en valores bajos (6 horas). Los resultados de otros trabajos realizados a pH mayor que 6, sin embargo, contradicen estos resultados. Por ejemplo,Chang y colaboradores (Chang, Lee, & Lin, 2002), operaron un reactor de lecho fijo, inoculado con un lodo pretratado con ácido a un pH de 6,7 y no detectaron metano. En este caso el pretratamiento del lodo puede haber tenido importancia en inhibir la metanogénesis.

En la Tabla 4, se muestran diferentes rangos óptimos de pH para la producción de hidrógeno reportado por diferentes autores.

Tabla 4- Determinación del pH óptimo de operación para cultivos mesófilos mixtos.

pH testeado	pH óptimo	Inóculo	Sustrato	TRH (h)	Temp (°C)	Máx. rendimiento (mol H_2/mol hexosa)	Ref.
4,0- 6,0	5,2	Lodo anaerobio tratado térmicamente	Almidón	17	37	2,15	(Lay J. J., 2000)
4,0- 7,0	5,5	Lodo productor de hidrógeno	Glucosa	6	36	2,1	(Fang & Liu, 2002)
5,7 y 6,4	5,7	Lodo de reactor anaerobio	Glucosa	6	35	1,7	(Lin & Chang, 1999)
5,0- 6,5	5,5	Compost de estiércol de vaca	Desechos de cervecera	18	37	43 mL/gDQOagregado	(Fan, Kan, & Lay, 2006)
5,0- 6,5	5,8	Compost de pasto tratado térmica-mente	Desecho de levadura (cerveza)	32	40	NA	(Lay, Tsai, Huang, Chang, Chou, & Fan, 2005)
4,5-6,0	5,5	Suelo tratado térmica-mente	Glucosa	10	30	2,5	(Van Ginkel & Logan, 2005)

Como se pude observar en la Tabla 4, el pH óptimo para producir hidrógeno estuvo entre 5,2 y 5,8. Operaciones a un pH debajo de 4,7 son altamente desfavorables ya que en estas condiciones se ha reportado la inhibición de la hidrogenasa y otras enzimas involucradas en la producción de hidrógeno (Lay, Lee, & Noike, 1999).

1.9.3 Carga orgánica de entrada

Se ha reportado que cambiando la carga orgánica (del inglés: organic loading rate, OLR, definido como concentración de alimentación/TRH) se puede incrementar el rendimiento en la producción de hidrógeno, pero existen desacuerdos en la literatura sobre este efecto. En algunos casos un aumento de la carga orgánica produce una disminución de la producción de hidrógeno y en otras la aumenta. En este último caso, al aumentar la carga orgánica se llega a un punto en que la producción de hidrógeno se hace constante o decrece, dando lugar a una carga orgánica óptima. En la Tabla 5 se puede observar los efectos en el rendimiento de hidrógeno al variar la carga de entrada según diferentes autores (Kraemer & Bagley, 2007).

Tabla 5- Comparación de estudios que variaron la carga orgánica de entrada variando la concentración de sustrato (Kraemer & Bagley, 2007)

Estudio	Sustrato	So (gDQO/L)		TRH (h)	OLR (g DQO/Ld)		Rend. mol H2/mol hexosa convertida	
		Mín.	Máx.		Mín.	Máx.	Mín. OLR	Máx. OLR
A menores OLR se mejora la producción de H2								
Kyazze et al. (2006)	sacarosa	11.2	56.1	12	22.4	112.2	1.65	0.81
Oh et al. (2004b)	glucosa	7.3	29.2	4	43.9	175.4	1.30	1.05
Van Ginkel and Logan (2005a)	glucosa	10.7	32	10	25.6	76.8	2.20	2.00
Van Ginkel and Logan (2005b)	glucosa	2.5	10	10	6	24	2.80	2.20
	glucosa	2.5	10	2.5	24	96	2.40	1.90
Wu et al. (2006)	sacarosa	10	40	6	40	160	1.84	1.36
	sacarosa	10	40	2	120	480	2.10	1.96
Yu et al. (2002)	Desecho de destilería de arroz	14	36	2	168	432	1.89	1.79
A mayores OLR se mejora la producción de H2								
Kim et al. (2006b)	sacarosa	10	60	12	20	120	0.25	1.00
Lin et al. (2006)	sacarosa	5	40	8.9	13.5	107.9	1.69	2.49
	sacarosa	5	40	6	20	160	1.34	2.17
Yang et al. (2006)	Desecho de ácido cítrico	varied	varied	varied	10	40	0.50	0.85
Zhang et al. (2004)	glucosa	5	15	4.5	26.7	80	0.72	1.04

Abreviatura; So=concentración del influente, TRH=Tiempo de retención hidráulico.

Según (Kraemer & Bagley, 2007), las explicaciones de que un aumento de la carga orgánica produzca un descenso en el rendimiento de hidrógeno pueden ser las siguientes:

1) Un aumento en los ácidos grasos volátiles inhiba la producción de hidrógeno.

2) Un aumento del H_2 disuelto, aumente la regulación termodinámica sobre la hidrogenasa.

3) Que se afecte la actividad acetogénica.

4) Que el aumento del CO_2 disuelto, aumente la inhibición.

1.9.4 Temperatura

De la ecuación de Van'tHoff $G^o_T=H^o+S^oT$ se desprende que al aumentar la temperatura de reacción aumenta el término de la entropía y por lo tanto la reacción se vuelve más favorable. Esto coincide con los resultados de rendimientos de fermentaciones mesófilas y termófilas reportados (Tabla6) (Hallenbeck P. C., 2005).

Tabla 6- Rendimientos de reacciones en condiciones mesófilas y termófilas. De las mesófilas solo las que tienen rendimiento mayor a 2 son mostradas (Hallenbeck , 2005).

Autores	Organismos	Temp. (°C)	Rendimiento (H_2/gluc)
	Mesófilos (30-40°C)		
Fang y Liu (2002)	Cultivo mixto		2,1
Fang *et. al* (2002)	Efluente doméstico		2,1
Kataoka *et. al.* (1997)	*Ruminococcus albus*		2,4
Kumar *et.al.* (2001)	*Clostridium butyricum*		2,2
	Enterobacter cloacale mutant		3,4
Lin y Lay (2004)	Lodo doméstico anaerobio		2,4
Noike y Mizuno (2000)	Cultivo de desecho de comida		2,5
Oh *et. al.* (2003)	*Citrobacter* sp. Y19		2,5
Saint Amans *et. al.* (2001)	*Clostridium butyricum*		2,0
Taguchi *et. al.* (1995)	*Clostridium* sp.		2,4
	Termófilos		
Dietrich *et. al.* (1998)	*Acetothermicus paucivorans*	60	3,5
Janssen y Morgan (1992)	*Thermotoga* sp.	77	3,6
Janssen y Morgan (1992)	*Spirochaeta thermophila*	65	3,0
Kengen y Stams (1994)	Pyrococcus furiosus	90	3,0
Morimoto *et. al.* (2004)	Lodo POME	50	2,1
Rainey *et. al.* (1991)	*Spirocheta* sp.	65	2,0
Schaefer y Schoenheit (1992)	*Pyrococcus furiosus*	90	3,0
Schroeder *et. al.* (1994)	*Thermotoga maritima*	80	4,0
Soutscheck *et. al.* (1994)	*Acetomicrobium flavidum*	58	4,0
Ueno *et. al.* (1995)	Cultivo mixto	60	2,4

Se ha reportado la producción de hidrógeno por numerosos organismos termófilos entre ellos se incluyen a *Saccharolyticus caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacterium* sp. y *T. thermosaccharolyticum*, *Thermotoga* sp. y *T. maritima*, *T. elfii.* El uso de bacterias hipertermófilas es de un interés cada vez mayor debido a sus propiedades excepcionales ya que pueden crecer con éxito a temperaturas muy altas (llegando incluso a 110°C) los cultivos hipertermófilos son menos sensibles a las contaminaciones. Por otra parte, los hipertermófilos

muestran una mejor resistencia a la inhibición a altas presiones parciales de hidrógeno, uno de los factores inhibitorios en los procesos de producción de hidrógeno (Ntaikou, Antonopoulou, & Lyberatos, 2010).

1.9.5 Producción de hidrógeno utilizando suero de queso como sustrato

La mayoría de los trabajos de producción de hidrógeno se han realizado utilizando sustratos artificiales y definidos. Para poder aplicar esta tecnología en la industria es fundamental estudiar la aplicación a sustratos complejos y en particular aguas residuales. Como se discutió previamente el suero de queso además de ser un problema ambiental para el país puede ser un sustrato adecuado para la producción de hidrógeno. El objetivo de esta Tesis es estudiar esta posibilidad por lo tanto se va discutir los antecedentes en este aspecto.

Como se puede observar en la Tabla 7, la mayoría de los trabajos que estudian la producción de hidrógeno a partir de suero de queso se han realizado en cultivos en Batch o en reactores continuos agitados y con suero de queso en polvo. El bajo rendimiento obtenido en algunos de estos trabajos fue debido a la presencia de metanogénesis o de fermentaciones con bajo rendimiento de hidrógeno por lo cual es necesario realizar más estudios para optimizar el proceso.

Tabla 7- Antecedentes de utilización de suero de queso para producción de hidrógeno vía fermentación oscura.

Sustrato	Tipo de reactor	Inóculo	Máx. prod. H_2	Autor
Suero de queso crudo Pretratamiento: T= 105 º C t= 5 min	RCA	Mixto. Proveniente de digestor anaerobio. Pretratamiento: Tratamiento térmico a 85°C durante 45 min.	22 mmolH_2/ gDQO	(Azbar, Çetinkaya Dokgöz, Keskin, Korkmaz, & Syed, 2009)
Suero de queso en polvo	Batch, viales de V = 120 mL con un volumen de de medio de 80 mL	Lodo de reactor UASB de fábrica de dulces. Tratamiento térmico a 100°C por 40 min	3,1 mol H_2/mol lactosa	(Davila-Vazquez, Alatriste-Mondragón, de León- Rodríguez, & Razo- Flores, 2008)

Suero de queso en polvo	RCA, V= 3L	Lodo de reactor UASB de fábrica de dulces. Tratamiento térmico a 100°C por 40 min	2,8 molH_2/mol lactosa	(Davila-Vazquez, Cota - Navarro, Rosales - Colunga, de León-Rodríguez, & Razo-Flores, 2009)
Suero de queso en polvo	RCA, V=2L	Lodo de reactor UASB de fábrica de dulces. Tratamiento térmico a 100°C por 40 min	28 LH_2/Ld	(Cota-Navarro, Carrillo-Reyes, Davila-Vazquez, Alatriste-Mondragón, & Razo-Flores, 2010)
Suero de queso crudo	Batch, viales de V = 250mL con un volumen de de medio de 200mL	*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*	2,84 mol H_2/ mol lactosa	(Ferchichi, Crabbe, Gil, Hintz, & Almadidy, 2005)
Suero de queso crudo	RCA V = 500 mL de volumen de trabajo. El efluente del primer reactor se trata en un RCA metanogénico.	Se activa la microflora endógena del suero de queso.	0,78 mol H_2/mol glucosa 2,9 L H_2/Ld	(Venetsaneas, Antonopoulou, Stamatelatou, Kornaros, & Lyberatos, 2009)
Suero de queso crudo	UASB V= 4,6 L	Mixto. De un reactor acidogénico alimentado con glucosa para producción de H_2 operado durante 3 meses. Proveniente originalmente de un UASB metanogénico.	122 mL H_2/Ld	(Castelló, y otros, 2009)

En el trabajo de Azbar y colaboradores (Azbar, Çetinkaya Dokgöz, Keskin, Korkmaz, & Syed, 2009) estudiaron el efecto de variar el TRH (1, 2 y 3,5 días) y la carga orgánica (21, 35 y 47 gDQO/Ld) en un RCA operado en condiciones termófilas, alimentado con suero de queso crudo tratado térmicamente a 105°C durante 5 minutos antes de entrar al sistema y suplementado con nutrientes. Se alcanzaron rendimientos de hidrógeno de 22, 15 and 5 mmol/gDQO (a una DQO de entrada de 40 g/L) a TRH de 3,5; 2 y 1 día respectivamente. Por otro lado, rendimientos de 3, 9 and 6 mmol/gDQO, para valores de 47, 35 and 21 gDQO/Ld, cuando el TRH se mantuvo en 1 día. Los autores reportan detección de metano en momentos puntuales

de operación. Proponen la hipótesis de que las archaeas metanogénicas podrían adherirse a las paredes del reactor y no ser lavadas aunque se opere a bajos TRH. Reportan que la variación de los tiempos de retención hidráulico influyen más en la producción de hidrógeno que la variación de la carga orgánica y para futuros estudios dejan planteado el analizar la producción de hidrógeno sin tratar el suero previo a su entrada al reactor.

En un primer trabajo realizado en cultivos en Batch, Dávila-Vazquez y colaboradores (Davila-Vazquez, Alatriste-Mondragón, de León- Rodríguez, & Razo- Flores, 2008) evaluaron el efecto del pH inicial (3,88–8,12) y la concentración inicial de sustrato (0,86–29,14 g/L) en el rendimiento y la velocidad de producción volumétrica de hidrógeno. Utilizaron tres sustratos (lactosa, suero de queso en polvo (SQP) y glucosa) mientras que el inóculo utilizado fue un lodo granular anaerobio tratado térmicamente. Los autores observaron que las mejores condiciones para producir hidrógeno a partir de lactosa y glucosa fueron a pH 7,5 y una concentración inicial de sustrato de 5 g/L, y que para el suero de queso, los mejores resultados fueron obtenidos a pH 7,5 y una concentración inicial de sustrato mayor a 15 g/L. A pesar del tratamiento térmico del inóculo en la experiencia con suero de queso se detectó metano (<10%).

En un segundo trabajo, los mismos autores (Davila-Vazquez, Cota - Navarro, Rosales - Colunga, de León- Rodríguez, & Razo- Flores, 2009) realizaron un ensayo a tres tiempos de retención hidráulico diferentes (10, 6 y 4 h) resultando la mayor velocidad de producción de hidrógeno al TRH de 6h. Se analizaron también cuatro cargas orgánicas al TRH de 6h con los siguientes valores: 92,4, 115,5, 138,6 y 184,4 g lactosa/Ld. Obtuvieron los máximos valores de velocidad de producción de hidrógeno (46,61 mmolH_2/Lh y rendimiento 2,8molH_2/mol lactosa) a una carga orgánica de 138,6 g lactosa /Ld. Sin embargo, el aumento de la carga a 184,4 g lactosa/Ld produjo una fuerte caída enla velocidad de producción de hidrógeno. La caracterización de la comunidad microbiana realizada mediante DGGE y secuencia del gen que codifica para el ARNr de 16S mostró que el género predominante en el reactor fue *Clostridium*. La prevalecía de este microorganismo explicaría el alto rendimiento obtenido en este trabajo.

El mismo grupo de investigación (Cota-Navarro, Carrillo-Reyes, Davila-Vazquez, Alatriste-Mondragón, & Razo-Flores, 2010), buscaron las condiciones de operación para optimizar el tratamiento de suero de queso en dos etapas. Para ello operaron un primer reactor hidrogenogénico (RCA) acoplado a un reactor metanogénico (UASB). Estudiaron el efecto de la variación del tiempo de retención hidráulica (TRH) y la carga orgánica para producción de hidrógeno. La operación del RCA fue dividida en 9 periodos. Durante los primeros 3 períodos (I, II and III) se fijó el TRH en 6 h pero la concentración de sustrato fue incrementada de 24 a 47 g lactosa/L, resultando en un aumento de la carga orgánica. En los periodos IV a IX el TRH fue reducido de 6 a 3,5 h y la concentración de entrada se fijó en 24 g lactosa/L. La implementación de una carga alta (142 g lactosa /Ld) y un TRH de 6 h, resultaron ser una buena combinación para aumentar la velocidad de producción de hidrógeno. El proceso en dos etapas para el hidrógeno y la producción de metano continuo permitió la recuperación de más de 70% de la energía presente en el sustrato demostrando su potencial aplicación.

Otros autores (Venetsaneas, Antonopoulou, Stamatelatou, Kornaros, & Lyberatos, 2009), también estudiaron la producción de hidrógeno y metano mediante un proceso continuo en dos etapas pero utilizando suero de queso crudo como sustrato. Utilizaron un primer reactor continuo agitado (RCA) con suero de queso sin diluir como sustrato y la microflora autóctona del suero como inóculo. Para la segunda etapa utilizaron un RCA pero inoculado con biomasa metanogénica, y alimentado con el efluente de salida del primer reactor para la producción de metano. Se obtuvo un rendimiento máximo de H_2 de 0,78 mol H_2/mol glucosa, una velocidad de producción de metano de 6,7 L CH_4/L_{inf} y una remoción de DQO del 95,3 % sumando las dos etapas. Con estos resultados los autores concluyen que el suero de queso puede ser eficientemente utilizado para producir hidrógeno y metano en un proceso de dos etapas.

También utilizando suero de queso crudo (Ferchichi, Crabbe, Gil, Hintz, & Almadidy, 2005), llevaron cabo experiencias en batch para investigar el efecto del pH inicial (ajustado entre 5 y 10) en la producción de hidrógeno por *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. La velocidad de producción de hidrógeno alcanzó un máximo al pH inicial de 6 y luego disminuyó de manera constante con el aumento de pH, concluyendo que utilizando este tipo de microorganismo el pH óptimo de operación es alrededor de 6.

En nuestro país se comenzó a trabajar en este tema a fines del año 2006 a través de un Proyecto PDT (47/15) "Producción de biohidrógeno a partir de residuos" en conjunto entre la Facultad de Ingeniería y la Facultad de Química donde se pusieron a punto técnicas, se estudiaron las condiciones de arranque y se evaluó el funcionamiento de un reactor tipo UASB con suero lácteo. Si bien en dicho trabajo se comprobó la viabilidad de producir hidrógeno a partir de suero lácteo crudo en un reactor UASB, no se obtuvo un alto rendimiento (122 mL H_2/Ld).La baja producción se explicó por la presencia de organismos fermentadores (de los géneros *Megasphaera* y *Pectinatus*) y fermentadores incapaces de producir hidrógeno (*Prevotella, Olsenella, Bulleidia, Mitsoukella y Selenomonas*). Otro factor que podría explicar el bajo rendimiento en hidrógeno fue que la población metanogénica no pudo ser inhibida completamente ni lavada del reactor, a pesar que se operó a pH ácidos (Castelló, y otros, 2009).

1.10 Bases de los métodos de biología molecular para estudio de reactores

En este trabajo de Tesis se utilizaron técnicas de biología molecular para el estudio de las comunidades microbianas que se desarrollaron en los reactores. En esta introducción se realiza una breve descripción de los métodos utilizados.

1.10.1 Terminal Restriction Fragment length Polymorphism (T-RFLP)

El análisis de T-RFLP es un método rápido para comparación de comunidades microbianas. Se basa en la digestión con una endonucleasa de restricción de los productos de PCR marcados en un extremo con un compuesto fluorescente. El primer paso es amplificar el gen a estudiar mediante PCR utilizando el primer forward marcado con un fluorósforo. Luego se trata el pool de productos de PCR con enzimas de restricción. Los productos de digestión son separados por electroforesis y detectados por un secuenciador automático mediante detector laser que detecta la señal del marcador fluorescente (Figura 9). El método es rápido y provee distintos perfiles dependiendo de la composición de especies de la comunidad de las muestras (T-RFPred, 2009).

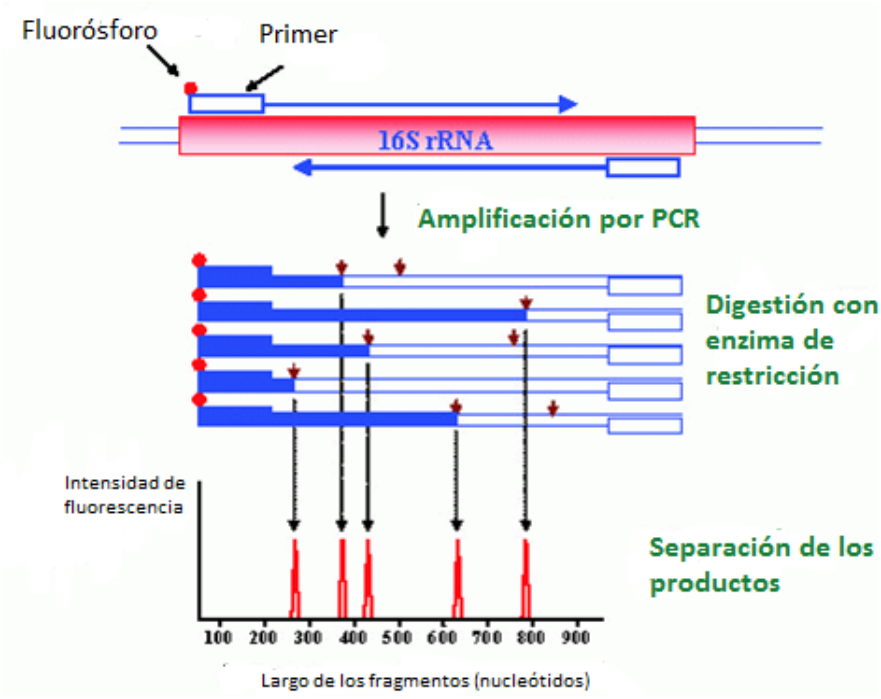

Figura 9 – Esquema de T-RFLP (T-RFPred, 2009).

1.10.2 Construcción de bibliotecas de clones y análisis de las secuencias

El clonado de ADN es un proceso por el cual se inserta un segmento de ADN de un organismo en otro. Es una técnica muy utilizada en biología molecular pues permite separar fragmentos de ADN, cada fragmento queda inserto en un "clon" de manera de poder estudiarlo separadamente por ejemplo mediante su secuenciación (Etchebehere & Menes, 2007), al conjunto de clones proveniente de una muestra de ADN se le llama biblioteca de clones (Figura 10). Una vez que se tiene los clones con los insertos correspondientes se procede a

obtener la secuencia de los insertos. Para ello se realiza una extracción del plásmido o se amplifica el inserto con primers específicos para la zona de inserción del plásmido.

Las secuencias obtenidas se comparan con bancos de datos de secuencias y de esa manera es posible identificar los microorganismos presentes en la comunidad microbiana a analizar sin necesidad de aislarlos.

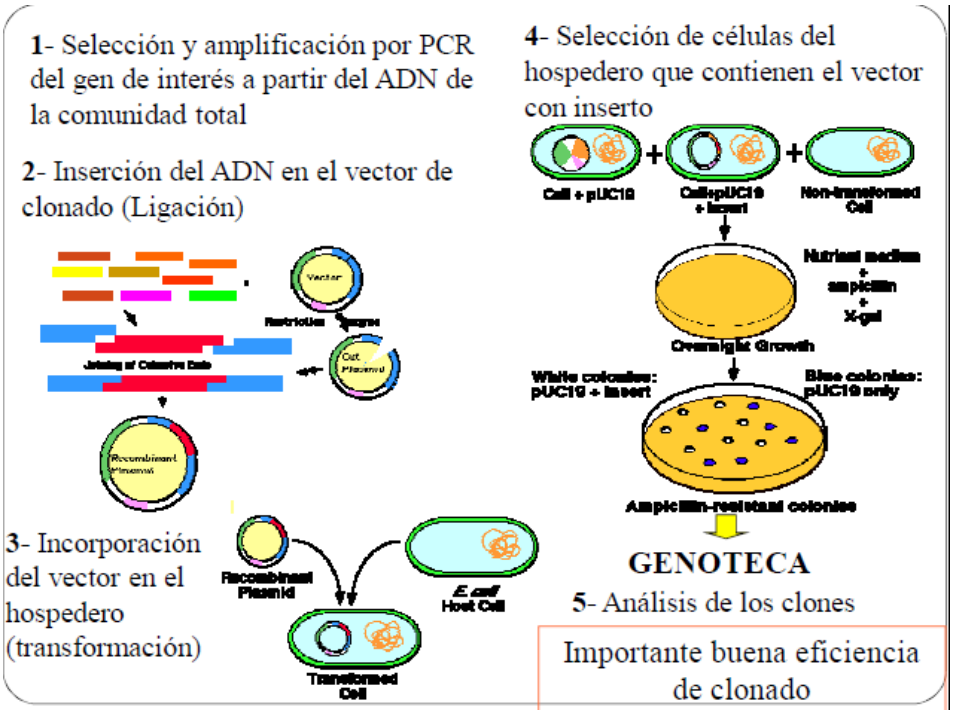

Figura 10- Esquema de la técnica de construcción de biblioteca de clones.

A partir de las secuencias de los clones, se puede determinar el número de nucleótidos del fragmento 5' obtenido por digestión "in sillico" con la enzima utilizada en el T-RFLP de manera de identificar los picos (Figura 11). Se utiliza un programa de edición y alineamiento de secuencias MEGA 5 (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, & Kumar, 2011), que permite buscar las regiones específicas de corte de la enzima de restricción y calcular así el tamaño del fragmento que se genera.

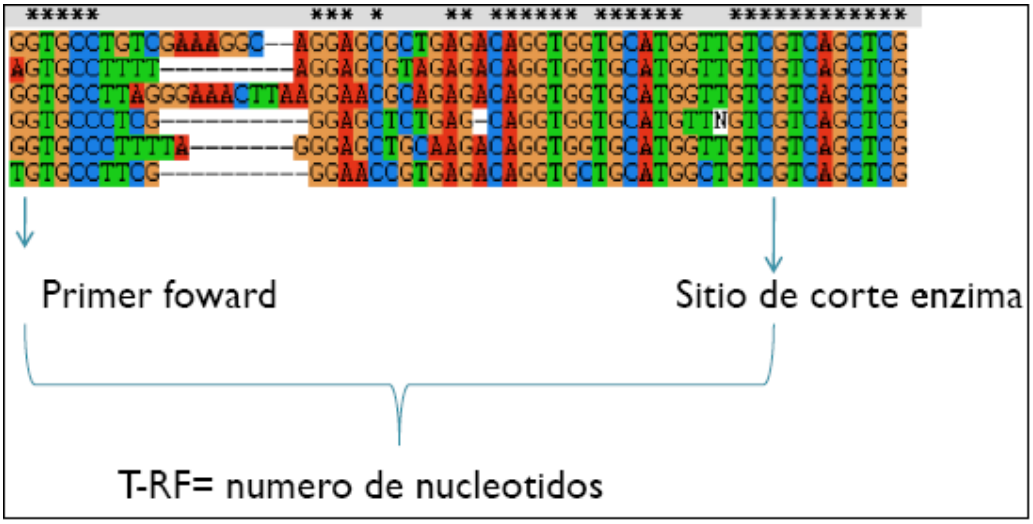

Figura 11- Digestión "in sillico" de las secuencias de la librería de clones para correlacionarlas con los picos obtenidos por T- RFLP.

1.10.3 PCR en tiempo real (Real- Time PCR)

Fundamento

La reacción de PCR en tiempo real es una técnica en la cual son usados instrumentos que permiten el monitoreo en tiempo real de la fluorescencia emitida durante el transcurso de una reacción de PCR. Los cambios en la fluorescencia pueden ser asociados a la acumulación de producto por varios métodos. Hay dos tipos principales de agentes indicadores que emiten fluorescencia a medida que se sintetiza producto en la reacción de PCR. El primero depende de la propiedad de algunos agentes de unirse a la doble hebra como es el caso por ejemplo del SYBR Green que sufre un cambio conformacional que resulta en un aumento de fluorescencia. Los segundos son las sondas FRET (Fluorescent resonance energy transfer). En estos, se alteran de distintas maneras los arreglos espaciales de un donador de fotones y moléculas aceptoras. Estas moléculas se pueden encontrar unidas a sondas, primers o producto de PCR y son usualmente seleccionadas de manera de amplificar una secuencia específica de ADN que trae consigo el aumento de la fluorescencia emitida a una determinada longitud de onda (Figura 13) (Saunders, 2004).

La cuantificación puede ser en términos absolutos, comparando un control externo de concentración conocida, o puede ser relativa, comparando la cantidad de ADN de la muestra con la otra secuencia blanco presente en la muestra (Bustin & Nolan, 2004).

Para cuantificar el ADN contenido en una muestra es necesario construir una curva de calibración (Figura 12). Para obtenerla, se utilizan diluciones seriadas de ADN que contengan el gen a cuantificar, en un amplio rango de concentraciones, entre 5 y 7 órdenes de magnitud y se grafica el Crossing-treshold (C_T) en función del log (nº de copias) (Bustin & Nolan, 2004).

El valor R^2 indica cuan cerca de la correlación perfecta entre C_T y número de copias se encuentra la curva. Se aceptan valores de R^2 mayores a 0,98. El valor de la pendiente de la curva es una medida de la eficiencia de la reacción de amplificación y se calcula como:

Eficiencia (E) = [10 (-1/pend)] -1

siendo E = 1 una reacción 100% eficiente.

Los valores de intersección con el eje de las ordenadas y R^2 de la curva también pueden ser utilizados como indicadores de eficiencia y sensibilidad del ensayo (Bustin & Nolan, 2004).

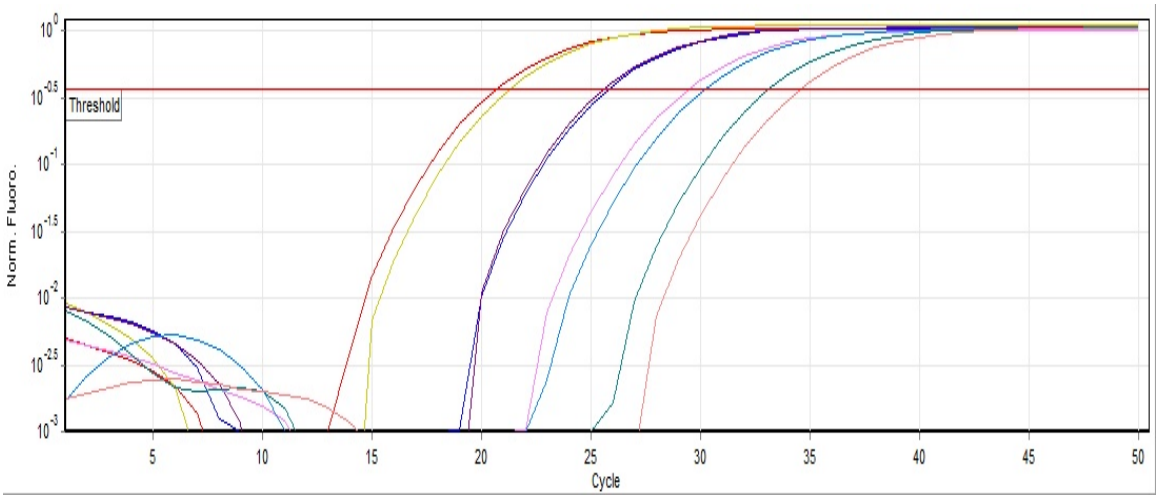

Figura 12- Curva de amplificación obtenida a partir de una dilución seriada del ADN proveniente de un clon con el gen de la Fe-hidrogenasa inserto (clon A10) de concentración conocida, la reacción de PCR en tiempo real fue realizada con primers dirigidos a la Fe-hidrogenasa.

Determinación de C_T (Crossingtreshold)

Primeramente, son establecidos los niveles de ruido en las medidas de fluorescencia para una corrida en particular. Luego, algoritmos específicos de la plataforma son usados para definir el nivel detectable de fluorescencia. Finalmente, el algoritmo busca en los datos de cada muestra un punto que exceda la línea de base. El punto en el cual ocurre esto se define como C_T. Dicho valor depende del número de copias iniciales de la muestra, la eficiencia de corte o hibridación de la sonda con el fluorósforo y la sensibilidad de detección. A menos ciclos se alcance el nivel detectable de fluorescencia, mayor el número de copias de ADN iniciales contiene la muestra (Bustin & Nolan, 2004).

Curva de Melting

Las curvas de Melting se realizan para determinar la especificidad de la reacción de PCR ya que distintos perfiles representan diferentes productos al final de la reacción de PCR. Se realiza en el método que utiliza un agente intercalante (Ej. SYBR green). Para construir la curva de Melting todos los productos de PCR son llevados a 95°C de manera de asegurar que todos ellos son completamente separados y luego son enfriados para asegurar una completa hibridación.

La derivada primera de la fluorescencia respecto a la temperatura proporciona una clara visión de cómo se pierde el agente intercalante y el rango de temperaturas en el cual esto ocurre (Bustin & Nolan, 2004).

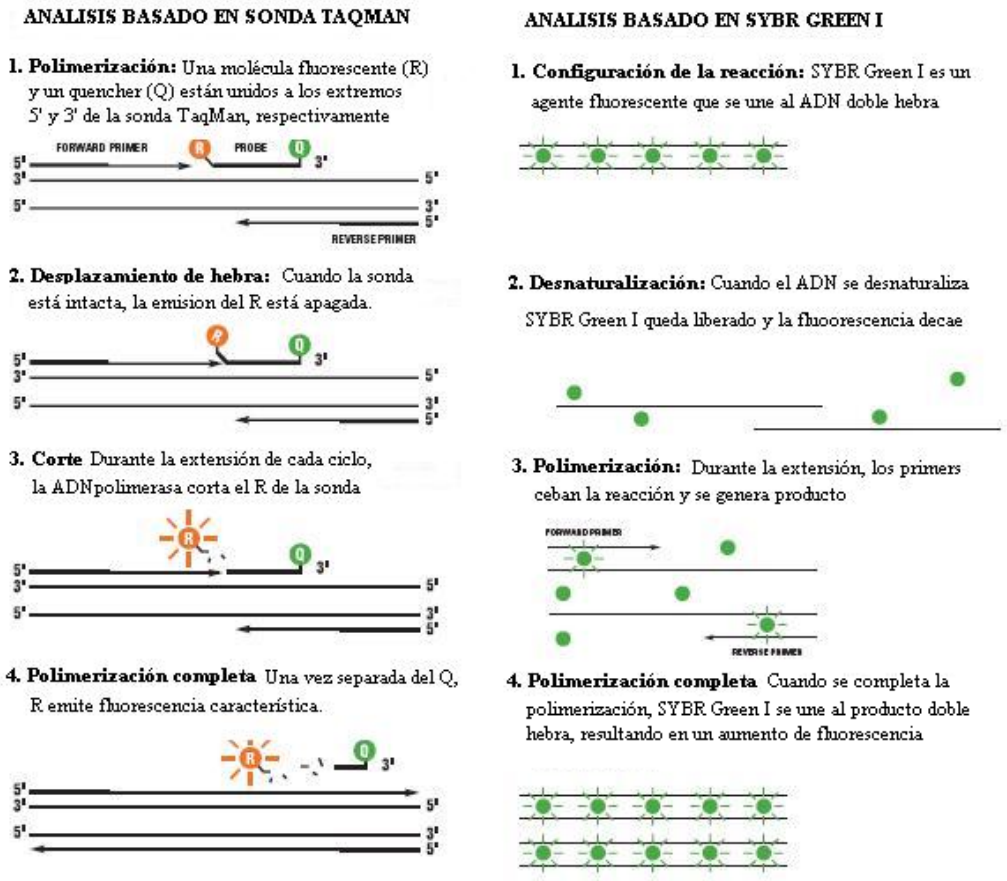

Figura 13-Diferencias en la manera de detección de la fluorescencia durante la reacción PCR en tiempo real. Fuente: (Applied Biosystems).

2 Objetivos generales

Evaluar cuál es la mejor estrategia en las condiciones estudiadas para la obtención de hidrógeno por fermentación oscura a partir de suero de queso.

Comparar la performance del reactor de lecho fijo con la del UASB para producir hidrógeno a partir de suero de quesería.

2.1 Objetivos específicos de la operación del reactor UASB

Evaluar si se logra aumentar el rendimiento en hidrógeno inoculando con biomasa con bajo contenido en archaeas metanogénicas.

Evaluar si el aumento de la carga orgánica por unidad de biomasa durante la operación incrementa el rendimiento en hidrógeno.

Correlacionar el funcionamiento del reactor a la población bacteriana predominante en el mismo a lo largo de la operación para entender el proceso.

2.2 Objetivos específicos de la operación del reactor de lecho fijo

Evaluar si el aumento de la carga orgánica durante la operación en el reactor de lecho fijo incrementa el rendimiento en hidrógeno.

Correlacionar el funcionamiento del reactor de lecho fijo a la población bacteriana predominante en el mismo a lo largo de la operación.

2.3 Preguntas a responder

¿Es posible utilizar un reactor UASB o de lecho fijo para obtener hidrógeno a partir de suero de quesería?

¿Cuál es el rendimiento en hidrógeno que se puede llegar a obtener?

¿Cuáles son las condiciones que favorecen el aumento de rendimiento?

El aumento de la carga orgánica, ¿aumenta el rendimiento en hidrógeno?

¿Cuáles son los problemas operacionales de cada tipo de reactor?

¿Qué microorganismos están involucrados en la producción de hidrogeno?

¿Qué microorganismos compiten con la producción de hidrógeno bajando el rendimiento?

¿En cuál de los reactores (de lecho fijo y UASB) se obtiene mayor rendimiento y mayor volumen de producción de hidrogeno?

¿Cuál de los reactores presenta menos problemas de operación y cuáles podrían ser las soluciones?

¿Cómo es la estabilidad de la performance de cada uno de los reactores?

3 Estrategia experimental

3.1 Estrategia UASB

Para responder las preguntas planteadas se operó en una primera instancia un reactor UASB, alimentado con suero de queso crudo diluido, con agregado de bicarbonato de sodio para ajustar el pH a la entrada, utilizando como inóculo un compost sin pre tratamiento térmico.

Para determinar si el al compost era un buen inóculo para este tipo de reactores (libre de bacterias consumidoras de hidrógeno), se realizó un ensayo de actividad metanogénica no detectándose la producción de metano. También se realizó un ensayo de actividad productora de hidrógeno para verificar la presencia de bacterias hidrogenogénicas en el compost.

El reactor fue operado durante 99 días a una carga de 20 gDQO/Ld, con una parada intermedia por problemas operacionales. El día 182 (a partir del primer arranque) se retomó la operación a una carga de entrada de 20 gDQO/Ld y a partir del día 196 con 30 gDQO/Ld. El tiempo de residencia hidráulico (TRH) se mantuvo en 24h y el pH de operación se ajustó a valores cercanos a 5,5.

3.2 Monitoreo del reactor

Se realizó la determinación de la DQO de muestras tomadas del influente y efluente aproximadamente 3 veces por semana. Se midieron sólidos suspendidos volátiles del efluente y del contenido del reactor para estimar la biomasa. Se midió la producción de gas por desplazamiento de volumen de agua y se determinó la composición del mismo por cromatografía gaseosa. Se evaluó la composición de ácidos grasos volátiles, alcoholes y azúcares del influente y el efluente del reactor para evaluar cuáles son las rutas metabólicas predominantes, en algunas muestras se determinó también la lactosa.

Mediante la técnica de T- RFLP del gen del ARNr de 16S se determinó la composición microbiana en muestras de la biomasa tomadas cada 15 o 7 días a lo largo de la operación y se correlacionó la flora bacteriana con la performance del reactor. Los organismos predominantes fueron identificados construyendo una biblioteca de clones con los genes que codifican para el ARNr de 16S, a partir de una muestra del reactor obtenida el día 71 y mediante aislamiento de las bacterias predominantes.

Para determinar la incidencia de los microorganismos que entraban con la alimentación (suero de queso crudo diluido) se identificaron los microorganismos de una muestra de alimentación del día 223 mediante la construcción de una librería de clones y mediante aislamiento de las bacterias predominantes.

3.3 Estrategia RLF

En una segunda etapa de este trabajo, se operó un reactor de lecho fijo alimentado con suero de queso en polvo, con agregado de bicarbonato de sodio para ajustar el pH a la entrada.

El reactor se inoculó con suero de queso crudo fermentado por tres días al aire y recirculado tres días más en el reactor de manera de lograr su adherencia al lecho.

Se ensayaron tres cargas orgánicas diferentes, una inicial de 20 g DQO/Ld durante 40 días, 30 g DQO/Ld del día 41 al 46 y 40 g DQO/Ld del día 47 al 56 día en que se desmontó el reactor. El tiempo de residencia hidráulico se mantuvo en 24h y el pH se trató de ajustar a valores cercanos a 5.

3.4 Monitoreo del reactor

Se determinó la DQO de muestras tomadas del influente y efluente aproximadamente 3 veces por semana. También se midieron sólidos suspendidos volátiles del efluente. La producción de gas se midió utilizando un medidor de gas on-line (milligasCounter, Ritter®) y la composición del mismo por cromatografía gaseosa. Se evaluó la composición de ácidos grasos volátiles por HPLC, alcoholes por GC y azúcares (técnica colorimétrica) del influente y el efluente del reactor.

Se evaluó la composición microbiana en muestras de la biomasa tomadas para cada carga de operación mediante T- RFLP del gen del ARNr de 16S de manera de correlacionar la flora bacteriana con la performance del reactor. Los microorganismos predominantes se aislaron e identificaron y se determinó su capacidad de producir hidrógeno.

También se cuantificó la proporción de bacterias productoras de hidrógeno mediante cuantificación del gen de Fe-hidrogenasa utilizando PCR en tiempo real.

4 Materiales y métodos

4.1 Operación y monitoreo del reactor UASB

4.1.1 Reactor UASB

Se utilizó un reactor UASB a escala de laboratorio, cilíndrico, construido de acrílico con un volumen de 4,6 L; 54 cm de altura y cuatro puntos de muestreo a lo largo de su altura. El sistema incluye una bomba que recircula parte del efluente de la parte superior del reactor a la zona inferior ocupada por el lodo (Figura 14). El tiempo de retención hidráulico se fijó en 24 h. El reactor se mantuvo en una cámara termostatizada a 30 °C y el gas producido se midió por desplazamiento de agua.

Se tomaron muestras para análisis de DQO, ácidos grasos volátiles, alcoholes y lactosa del líquido de la entrada y la salida del reactor a lo largo de la operación.

También se tomaron muestras de la biomasa para el análisis de la comunidad microbiana, estas muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

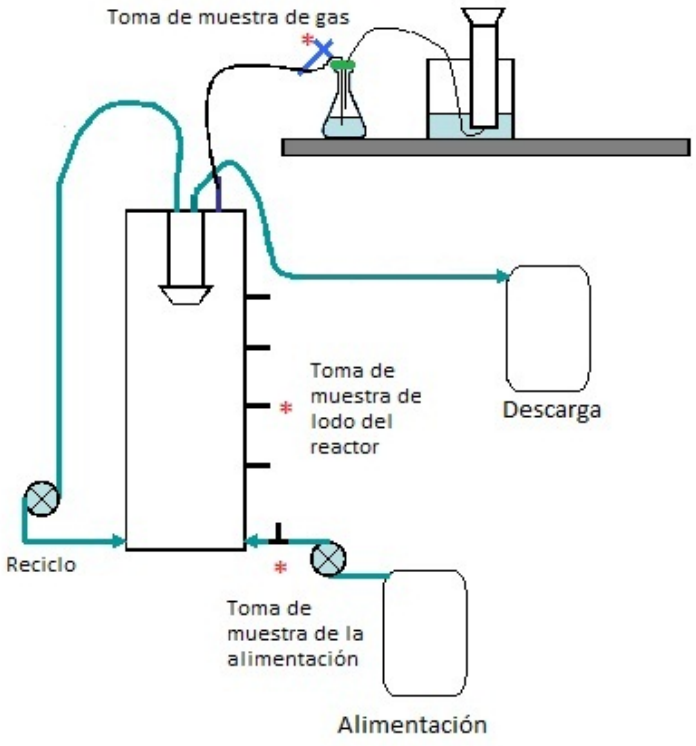

Figura 14- Diagrama del sistema. Reactor UASB.

4.1.2 Sustrato

Como sustrato se utilizó suero de queso crudo, el cual fue recibido desde una industria láctea local una vez por semana y almacenado a 4°C hasta uso. Previo a su ingreso al reactor, el suero fue diluido hasta la concentración de trabajo y suplementado con $NaHCO_3$ (0,3 g $NaHCO_3$/ g DQO) como ajuste del pH.

Composición % (m/m) proporcionada por el fabricante:

- 4,5 de lactosa
- 0,6 de proteína
- 0,07 de materia grasa
- 5,48 sólidos totales

4.1.3 Inóculo

Se utilizó compost de residuos orgánicos sin pretratamiento térmico para inocular el reactor. Previo a la inoculación se determinó la actividad metanogénica. En un trabajo paralelo se determinó la actividad productora de hidrógeno.

4.1.4 Análisis

4.1.4.1 Determinación de actividad metanogénica

Para investigar la presencia de archaeas metanogénicas se realizó un ensayo de actividad metanogénica al compost con el cual se inoculó el reactor previo al arranque del mismo.

Con el ensayo de ACTIVIDAD METANOGÉNICA ESPECÍFICA se determina la capacidad de la biomasa para convertir sustratos en CH_4 y CO_2. Se intenta repetir el proceso de degradación anaerobia, en un recipiente de ensayo trabajando en discontinuo, para evaluar la producción de metano en condiciones preestablecidas. La actividad metanogénica depende de las condiciones experimentales, por lo tanto se deben asegurar condiciones óptimas y constantes durante el ensayo tales como la temperatura, concentración de sustrato y concentración de lodo (Soto, Méndez, & Lema, 1993).

Se determinó la velocidad específica de producción de metano utilizando como sustrato acetato (2 g/L), una concentración de biomasa de 8 g_{SSV}/L , pH=7 a una temperatura de 30°C

con agitación. El ensayo se realizó por triplicado de acuerdo a lo descripto (Soto, Méndez, & Lema, 1993) (Ver Anexo).

4.1.4.2 Demanda química de Oxígeno (DQO)

La DQO de una muestra es una medida de la materia orgánica oxidable químicamente, se mide el oxígeno equivalente necesario para oxidar la materia orgánica presente en dicha muestra que sea susceptible de oxidación (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19º edición).

Se determinó la DQO de muestras tomadas en la entrada del reactor 2 ó 3 veces por semana y a la salida 1 o 2 vez por semana según la técnica especificada en (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19º edición).

4.1.4.3 Determinación de biomasa mediante sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Los sólidos totales (ST) en un agua residual son los residuos resultantes de la evaporación y secado de una muestra en una estufa a 103 – 105ºC. Incluyen los sólidos fijos (SF) que son los que permanecen luego de calcinar la muestra a 550 ± 50ºC y los sólidos volátiles (SV) que son los que se pierden en la calcinación y representan básicamente la materia orgánica presente en la muestra.

Los sólidos suspendidos totales (SST) son aquellos retenidos al filtrar o separados por centrifugación y también pueden dividirse en fijos (SSF) y volátiles (SSV). En el caso de lodos biológicos los SSV son una medida de la cantidad de biomasa.

Se realizó la determinación de los SSV de la salida del reactor 3 veces por semana y dentro del reactor 1 ó 2 veces por semana según la técnica especificada en (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19º edición).

4.1.4.4 Ácidos grasos volátiles y lactosa por HPLC (High-performance liquid chromatography)

Se determinó la concentración de ácidos grasos volátiles en muestras tomadas a la entrada y a la salida del reactor. Para ello se utilizó una columna polimérica ORH-0138-KO apta para determinación de ácidos grasos volátiles según especificaciones del fabricante de la columna, se utilizó un detector UV (Shimadzu 10AD) a 210 nm, la fase móvil fue H_2SO_4 (0,005 M), con una velocidad de flujo de 0,8 mL/min, y la temperatura del horno fue de 45ºC.

Para la detección de lactosa se utilizó el mismo método pero utilizando un detector de IR (Shimadzu, RID-10A)

Previo a la inyección las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm y se filtraron utilizando un filtro de 0,4 micras primero y luego un filtro de 0,2 micras. Se realizaron curvas de calibración con mezcla de ácidos grasos volátiles y con soluciones de diferentes concentraciones de lactosa.

4.1.4.5 Composición del gas de salida por Cromatografía Gaseosa (GC)

Se tomaron muestras del biogás y se determinó la composición (H_2, CH_4 y CO_2) mediante cromatografía gaseosa, utilizando un cromatógrafo SRI 8610 con una columna Molecular Sieve 13x (Chrompack) y detector de Conductividad térmica (TCD). Se realizaron curvas de calibración con estándares a distintas concentraciones de gas Hidrógeno y Metano en Argón.

4.1.4.6 Composición de la comunidad microbiana por T-RFLP

Se analizaron muestras por T-RFLP tomadas de la biomasa del reactor cada una semana o cada 15 días de operación del reactor.

A continuación se describen brevemente los pasos llevados a cabo durante la realización de la técnica de T-RFLP. El protocolo se detalla en el anexo 1.

Extracción de ADN

Se separaron las células de las muestras mediante centrifugación (10 min a 3000 rpm) y se extrajo el ADN (de 0,5 g de células) utilizando el kit UltraClean™ DNA extraction kit forsoil (MoBio Laboratories, inc) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se verificó la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8%) teñido con bromuro de etidio, fotografiado con un sistema de captura de imágenes.

Reacción de PCR

Se amplificó el gen del ARNr de 16S utilizando cebadores específicos 27F y 1492R (Edwards, Rogall, Blocker, Emde, & Bottger, 1989) (Muyzer, Teske, Wirsen, & Jannasch, 1995). El cebador "forward" fue marcado en 5´ con 6-carboxi-fluoresceína. La purificación del producto de PCR, cuantificación, digestión con enzima de restricción y purificación de los fragmentos se realizaron de acuerdo a lo descripto por Pycke y col. (Pycke, Etchebehere, Van De Caveye, Negroni, Verstraete, & Boon, 2010) y se detallan en el Anexo 1.

Separación de fragmentos

La separación y detección de los fragmentos se realizó utilizando un secuenciador 3130 (Applied Biosystems) en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo, utilizando el marcador interno GeneScan -500 Liz (Applied Biosystems).

Análisis de datos

Los cromatogramas se analizaron con el software Peak Scanner v.1.0 (Applied Biosystems) y se estandarizaron de acuerdo a lo propuesto por Dunbar y col. (Dunbar, Ticknor, & Kuske, 2001). Se realizó análisis de Cluster utilizando el programa PAST (Hammer, 2001).

4.1.4.7 Clonado y análisis filogenético de genes del ARNr de 16S

La técnica de clonado y secuenciación del gen del ARNr de 16S se utilizó para determinar la composición microbiana de la biomasa del reactor y para conocer los microorganismos que entran con la alimentación. Para ello se separaron las células por centrifugación de una muestra de la biomasa del reactor tomada el día 71 y de 1,6 L de la alimentación preparada con suero crudo el día 223.

La extracción de ADN se realizó como se describió previamente. El gen del ARNr de 16S se amplificó con el mismo método utilizado para el T-RFLP pero con los cebadores sin marcador fluorescente. El clonado (usando TOPO TA cloning kit, Invitrogen) y la secuenciación usando el primer M13 forward se realizaron en el servicio brindado por Macrogen Ltd. Sequencing Service (Korea).

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias depositadas en bases de datos utilizando la herramienta BLAST del National Center for Bioinformatic (NCBI) y la herramienta Classifier del Ribosomal Database Project (RDP) (Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007). Las secuencias con similitud mayor de 97% se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU).

A partir de las secuencias, se determinó el número de nucleótidos del fragmento 5' obtenido por digestión "in sillico" con la enzima utilizada en el T-RFLP de manera de identificar los picos.

4.1.4.8 Análisis filogenético

Se seleccionaron secuencias representativas y se alinearon, junto a secuencias relacionadas obtenidas de la base de datos NCBI, con el programa Clustal W. Se construyeron árboles filogenéticos con el método Neighbour-Joining a partir del programa MEGA 5 (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, & Kumar, 2011), se utilizó el modelo de distancia Maximum

Composite Likelihood. Se llevó a cabo el análisis de 1000 réplicas de bootstrap para estimar la robustez de los árboles.

4.1.4.9 Aislamientos

Se realizaron aislamientos por la técnica de estriado en placas de TSA (Difco) y en medio agar con suero de queso esterilizado como sustrato (concentración 30 g/L). Las colonias con morfología diferente se repicaron a placas de TSA sucesivamente hasta observar una única morfología celular en el microscopio. A las cepas puras se les realizó el ensayo de óxido-fermentación (OF) de manera de determinar su capacidad para respirar o fermentar la glucosa. Los cultivos fueron incubados aeróbicamente a 30^{o}C.

4.1.4.10 Extracción de ADN de cultivos puros

Se extrajo el ADN de los cultivos en medio sólido haciendo una suspensión de las colonias en suero fisiológico estéril, se separaron las células mediante centrifugación (3000 rpm, 10 min) y se extrajo el ADN utilizando el Kit de extracción: DNA Wizard extraction kit (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.1.4.11 Amplificación y secuenciación del gen que codifica el ARNr16S de los aislamientos

Se amplificó el gen que codifica para el ARN ribosomal 16S por la técnica de PCR utilizando los primers universales 27F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´), posiciones 8±27 (según numeración de *E.coli*) y 1522R (5´-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3´), posiciones 1522±1542.

Las concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción de 50 μL con 2,2 μL de muestra de ADN y el ciclo utilizado en el PCR se detallan en el Anexo 1.

Se verificó el tamaño del amplificado (1500 bp) mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) teñido con bromuro de etidio (Anexo 1).

El producto de la amplificación por PCR fue purificado y secuenciado por Macrogene Ltda. Sequencing Service (Korea).

4.2 Operación y monitoreo del Reactor de lecho fijo

La operación del Reactor de lecho fijo y los análisis químicos fueron realizados en una pasantía de investigación en el Departamento de Hidráulica y Saneamiento-USP- Brasil, los análisis microbiológicos fueron realizados en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química y Facultad de Ciencias de la UdelaR.

4.2.1 Reactor de lecho fijo

Se utilizó un reactor de acrílico de 8,0 cm de diámetro interno, 8,8 cm de diámetro externo y 75 cm de altura (Figura 16). Dos placas de acero inoxidable dividen al reactor en tres compartimientos: zona de abajo (entrada del influente), zona del lecho donde se encuentra el material soporte y zona de salida donde se separa la fase gaseosa de la líquida. El reactor posee 7 puntos de muestreo.

El volumen útil del reactor es de 3,75 L y el volumen útil con relleno de 2,50 L.

El reactor se operó con un tiempo de retención hidráulico de 24 h y fue mantenido en una cámara a una temperatura de 30^{o}C.

El material soporte utilizado fue polietileno de baja densidad (Figura 15), con las siguientes dimensiones aproximadas, 10:10:20 mm y con un índice de uniformidad de 1,26, lo que demuestra que el mismo es muy uniforme, ensayo realizado y descrito por (Peixoto, 2008).

Figura 15- Detalle de material soporte. Referencia: (Peixoto, 2008).

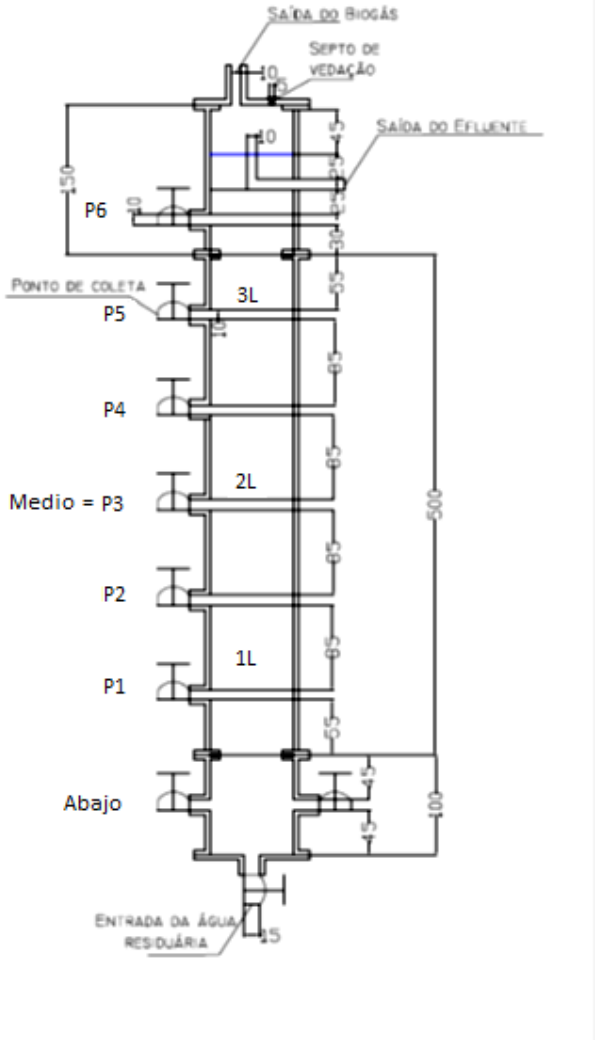

Figura 16- Esquema del reactor anaerobio de lecho fijo para producción de hidrógeno con la nomenclatura utilizada para los puntos de muestreo. Unidades: mm. Fuente: Departamento de Hidráulica y Saneamiento-USP- Brasil.

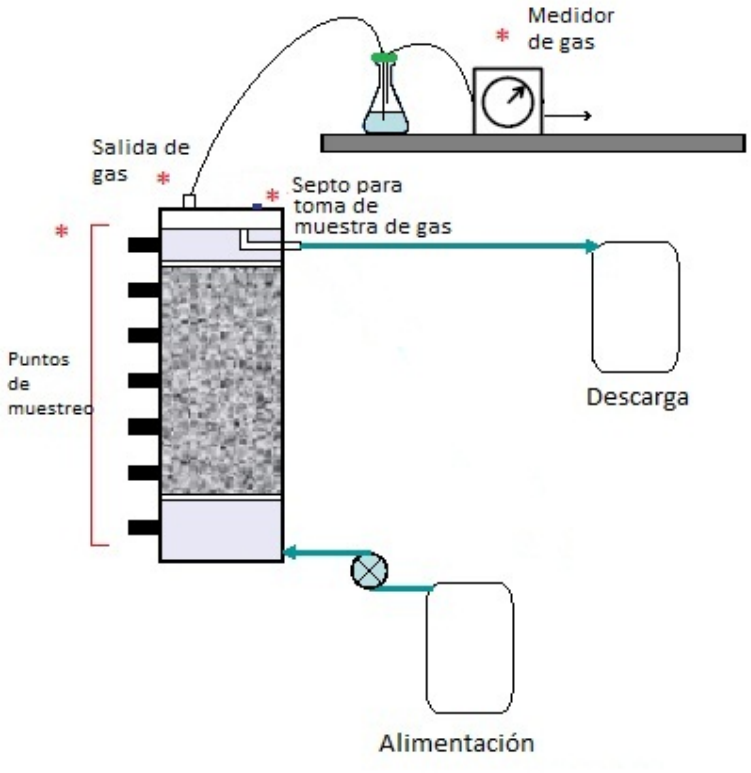

Figura 17- Diagrama del sistema. Reactor de lecho fijo.

4.2.2 Muestreo del reactor

Se tomaron muestras de la biomasa del reactor en las diferentes condiciones de operación según se especifica en la Tabla 8.

Tabla 8- Muestreo del reactor de lecho fijo

Día	Carga (gDQO/Ld)	Punto de muestreo
0	Inóculo. Suero crudo fermentado al aire 3 días y recirculado en el reactor 3 días más.	----
40	Carga 20 g /L	Abajo y Medio
47	Carga 30 g/L	Abajo y Medio
54	Carga 40g/L	Abajo y Medio
56	Carga 40g/L	Abajo , P1 , P2, P3, P4, P5 y P6

Como se especifica en la Figura 18 se tomaron muestras al final de la operación en diferentes zonas del reactor utilizando la siguiente nomenclatura:

- Cámara de mezcla de abajo (AB)
- Zona del lecho (*) (ZL)
- Superficie del lecho (**) (SL)

(*) Muestra compuesta por 6 muestras (P1 a P6)

(**) Muestra compuesta por 3 muestras (L1, L2, L3)

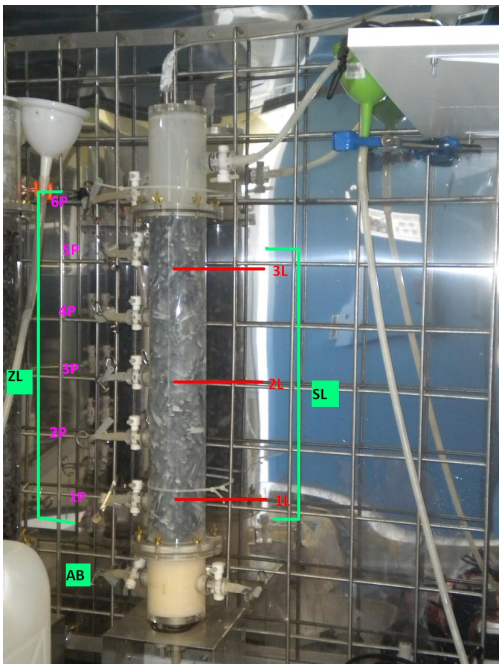

Figura 18- Esquema de muestreo final del reactor (día 56).

4.2.3 Sustrato

La alimentación del reactor se preparó a partir de suero de queso en polvo diluido en agua con agregado de bicarbonato de sodio, en una relación tal que se obtengan los valores de DQO requeridos y el pH adecuado en el influente.

Tabla 9- Carga (gDQO/Ld) y TRH a la que se operó el reactor en cada etapa.

Día	TRH (h)	Carga (gDQO/Ld)
1-40	24	20
41-47	24	30
47-56	24	40

Relación g bicarbonato de sodio /g suero = 0,3 – 0,6. La cantidad de bicarbonato se determinó en función del pH de la salida determinado antes de alimentar nuevamente el reactor.

Tabla 10- Composición del suero en polvo (valores en 100 g) Suministrada por el fabricante.

Componente	Peso
Carbohidratos (g)	72
Proteínas (g)	11
Grasa tot. (g)	2,0
Grasa sat. (g)	1,5
Grasa trans (g)	0
Fibra alim. (g)	0
Calcio (mg)	440
Sodio (mg)	675

4.2.4 Inóculo

El inóculo se generó por fermentación natural del suero de queso crudo durante 3 días al aire, la biomasa generada se recirculó durante 3 días en el reactor de manera de lograr la adherencia de la biomasa al soporte. El suero de queso crudo fue suministrado por una fábrica de producción de queso de la ciudad de *São* Carlos, Brasil.

Se realizó la caracterización del suero crudo tal cual llegó de fábrica y se obtuvo la siguiente composición:

pH= 6,76

SST= 8,84g/L

SSV= 8,78g/L

DQO = 85494 mgDQO/L

4.2.5 Análisis

4.2.5.1 Demanda química de Oxígeno (DQO)

Se determinó la DQO de muestras tomadas en la entrada y salida del reactor a lo largo de la operación y de la cámara de abajo y de todos los puntos de muestreo el último día de operación antes de desmontar el reactor, según la técnica especificada en (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19º edición).

4.2.5.2 Determinación de biomasa mediante sólidos suspendidos volátiles (SSV)

Se realizó la determinación de los SSV de la salida del reactor 2 veces por semana y sólidos totales de la zona de abajo, de la del lecho y de la superficie del soporte el último día de operación, según la técnica especificada en (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19º edición).

4.2.5.3 Ácidos grasos volátiles por HPLC

Para la determinación de ácidos orgánicos por HPLC se utilizó una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H (longitud de 0,3m y 7,8 mm de diámetro interno), un detector de UV con una matriz de diodos de 205nm, como fase móvil H_2SO_4 (0,005 M), la velocidad de flujo de 0,8 mL/min y el horno a una temperatura de 62^oC.

4.2.5.4 Determinaciones por GC

El análisis del porcentaje de hidrógeno y de metano en el biogás se realizó en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010, equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) con una columna Carboxen (1010 plot 30 m X 0.53 mm) y argón como gas portador. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 220°C y 230°C respectivamente y la de la columna fue de 130°C con velocidad de calentamiento de 46°C / min hasta 135°C.

Las concentraciones de etanol se midieron por cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC- 2010, equipado con un detector de ionización de llama y muestreador automático para head-space COMBI-PAL (columna AOC modelo 5000 y HP

INNOWAX de 30 mx 0,25 mm x 0,25 m μ de espesor de la película), de acuerdo con (Maintinguer, Fernandes, Duarte, Saavedra, Adorno, & Varesche, 2008).

4.2.5.5 Determinación de lactosa

La lactosa fue determinada en muestras del líquido tomadas a la entrada y salida del reactor por el método colorimétrico (Dubois, Gilles, Hamilton, P, & Smith, 1956).

Los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos, y sus derivados, incluyendo metil - éteres, con grupos reductores libres o potencialmente libres, dan un color amarillo-anaranjado tratados con fenol y ácido sulfúrico concentrado. La reacción es sensible y el color es estable. Según sea el azúcar se mide la absorbancia a determinada longitud de onda. En el caso de la lactosa se realiza la medición a 490 nm (Dubois, Gilles, Hamilton, P, & Smith, 1956).

4.2.5.6 Composición de la comunidad microbiana por T-RFLP del gen del ARNr de 16S

Se analizaron muestras por T-RFLP tomadas a las distintas cargas en que fue operado el reactor los días 40, 47,54 y 56 de la zona de abajo y del medio. También se analizó por T- RFLP una muestra del inóculo tomada el día 0 de operación.

4.2.5.7 PCR en tiempo real

Se determinó la proporción de microorganismos con el gen que codifica para la Fe-Fe hidrogenasa por Real- Time PCR de muestras tomadas de la cámara de abajo, de la zona que contiene el lecho y de la superficie del lecho.

Preparación de los estándares a partir de diluciones de ADN genómico

Se trabajó con un clon del gen de la enzima hidrogenasa A10. Este clon proviene del clonado de este gen a partir de una muestra de un reactor UASB metanogénico cuya biomasa fue utilizada para inocular los reactores de producción de hidrógeno del trabajo (Castelló, Bonner, Crolla, Paolino, & Borzacconi, 2008). Los estándares se prepararon realizando diluciones sucesivas 1:10. Para construir la curva de calibración se utilizaron las siguientes diluciones que corresponden a la concentración de Fe- Fe hidrogenasa.

Tabla 11- Diluciones utilizadas para la construcción de la curva de calibración y sus respectivas concentraciones de Fe- Fe Hidrogenasa.

Dilución	Copias de A10/μL
Dil -6	5,13E+04
Dil -7	5,13E+03
Dil -8	5,13E+02
Dil -9	5,13E+01

El número de copias de Fe- Fe hidrogenasa que contenía el estándar se realizó de la siguiente manera:

La Fe- Fe Hyd tiene 313 pb* 660 g/mol pb =2,06 E 5 g/mol hyd

Se midió la concentración de ADN del estándar sin diluir con el equipo Qubit (Qiagen) según las indicaciones del fabricante.

Concentración de ADN del estándar medida con Qubit= 1,76E-8 g/μL

(1.76E-8 g ADN/ μL) / (2,06 E 5 g/mol hyd) = 8,52E-14 mol hyd/ μL

8,52E-14 mol hyd/ μL * 6.02E23molec/mol= 5,13E10 moléculas hyd/ μL

→ *8 μL en la mezcla de reacción →N° de copias de hyd en la reacción de PCR

Mezcla de reacción

Cebadores (*primers*)

HydA-F (5'-TCACCACAACAAATATTTGGT-3')

HydA-R (5´-GCTGCTTCCATAACTCC-3')

Preparación de la mezcla de reacción para SYBR Green

Se preparó la mezcla de reacción en un único tubo considerando el número de muestras para analizar, las concentraciones de las soluciones stock, las concentraciones finales óptimas para los cebadores y la master mix. La solución Master Mix es un cóctel de reactivos que contiene: dNTPs con dUTPs (SYBR Green), ADN polimerasa, cloruro de magnesio, buffer y fluorocromo verde.

Para un tubo de reacción de PCR se utilizó el siguiente volumen de reactivos:

Tabla 12- Volumen de reactivos para 1 reacción de PCR.

Reactivo	Volumen (μL)
SYBR green	10
Primer HyD fow	1
Primer Hyd rev	1
tot master mix	12
ADN	8
Vol Total	20

Carga de los tubos de reacción

Una vez preparada la mezcla de reacción se distribuyeron 12 μL en tubos especiales para Real Time PCR. Se procedió a agregar 8 μL de la muestra de ADN y se homogeneizó con la pipeta. Se taparon los tubos y se colocaron en el equipo para Real Time PCR.

Se realizó un control negativo para detectar contaminación cruzada y un control positivo a partir de una cepa perteneciente al género *Clostridium*.

Las muestras y los controles se realizaron por duplicado.

Puesta en marcha del equipo

El equipo utilizado fue el *Rotor-Gene 6000* de Corbett Life Science. Se cargó el programa *SYBR hidrogenasa* que ya tenía incorporados las condiciones de temperatura y los tiempos de reacción. Se verificó que las condiciones fuesen las siguientes:

Tabla 13- Ciclo utilizado en la reacción de Real Time PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo
Hold	50°C	2 min
Hold 2	95°C	1 min
Ciclo	95°C 52°C 72°C	30 seg 30 seg 30 seg
Melt	Rampa 55°C – 95°C subiendo de a 1°C	5 seg

Se indicó en el software la posición de los tubos y definió cuáles eran estándares (con la cantidades de moléculas blanco), desconocidos o controles (NTC).

El ensayo duró aproximadamente 1,5 horas. Posteriormente, se analizaron los resultados, para lo cual fue establecido el umbral de fluorescencia automáticamente por el software (Threshold) y se fijó una línea de base.

Se obtuvo la curva de calibración C_T en función Log [conc]. El valor de $\mathbf{C_T}$ es el punto de intersección de la curva Intensidad de fluorescencia en función del número del ciclo (gráfico no mostrado) con el valor de **Threshold**. El valor de threshold se calcula como el promedio de la intensidad de fluorescencia en la zona de ruido.

A partir de este valor de C_T se calculó el número de copias de Fe- Fe Hyd en las muestras problema.

Se analizó la temperatura de melting del producto de PCR en un paso posterior. Durante este proceso se utilizó un gradiente de temperatura de 60°C a 90°C, aumentando de a 1°C por vez con una diferencia de 5 segundos entre cada grado, donde se midió la intensidad de fluorescencia del fragmento de ADN. La curva representa la derivada de la intensidad de la fluorescencia sobre la derivada de la temperatura (dF/dT) en el eje de las abscisas y la temperatura en el eje de las ordenadas (T). El máximo de la curva indica la temperatura de melting, Tm del fragmento de ADN amplificado por los primers.

Con las curvas de Melting obtenidas se verificó la ausencia de amplificaciones no deseadas ya que solo se observó un máximo en las gráficas.

4.2.5.8 Aislamientos

Para estudiar los microorganismos de la biomasa se realizaron aislamientos siguiendo diferentes estrategias y medios de cultivo. Para aislar los microorganismos heterótrofos aerobios o facultativos se utilizó placas de medio rico (TSA, Difco) incubadas en aerobiosis (métodos 1 y 2). Para aislar bacterias lácticas se utilizó aislamiento en placa en medio MRS (Difco) específico para este tipo de bacterias (método 3). Para aislar los microorganismos anaerobios se utilizó medio PYG en condiciones anaeróbicas. Para favorecer el aislamiento de bacterias esporuladas anaeróbicas (como las bacterias del género *Clostridium*) se realizó un shock térmico de la muestra para eliminar las células vegetativas y favorecer la esporulación (métodos 4 y 5).

Método 1-Siembra en superficie en TSA

Se procedió a la siembra en superficie de 0,1 mL de diluciones (1/10) de la muestra en placas con medio TSA. Para cada muestra se seleccionaron las colonias con morfología diferente de las placas que presentaron crecimiento. Cada una se re-aisló en una nueva placa de TSA. Se realizaron aproximadamente 3 o 4 sub-cultivos hasta observar un solo tipo de morfología de colonia y de células al microscopio. Se incubaron en condiciones aerobias a 30°C.

Método 2-Aislamiento directo en TSA

Se procedió a la siembra en superficie por estrías sin realizar dilución previa, utilizando una placa de TSA por muestra. Para cada muestra se seleccionaron las colonias con morfología diferente. Cada una se re-aisló en una nueva placa de TSA. Se realizaron aproximadamente 3 o 4 sub-cultivos hasta observar un solo tipo de morfología de colonia y de células al microscopio. Se incubaron en condiciones aerobias a 30°C.

Método 3- Siembra en superficie en MRS

Se procedió a la siembra en superficie de 0,1 mL de diluciones de la muestra en medio MRS (Difco). Para cada muestra, se seleccionaron las colonias con morfología diferente. Cada una se re aisló en una nueva placa de MRS. Se realizaron aproximadamente 3 o 4 sub-cultivos hasta observar un solo tipo de morfología de colonia y de células al microscopio. Se incubaron en atmósfera enriquecida en CO_2, a 30°C.

Método 4- Aislamiento directo en PYG' con tratamiento térmico de la muestra

La muestra fue tratada térmicamente 15 minutos a ebullición. Se procedió a la siembra en superficie con ansa estriando la muestra sin realizar dilución previa, utilizando una placa de PYG' por muestra. Para cada muestra, se seleccionaron las colonias con morfología diferente. Cada una se re-aisló en una nueva placa de PYG'. Se sub-cultivó a PYG líquido en vial anaerobio gaseado con Argón, hasta observar un solo tipo de morfología de células al microscopio. Las placas se incubaron en condiciones anaerobias utilizando el sistema GENbag (Biomerieux). Todas las incubaciones se realizaron a 30°C.

Método 5 - Aislamiento en viales de PYG' con tratamiento térmico previo de la muestra

La muestra fue tratada térmicamente 15 minutos a ebullición. Se realizaron diluciones (1/10) de la muestra en suero fisiológico. De las diluciones seleccionadas en cada caso se inoculó 1 mL en vial con medio PYG con atmósfera anaerobia (previamente gaseado con Argón). Del último vial que presentó crecimiento se realizaron diluciones sucesivas en PYG líquido anaerobio. Se repitió este paso hasta que en el último vial que presentó crecimiento se observó una única morfología celular al microscopio. Se sub-cultivó a placa con medio PYG'. De una colonia se volvió a pasar a vial anaerobio de PYG'. Las placas se incubaron en condiciones anaerobias utilizando el sistema GENbag (Biomerieux). Todas las incubaciones se realizaron a 30^{o} C.

Método 6 - Aislamiento en viales de PYG' sin tratamiento térmico previo de la muestra.

Se realizaron diluciones (1/10) de la muestra en suero fisiológico (Tabla 14). De las diluciones seleccionadas en cada caso se inoculó 1 mL en viales con medio PYG´ anaerobio gaseado con Argón. Del último vial que presentó crecimiento se realizaron diluciones sucesivas en PYG´ líquido anaerobio. Se repitió este paso hasta que en el último vial que presentó crecimiento se observó una única morfología celular al microscopio. Se sub-cultivó a placa con medio PYG'. De una colonia aislada se volvió a sub-cultivar a un vial con medio PYG' en condiciones anaeróbicas. Las placas se incubaron en condiciones anaerobias utilizando el sistema GENbag (Biomerieux). Todas las incubaciones se realizaron a 30°C.

Tabla 14- Esquema de los métodos para aislar utilizados para cada muestra y diluciones sembradas.

Método	Muestra	Diluciones
1	ZL	-4,-5,-6,-7
	SL	-3,-4,-5,-6
	Abajo	-5,-6,-7,-8
2	Abajo y P1 a P6	-
3	ZL	-3,-4,-5,-6
	SL	-3,-4,-5,-6
	Abajo	-4,-5,-6,-7
4	Ab, ZL, SL	-
5	ZL	-2,-3,-4,-5,-6,-7
	SL	-2,-3,-4,-5,-6,-7
	Abajo	-3,-4,-5,-6,-7
6	ZL	-5, -6, -7,-8,-9, -10
	SL	-5, -6, -7,-8,-9, -10
	Abajo	-8,-9,-10,-11,-12

4.2.5.9 Extracción de ADN de cultivos puros

Para extraer el ADN a partir de los cultivos anaerobios líquidos, se tomaron muestras de los cultivos frescos (3 mL aproximadamente), se separaron las células mediante centrifugación (3000 rpm, 10 min) y se extrajo el ADN utilizando el Kit de extracción: DNA Wizard extraction kit (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La extracción de ADN de los cultivos en placa se realizó utilizando el mismo kit como se describió previamente.

4.2.5.10 Amplificación y secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S y análisis filogenético

Los aislamientos se caracterizaron mediante el estudio de la secuencia del gen del ARNr de 16S, la amplificación por PCR, la secuenciación y el análisis filogenético se realizó como se describió previamente.

5 Resultados UASB

5.1 Operación del reactor

5.1.1 Etapas de operación

El reactor fue operado durante 99 días a una carga de 20 gDQO/Ld, con una parada intermedia por problemas operacionales. El día 182 (a partir del primer arranque) se retomó la operación a una carga de entrada de 20 gDQO/Ld y a partir del día 196 con 30 gDQO/Ld. Se intentó aumentar la carga a 40 gDQO/Ld el día 226, pero se produjo una caída abrupta del pH deteniéndose la producción de gas. Se decidió detener la operación el día 243. Sin embargo entre los días 226 y 243 se intentó estabilizar la operación variando la carga ante la respuesta no favorable del sistema debido a la subida a 40 gDQO/Ld del día 226 (Tabla 15).

Tabla 15- Esquema de la operación del reactor.

Días	Observaciones
0-6	Arranque en batch. Carga inicial= 20 gDQO /Ld , SSV inicial= 10g/L.
7-99	Operación en continuo. Carga = 20 gDQO/Ld.
100-181	Parada en la operación. El lodo fue almacenado a 4^{o}C.
182	Se retomó la operación.
192	La alimentación se comenzó a almacenar a 4^{o}C antes de su entrada al reactor.
196	Se subió la carga de entrada a 30 gDQO/Ld.
226	Se subió la carga de entrada a 40 gDQO/Ld.
243	Se detuvo la operación.

La operación fue dividida en 3 etapas que se detallan en la Tabla 16, en la etapa 1 y 2 se buscó que la carga orgánica a la entrada del reactor fuese de 20 gDQO/Ld. La etapa 2 comenzó el día 182, cuando se re-arrancó el reactor. Cabe señalar que a partir del día 192 la solución de alimentación comenzó a almacenarse a 4^{o}C previo a su entrada al reactor. En la etapa 3 se alimentó el reactor a una carga de 30 gDQO/Ld. Los resultados correspondientes al período entre los días 226 y 230 ,si bien se muestran en los gráficos, no se consideraron como una etapa ya que no se logró estabilizar la operación a la carga aplicada de 40 gDQO/Ld.

Tabla 16- Promedios de carga, pH, caudal de gas (Qg), proporción de hidrógeno en el biogás en %, rendimiento en hidrógeno en cada etapa de la operación del reactor expresado en moles de H_2/mol de lactosa.

Etapa	Días	Carga (gDQO/Ld)	pH	Qg (L/d)	H_2 (%)	Velocidad de producción de H_2 (LH_2/Ld)	Rendimiento (moles de H_2/mol de lactosa)
1	7-99	17,45	4,9	5,17	13,5	0,14	0,23
2	182-195	21,9	4,8	7,18	19,5	0,36	0,72
3	196 - 225	27,3	5,1	15,5	26,4	0,66	0,71

Si bien los valores en cada etapa presentaron grandes variaciones, se calculó el promedio informando la desviación estándar, de manera de poder comparar la producción e hidrógeno obtenida en este reactor con otros trabajos.

5.1.2 pH

En la etapa 1 de operación se observaron valores de pH de entrada menores que en las 2 etapas siguientes, ya que si bien se agregó bicarbonato de sodio para ajustar el pH a valores entre 6,5 y 7,7, al estar el bidón de alimentación a temperatura ambiente las bacterias del suero y las que puedan haberse incorporado del ambiente produjeron la acidificación del influente junto con una disminución del pH previo a su entrada al reactor. A partir del día 192 la alimentación se mantuvo a 4°C, razón por la cual en las etapas 2 y 3 la alimentación ingresó a un pH mayor (Tabla 17, Figuras 19 y 20).

Tabla 17-Valores promedio de pH de entrada (pHe) y pH de salida (pHs) con su desviación estándar asociada en cada etapa de operación.

Etapa	pHe	Desv. estándar	Número de muestras	pHs	Desviación estándar	Número de muestras
1	4,9	0,92	51	4,9	0,5	56
2	5,6	0,99	9	4,8	0,5	11
3	6,9	0,45	26	5,1	0,8	27

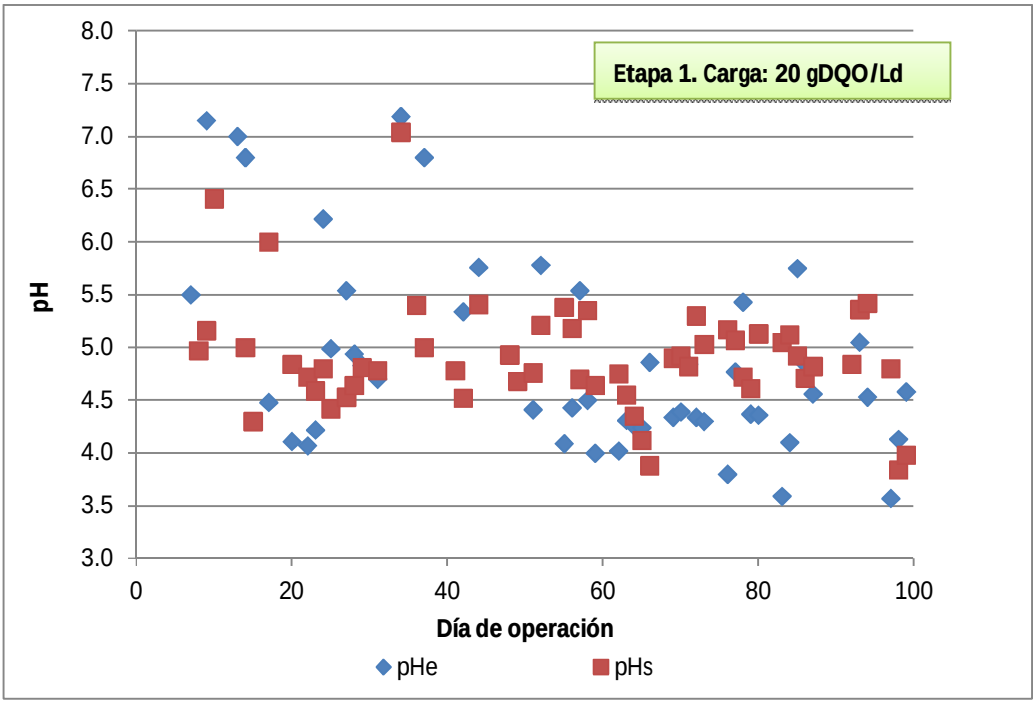

Figura 19- pH entrada y pH salida durante la operación entre los días 7 y 99 (Etapa 1).

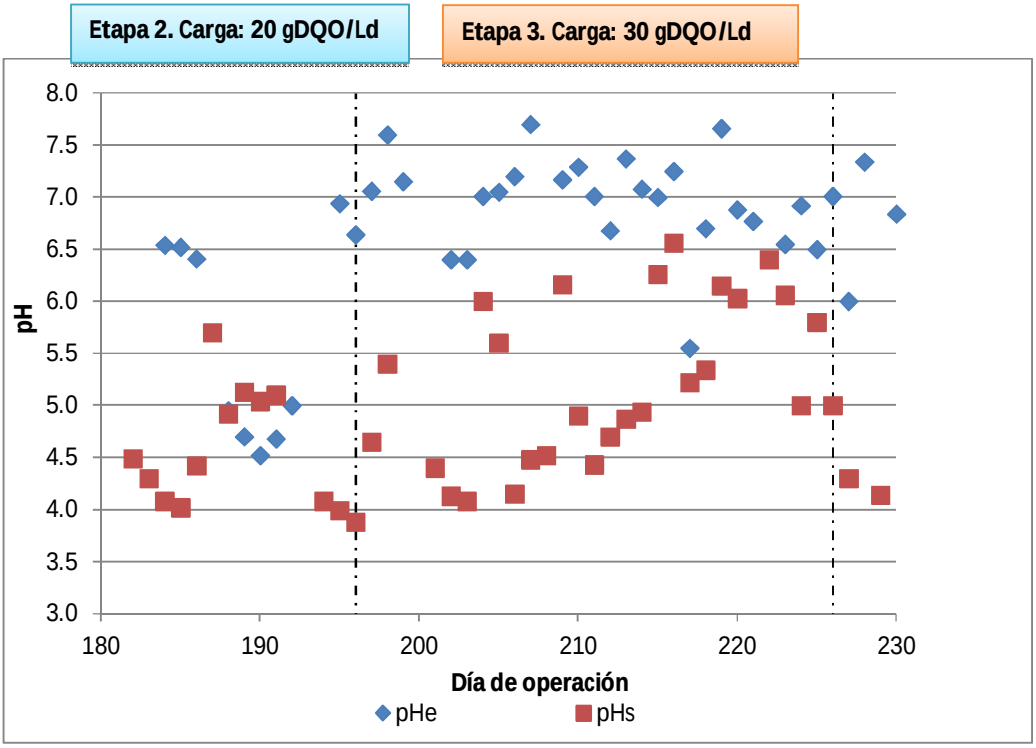

Figura20- pH entrada y pH salida durante la operación entre los días 182 y 230 (etapa 2 y 3).

5.1.3 Carga orgánica aplicada

La carga real aplicada al reactor presentó oscilaciones que se debieron principalmente a variaciones en la concentración (medida en DQO) del influente, debido a que el reactor se alimentó con suero crudo que presentó diferencias en la concentración por tratarse de un efluente industrial y no de una preparación sintética. En menor medida, estas variaciones responden a la fermentación natural del suero durante el almacenamiento como se verá más adelante y variaciones del flujo volumétrico (Figuras 21 y 22).

La cantidad de biomasa dentro del reactor (expresada en gSSV) se mantuvo en una concentración media de 10 g/L, purgando el exceso de biomasa cuando fue necesario.

La relación F/M fue de 2 gDQO/gSSVd en las etapas 1 y 2 y de 3 gDQO/gSSVd en la etapa 3.

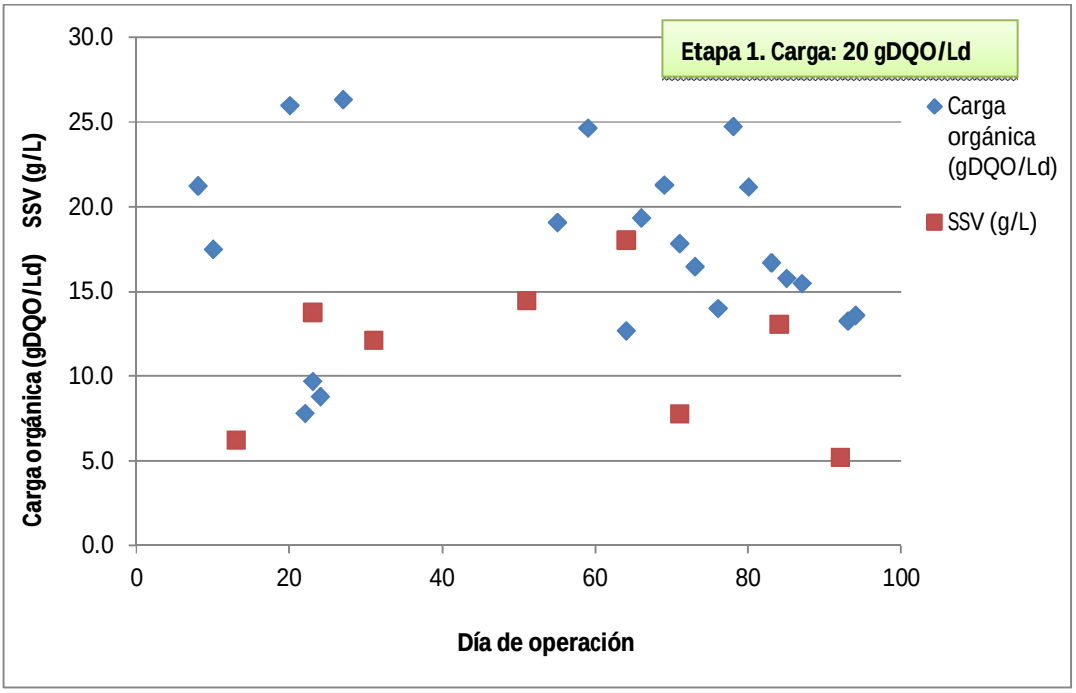

Figura21- Carga orgánica y biomasa dentro del reactor (SSV) durante la operación entre los días 7 y 99 (etapa 1).

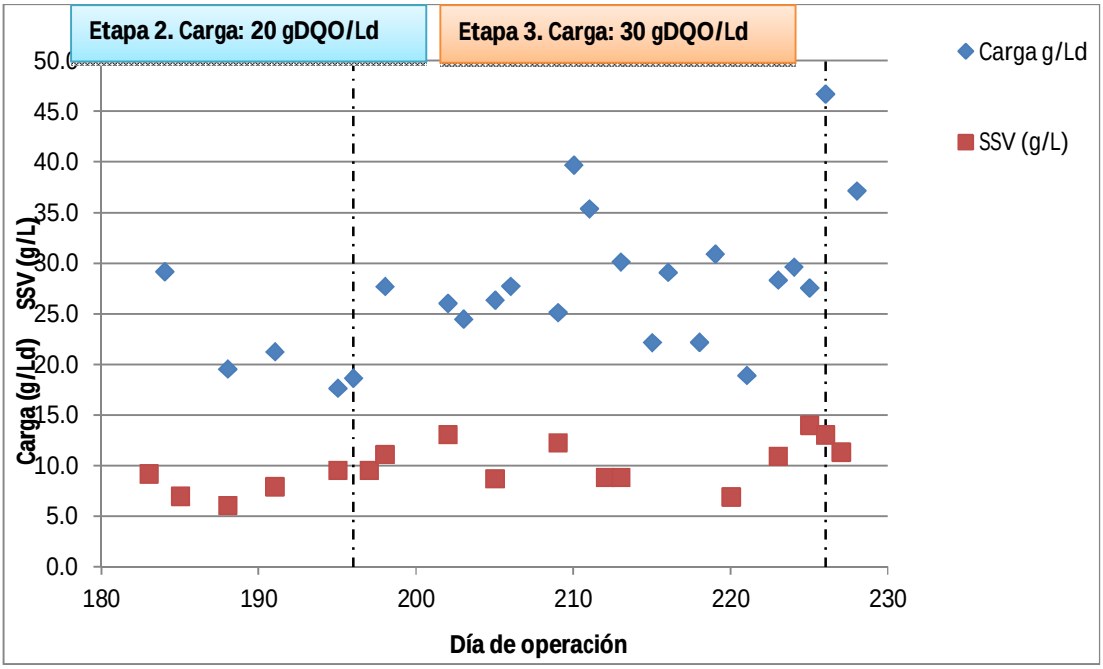

Figura 22- Carga orgánica y biomasa dentro del reactor (gSSV) durante la operación entre los días 182 y 230 (etapas 2 y 3).

5.1.4 Producción de gas

Se detectó la producción de gas a partir del día 7 de operación, el valor máximo promedio de caudal de gas producido se observó en la etapa 3 con 15,5 L/d pero con una variación muy alta (desviación estándar de 10,2; número de muestras = 25). El valor puntual máximo de caudal de gas medido se detectó también en la etapa 3 con un valor de 39,4 L/d. La producción de gas presentó en general grandes oscilaciones durante toda la operación (Figuras 23 y 24).

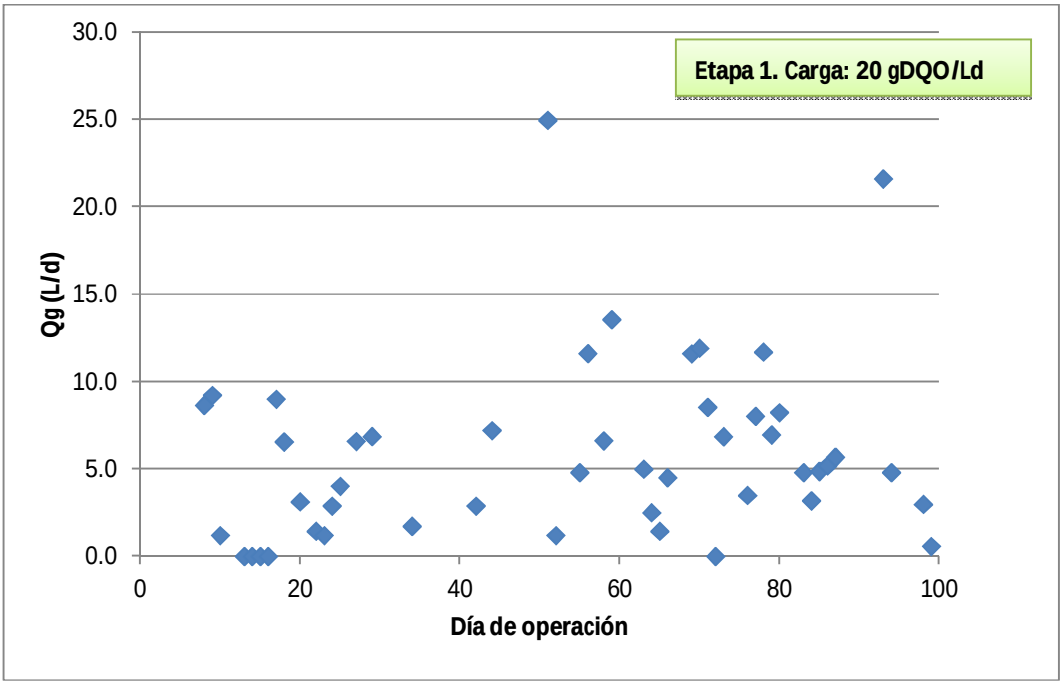

Figura 23- Caudal de gas producido durante la operación entre los días 7 y 99.

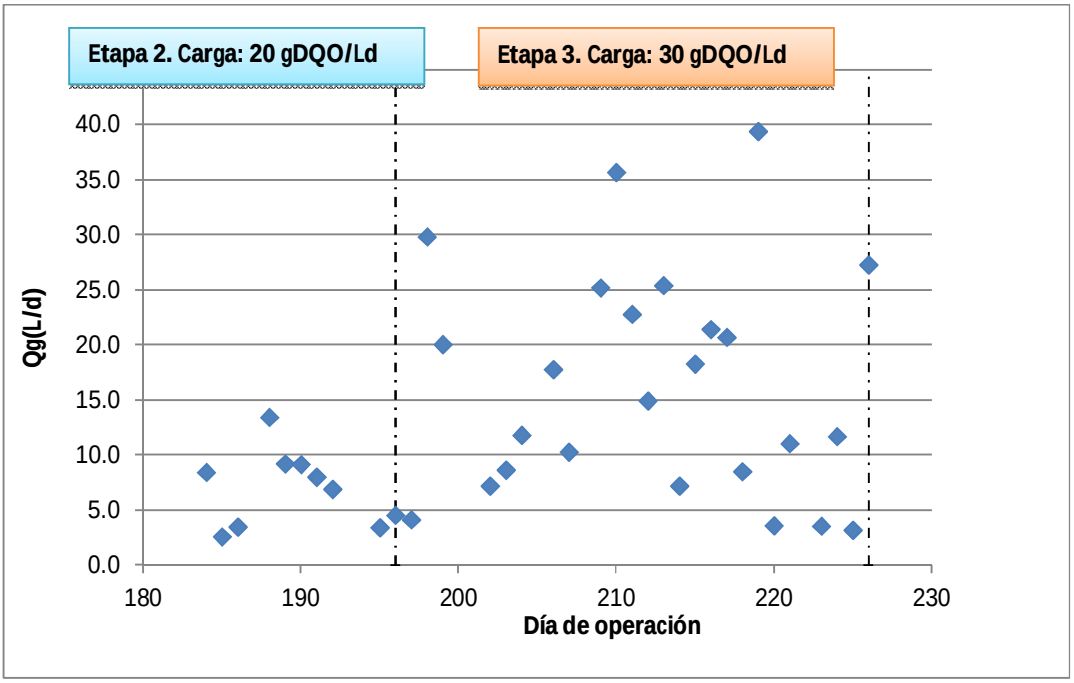

Figura 24- Caudal de gas producido durante la operación entre los días 182 y 230.

Se detectó hidrógeno en el biogás desde el día 7 de operación (Figuras 25 y 26), la proporción de hidrógeno en el biogás varió entre 1,7 y 30,2%. En la etapa 3 se observó la máxima velocidad de producción de hidrógeno presentando un valor promedio de 0,7 LH_2/Ld (Figura 26). La máxima velocidad de producción de hidrógeno se observó puntualmente el día 210 con 2,0 LH_2/Ld.

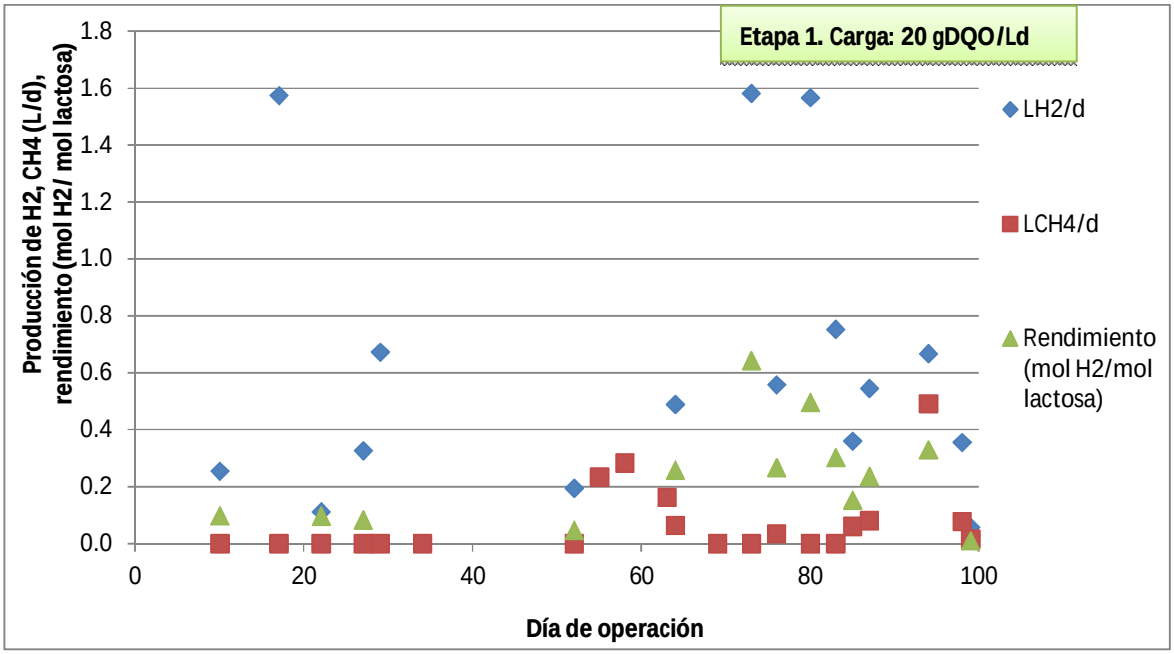

Figura 25- Producción de H_2 y CH_4(L/d), rendimiento en H_2 (expresado en moles de H_2/mol de lactosa) durante la operación del reactor entre los días 7 y 99 (etapa 1).

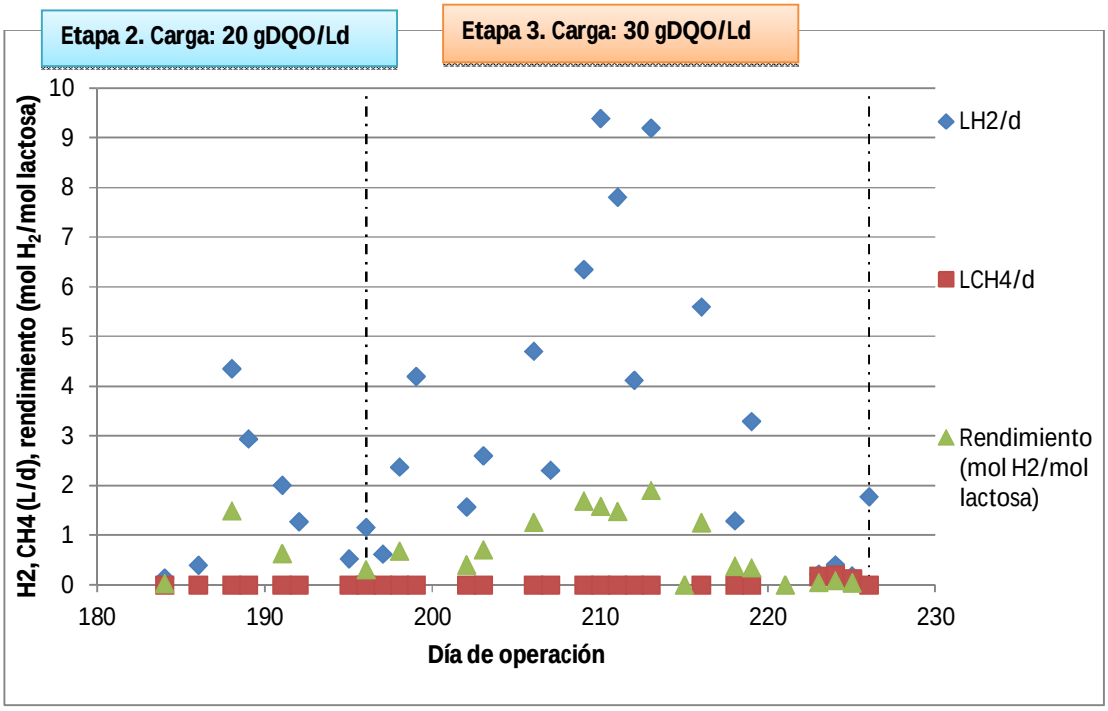

Figura 26- Producción de H_2 y CH_4 (L/d), rendimiento en H_2 (expresado en moles de H_2/mol de lactosa) durante la operaciónentre del reactor entre los días 182 y 230 (etapas 2 y 3).

Se constató la presencia de metano puntualmente en los días 55, 58, 63, 64, 94, 98 y 99 (Tabla 18). Esta producción de metano se pudo asociar a problemas de operación, en particular en los días 64 y 94 que el reactor estuvo operando a cargas menores de lo fijado. Esta carga menor a la fijada se debió a taponamientos en las mangueras de entrada o problemas en el ajuste del caudal de entrada con la bomba de alimentación. Otro factor que pudo haber afectado fue el pH. El día 94 se detectó una producción de metano que representó un 10,2 % del biogás, la máxima de toda la operación, para ese día la carga de alimentación fue de 13,6 g/Ld y el pH de 5,42.

Tabla 18- Principales variables en los días que se observó producción de metano.

Día	pHs	Ql (L/d)	Carga (g/Ld)	LCH4/d	Qg (L/d)	% CH4 en el gas
55	5,38	5,32	19,09	0,23	4,80	4,79
58	5,35	7,72		0,28	6,62	4,23
63	4,55	4,57		0,16	5,00	3,20
64	4,35	3,43	12,70	0,06	2,50	2,40
94	5,42	3,21	13,61	0,49	4,80	10,21
98	3,84	11,24		0,08	2,98	2,69
99	3,98	8,89		0,02	0,58	3,47

5.1.5 Producción de ácidos

Como se observa en las Figuras 27 y 28, en la alimentación se detectó principalmente ácidos láctico y acético mientras que en la salida del reactor predominó el ácido acético y butírico. A pesar de la alta concentración de ácido láctico (7180 mg/L) que se observó en la alimentación, cuando la materia prima se mantuvo a temperatura ambiente, el ácido láctico no se detectó en alta proporción en el efluente (menos del 13% del producto de los ácidos totales, sin tomar en cuenta los casos puntuales de los días 97, 99 y 184) (Figuras 27, 28 y 29).

El ácido propiónico se detectó pero en baja proporción en el efluente de salida del reactor. La proporción de ácido propiónico en el efluente fue en promedio de 4% no superando en ningún momento el 24%. La lactosa en el efluente de salida se determinó en 5 muestras y se verificó una remoción superior al 99%.

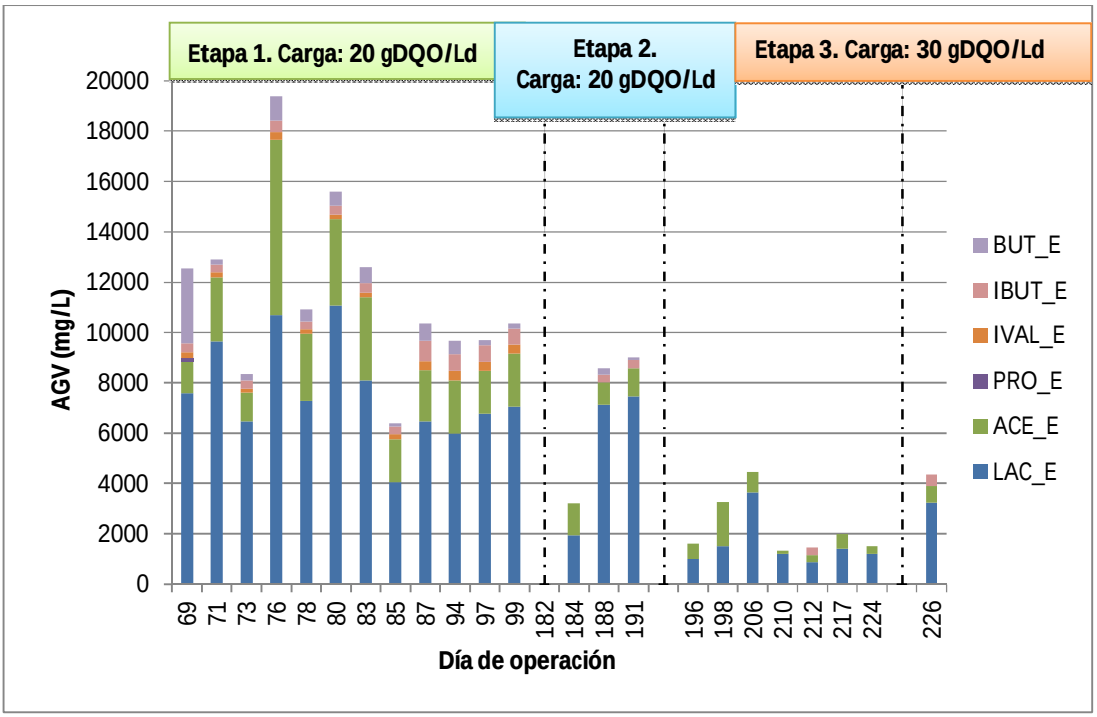

Figura 27- Ácidos grasos volátiles del influente durante la operación.

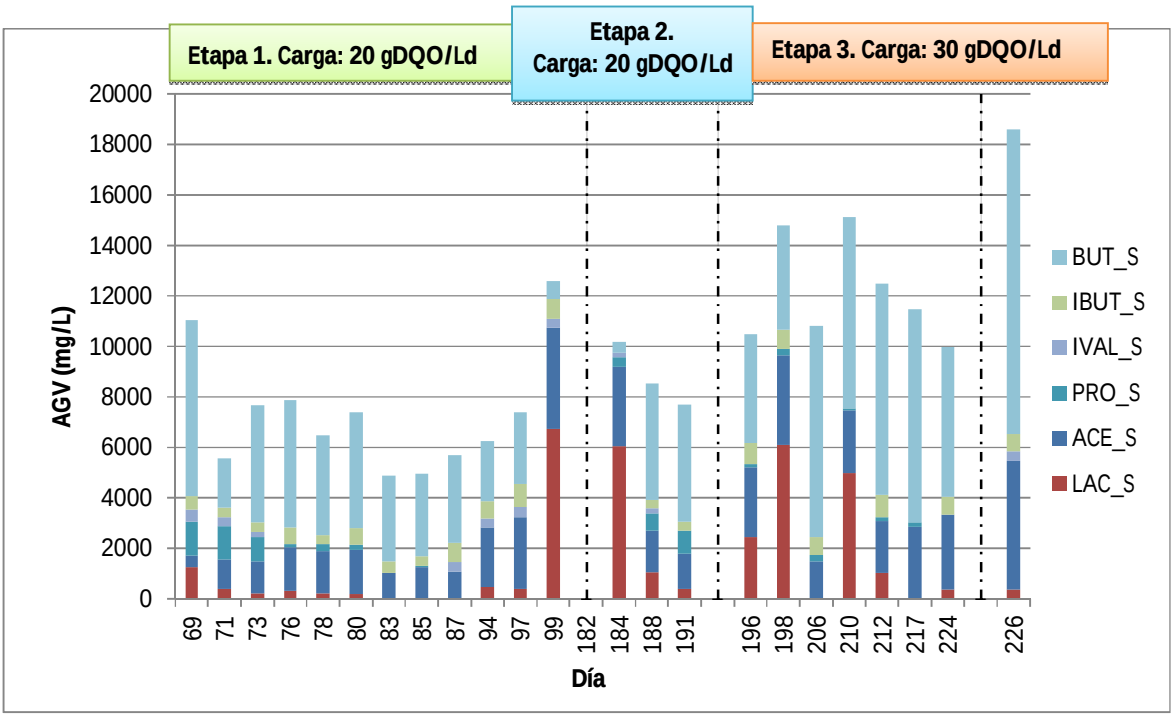

Figura 28- Ácidos grasos volátiles a la salida producidos durante la operación.

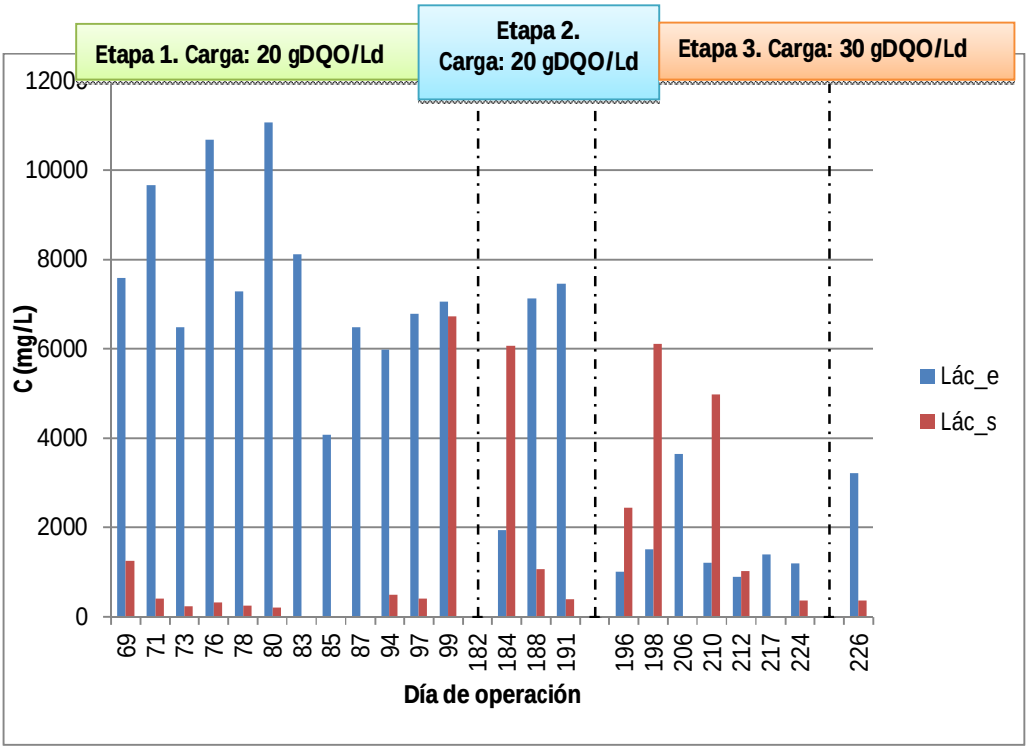

Figura 29- Ácido láctico del influente y del efluente.

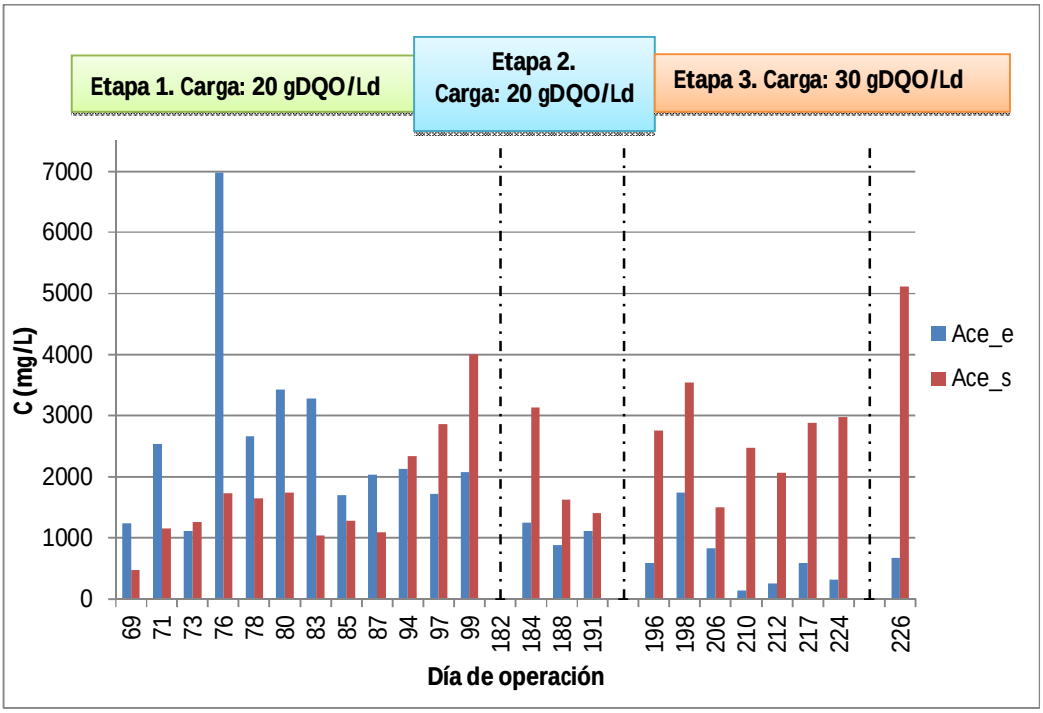

Figura 30-Ácido acético del influente y del efluente.

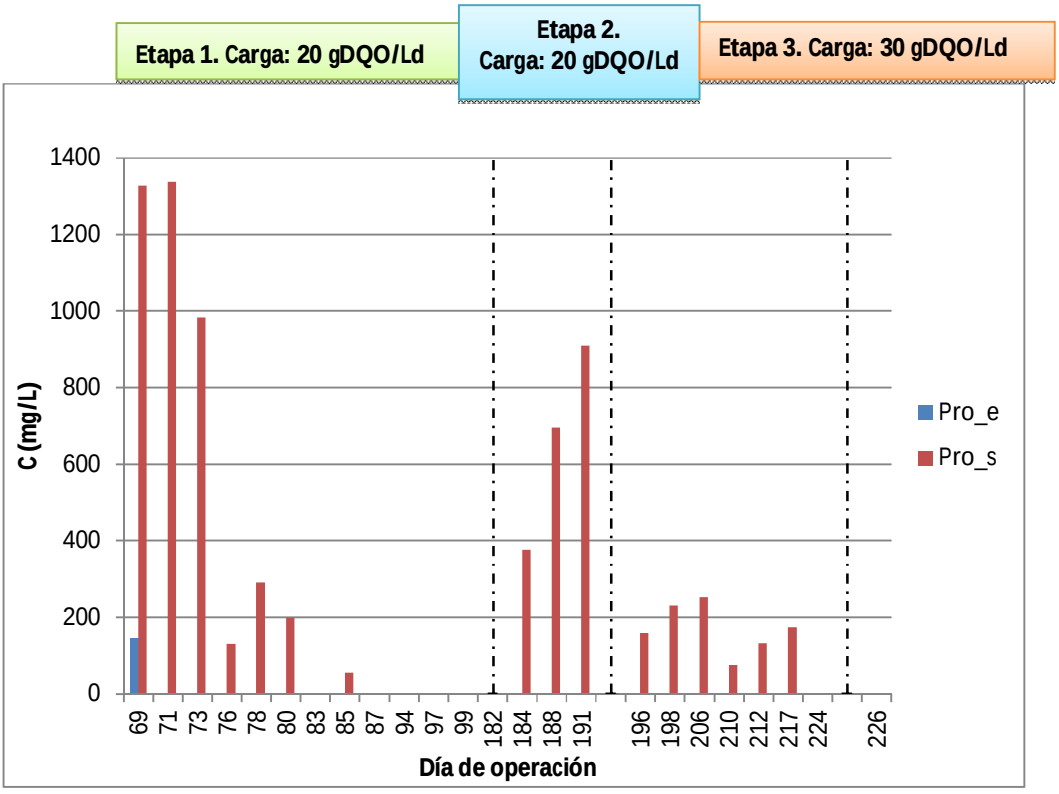

Figura 31-Acido propiónico del influente y del efluente.

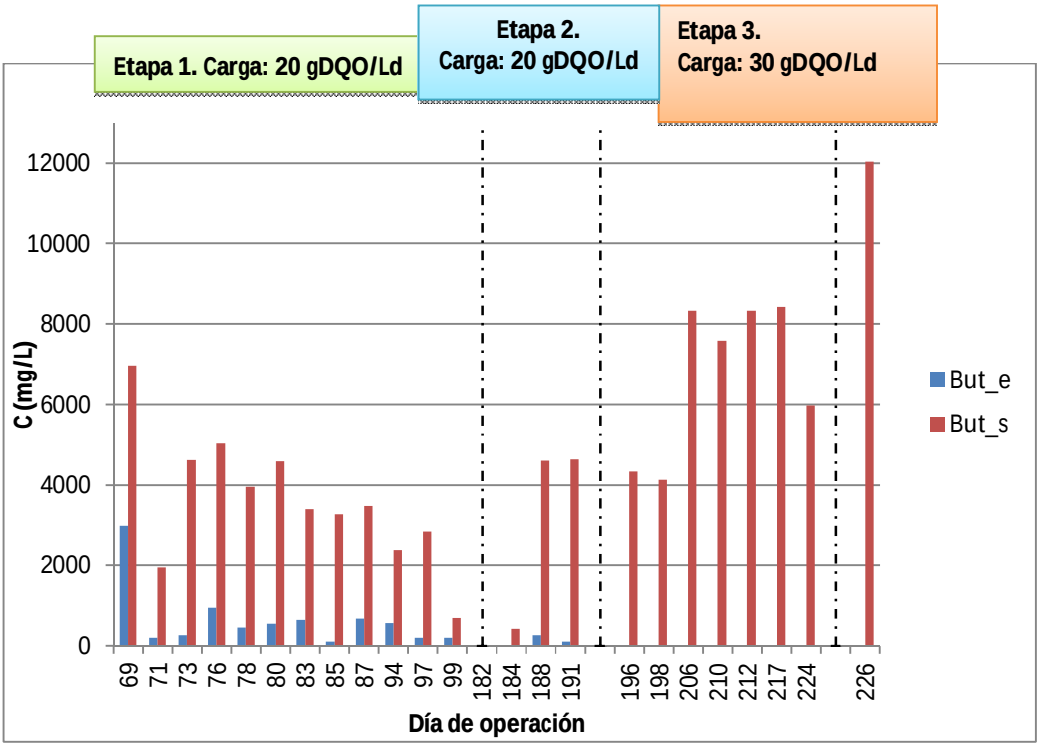

Figura 32-Acido butírico del influente y del efluente.

5.1.6 Correlación entre los ácidos formados y la producción de hidrógeno

Se detectaron principalmente ácido butírico y acético en el efluente, en una relación HAc: HBu de 0,4 en promedio. Solo en 3 determinaciones el ácido acético presentó una concentración mayor que el ácido butírico HAc: HBu, diferencia que puede ser atribuida a descensos en la concentración de butírico y aumentos en el ácido láctico acompañando los descensos de pH observados al tratar de aumentar la carga a 40 g DQO/Ld (días 97 y 99) y al retomar la operación (día 184) (Figura 33 y 34).

En la primera etapa de operación el ácido láctico detectado en el efluente de salida presentó un valor máximo de 7000 mg/L (día 99), momento en el cual no se detectó hidrógeno en el biogás. Los días anteriores el promedio fue de 323 mg/L.

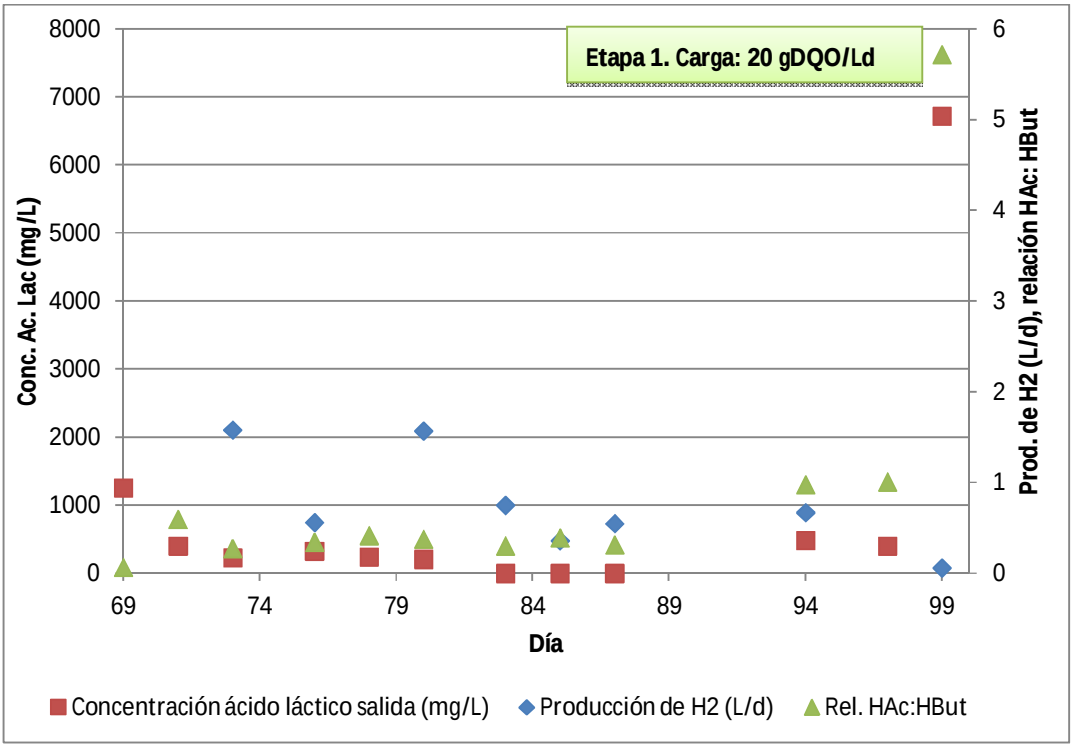

Figura 33- Concentración de ácido láctico y relación HAc: HBut a la salida y producción de hidrógeno por día durante la operación entre los días 7 y 99.

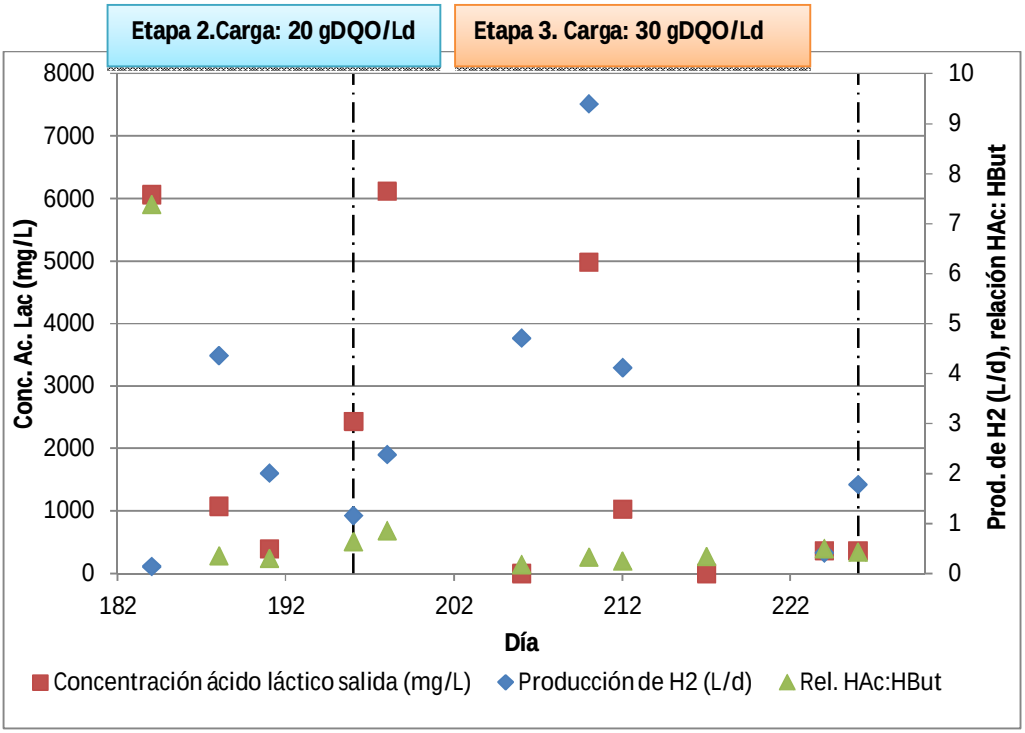

Figura 34- Concentración de acido láctico y relación HAc: HBut a la salida y producción de hidrógeno por día durante la operación entre los días 183 y 230.

Luego del re arranque del reactor, en los días 198 y 210 se observó una concentración de 6000 y 5000 mg/L de ácido láctico, que no parece haber afectado la producción de hidrógeno. Los pHs observados esos días fueron de 4,7 y 6,1 respectivamente.

En la Figura 35 se muestra la proporción de los ácidos grasos volátiles en el efluente de salida del reactor medidos como % de DQO. Se observa claramente la prevalencia del ácido butírico, excepto al final de la primera etapa de operación cuando se produjo principalmente ácido láctico, bajando abruptamente también la producción de hidrógeno.

La DQO medida analíticamente en el efluente de salida del reactor no coincidió con la equivalente a la suma de la de los ácidos grasos volátiles medidos por HPLC, el porcentaje de la DQO medida en el efluente no atribuible a los ácidos grasos medidos por HPLC varió entre 4,6 y 45%. Esta diferencia puede deberse a que no se realizó la cuantificación de algunos ácidos grasos como cítrico, fórmico, valérico, etc. y que tampoco se realizaron medidas para determinar la concentración de solventes que puedan haberse excretado por los microorganismos.

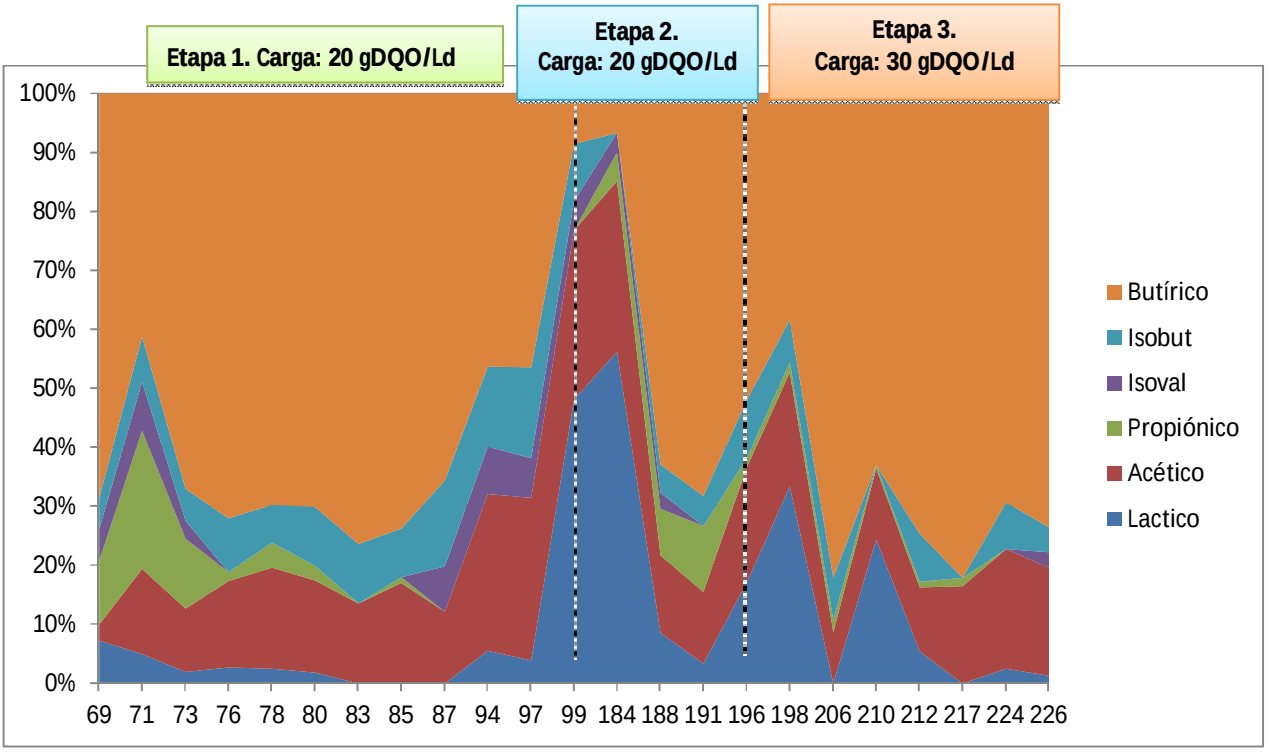

Figura 35- Proporción de ácidos grasos volátiles a la salida expresados en % de DQO.

5.2 Seguimiento de la población bacteriana

5.2.1 Análisis de la comunidad microbiana por T- RFLP del gen del ARNr de 16S

El análisis de la comunidad bacteriana por T-RFLP de los genes de ARNr de 16S indicó que la comunidad del reactor cambió con el tiempo. Se detectaron un total de 32 picos (T-RF), y ocho de ellos estaban presentes en más de la mitad de las muestras, lo que indica su persistencia en el reactor. T-RFs de 91 y 177 nucleótidos aumentaron su abundancia relativa durante la operación cuando el reactor se alimentó a 30 gDQO/Ld también cuando la producción de hidrógeno fue máxima (Figura 36).

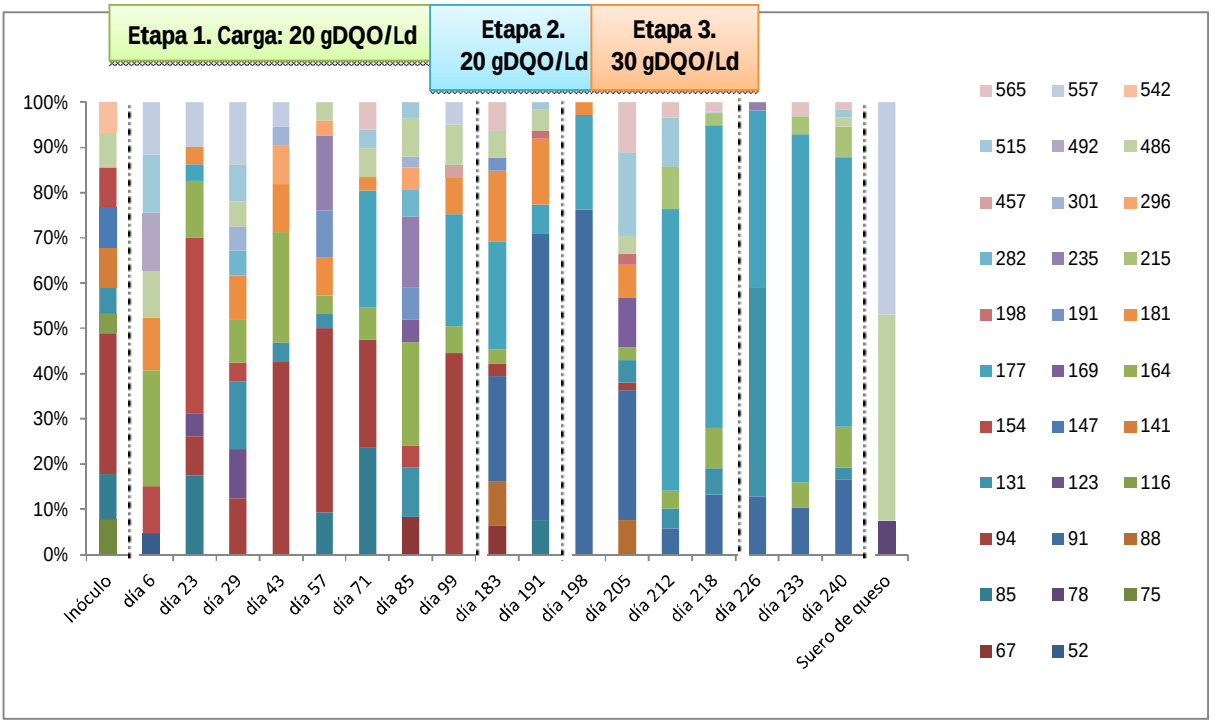

Figura 36– T- RFLP del gen del ARNr de 16S de Bacteria de muestras tomadas de la biomasa del reactor a lo largo de la operación, del inóculo y de la alimentación (suero de queso). Cada color indica un T-RF diferente, la proporción relativa de los picos en el cromatograma se muestra como proporción relativa de cada T-RF. El tamaño en nucleótidos de cada T-RF se especifica a la derecha.

Para detectar los microorganismos que entran al reactor con la alimentación, se analizó una muestra de ADN extraído de la alimentación. Se observaron dos picos predominantes (Figura 37). Estos picos fueron detectados en muy baja proporción en las muestras tomadas de la biomasa del reactor durante la operación. La proporción relativa de estos picos en los cromatogramas obtenidos de las muestras del reactor siempre fue menor de un 15%.

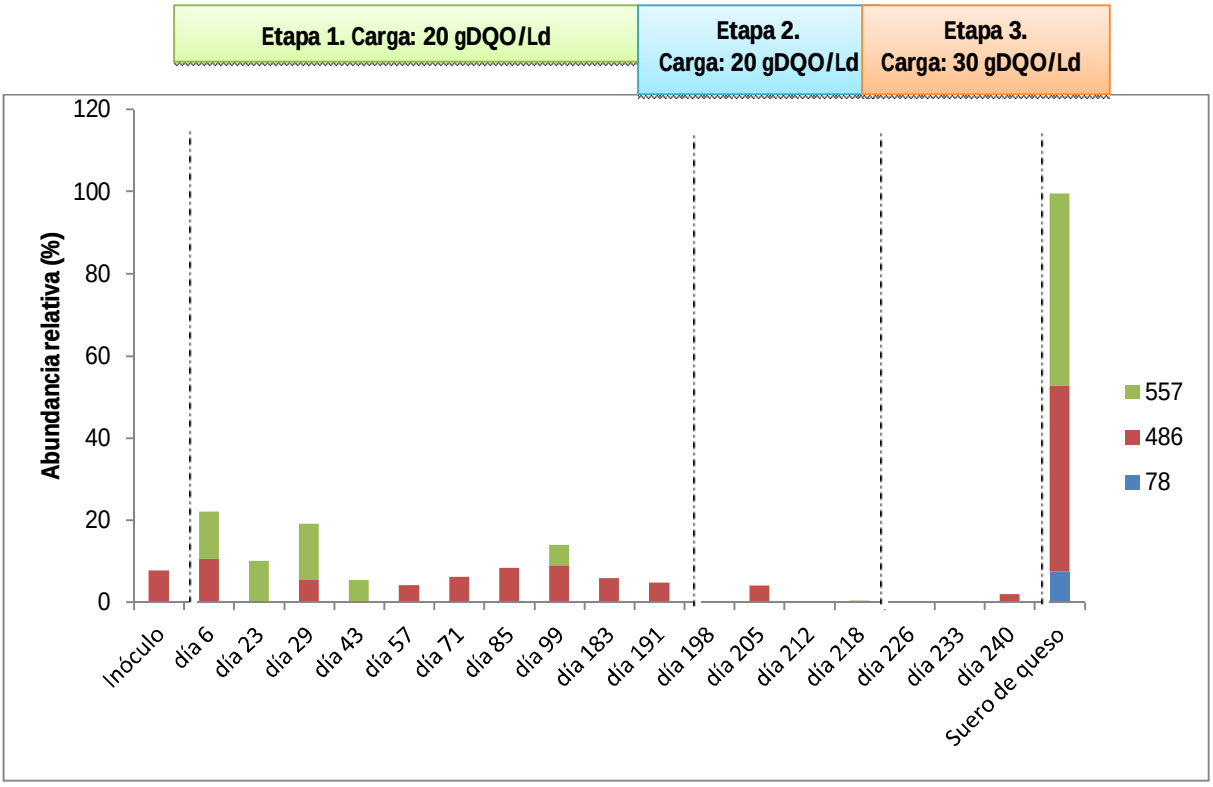

Figura 37- Picos detectados en el cromatograma de T-RFLP de la muestra tomada de la alimentación (suero de queso), se muestra también la proporción relativa de esos picos en los cromatogramas de T-RFLP de las muestras de biomasa del reactor a lo largo de la operación.

De la Figura 38 que muestra la proporción en que los picos del compost se encuentran presentes en el lodo del reactor a lo largo de la operación, se observa la persistencia del pico de 94 nucleótidos correspondiente al género *Prevotella* a lo largo de la primera etapa de operación. Luego del re arranque del mismo se observa que la abundancia de dicho microorganismo disminuyó de un 45% a un 3%.

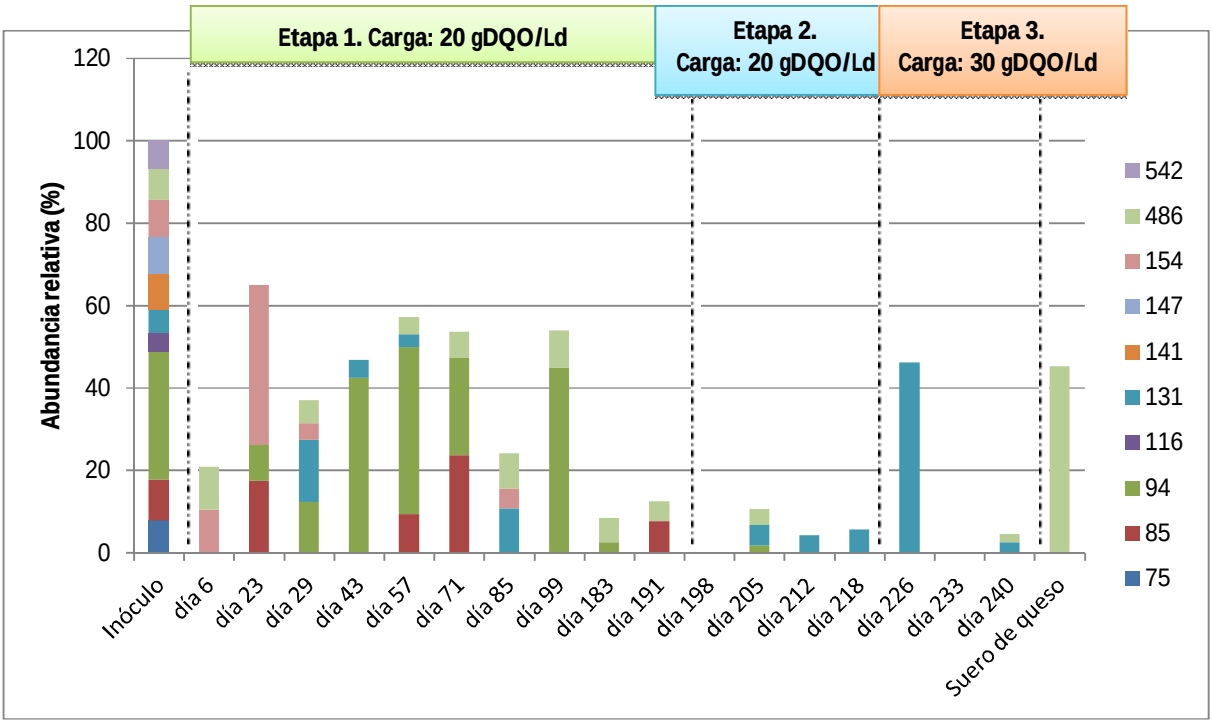

Figura 38-Picos detectados en el cromatograma de T-RFLP de la muestra del inóculo (compost), se muestra también la proporción relativa de esos picos en los cromatogramas de T-RFLP de las muestras de biomasa del reactor a lo largo de la operación.

5.2.2 Biblioteca de clones

Los organismos predominantes dentro del reactor fueron identificados mediante la construcción de una biblioteca de clones con las secuencias del gen que codifica para el ARNr de 16S, a partir de una muestra obtenida del reactor el día 71.

Se obtuvieron secuencias de 89 clones que se analizaron y se agruparon en nueve diferentes OTUs (se definió como OTU aquellas secuencias con más de un 97% de similitud).

Al comparar las secuencias de las 9 OTUs con secuencias de bases de datos (NCBI y RDP) se observó que presentaron alta homología con secuencias de microorganismos con capacidad de fermentar de acuerdo a lo reportado en bibliografía (Tabla 20). Dentro de ellos, los microorganismos de los géneros *Clostridium, Ruminococcus y Enterobacter* han sido reportados como productores de hidrógeno (Tabla 20).

Para identificar los microorganismos presentes en la alimentación se realizó también una biblioteca de clones del ADN extraído de la alimentación (suero de queso), se obtuvo la secuencia de 90 clones que se agruparon en 3 OTUs. La comparación de estas secuencias con secuencias de bancos de datos mostró una alta similitud con secuencias provenientes de microorganismos fermentadores de los géneros *Buttiauxella* y *Streptococcus* (Tabla 20).

Los picos de T-RFLP se correlacionaron con las secuencias de los clones mediante análisis in sílico. De esta forma se pudo correlacionar cinco picos encontrados en los cromatogramas de T-RFLP de muestras del reactor con secuencias provenientes de microorganismos de los géneros *Lactococcus* (T-RF=565), *Lactobacillus* (T-RF=177), *Clostridium* (T-RF=515), *Dialister* (T-RF=181) *y Prevotella* (T-RF=94). Dentro de ellos los picos de 94, 177 y 515 fueron detectados en varias muestras (Tabla 19).

Tabla 19- Clones cuya digestión "in sillico" coincide con picos detectados en el T-RFLP y muestras en las que fueron detectados. Número de pares de bases de las secuencias de los clones del reactor: 662-851. Número de pares de bases de las secuencias de los clones de la alimentación: 850

Muestra	OTU	Clasificación	Pico T-RFLP	Detectado en muestra
Reactor	otu 4	*Lactococcus sp.* EF204371 (0.934)	565	71, 183,191,198, 205,212,218,226, 233,240
Reactor	otu 5	*Lactobacillus delbrueckii* AY050172 (0.968)	177	23, 71, 99, 183, 191, 198, 212, 218, 226,233, 240
Reactor	otu 6	*Clostridium ljungdahlii* GU139552 (0.780)	515	6, 29, 71, 85, 191,205,212,240
Reactor	otu 7	*Ruminococcus bromii* X85099 (0.765)	303	29, 43,71,85, 218, 226
Reactor	otu 8	*Dialisterinvisus*AY162469 (0.750)	181	6, 23, 29, 43, 57, 71, 99, 183, 191, 198, 205, 212
Reactor	otu 9	*Prevotellaalbensis*AJ011683 (0.591)	94	Inoc, 23, 29, 43, 57, 71, 99, 183, 205
Alimentación	Suero-otu3	*Streptococcus thermophiles* AY188354 (0.991)	557	6, 23, 29, 43, 99

De los tres picos detectados en el T-RFLP de la muestra tomada de la alimentación, solo uno se pudo correlacionar con secuencias de la biblioteca de clones del ADN extraído del suero de queso. El T-RF de 557 nucleótidos se correlacionó con el T-RF calculado a partir de la secuencia de la OTU 3 con alta homología con la secuencia de *Streptococcus thermophilus* (Tabla 19).

Tabla 20- Secuencias del gen de ARNr de 16S de clones derivados de las dos bibliotecas (de la muestra del reactor y de la muestra obtenida de la alimentación). Las especies más cercanas se determinaron de acuerdo a la comparación con la base de datos RDP con la herramienta SeqMatch, el numero entre paréntesis representa el S ab score calculado por la herramienta Seqmatch. Se incluyen los productos de fermentación de los organismos representativos del género. Productos de fermentación, ref. (Sneath, Mair, Sharpe, & Holt, 1986)

Muestra	OTU	Clasificación	Productos de fermentación
Reactor	otu 1	*Enterobacter sp.* EF489450 (0.775)	H_2, fórmico, acético, láctico, etanol, butanodiol
Reactor	otu 2	*Acetobacter orientalis* AB117965 (0.758)	No fermentador
Reactor	otu 3	*Bifidobacterium minimum* AY174103 (0.638)	láctico, acético
Reactor	otu 4	*Lactococcus sp.* EF204371 (0.934)	láctico, acético
Reactor	otu 5	*Lactobacillus delbrueckii* AY050172 (0.968)	H_2 (no todos), láctico
Reactor	otu 6	*Clostridium ljungdahlii* GU139552 (0.780)	H_2, acético, butírico
Reactor	otu 7	*Ruminococcus bromii* X85099 (0.765)	H_2,acético,etanol, fórmico/láctico
Reactor	otu 8	*Dialisterinvisus* AY162469 (0.750)	acético, succínico
Reactor	otu 9	*Prevotellaalbensis* AJ011683 (0.591)	acético, láctico
Alimentación	Suero-otu1	*Buttiauxellaizardii* AJ233404 (0.969)	H_2, fórmico, acético, láctico, succínico, etanol
Alimentación	Suero-otu2	*Buttiauxella brennerae* AJ233401 (0.952)	H_2, fórmico, acético, láctico, succínico, etanol
Alimentación	Suero-otu3	*Streptococcus thermophilus* AY188354 (0.991)	láctico

5.2.3 Fermentación natural del suero (alimentación) durante el almacenamiento

Durante los primeros días de operación la alimentación no se almacenó en heladera y se observó una disminución del pH a las 24 h de almacenada. Para determinar si esta disminución del pH se debía a fermentación del suero de queso por microorganismos autóctonos, se realizaron recuentos de los microorganismos en muestras tomadas del suero de queso el mismo día de enviado de la fábrica y a las 24 h de almacenado a 4°C y a 26°C (temperatura ambiente). Los resultados mostraron que el suero de queso almacenado a 26°C se fermentó rápidamente, observándose una disminución del pH a 4,77, un aumento en el contenido de ácido láctico y un aumento en el número de células en dos órdenes (Tabla 21). Se estimó la cantidad de biomasa que podrían entrar al reactor por día con la alimentación utilizando la siguiente relación $2x10^{-13}$ gramos de células / UFC reportada previamente (Etchebehere, Errazquin, & P. Dabert, 2002).

Tabla 21- Análisis del suero de queso (SQ) a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Muestra	pH	VFA (mg/L)			Número de células en suero diluido al tercio (ufc/mL)	Número de células que entran al reactor (g/día)
		Ácido láctico	Ácido acético	Ácido butírico		
SQ, antes de entrar al reactor	7,17	1,047	186	356	$41x10^5$	0,004
SQ, almacenado a 4°C un día después de llegar de la fábrica.	7,37	1,290	201		$40x10^6$	0,04
SQ, almacenado a 26°C un día después de llegar de la fábrica.	4,77	7,260	317	336	$63x10^7$	0,6

Realizando un balance de SSV se estimó una producción de biomasa durante la operación a la carga orgánica de 20 gDQO/Ld de 4,0 g SSV/d. Por lo tanto, la biomasa que ingresa con la alimentación representó un máximo de 1,0% y 15% según se almacene a 4°C y 26°C, respectivamente, de la biomasa producida por día dentro del reactor.

El contenido promedio de biomasa en el reactor fue de 46 g de SSV, por lo que la cantidad máxima de las células que ingresan al reactor por día fue siempre inferior al 1,3 % del total de la biomasa del reactor. A pesar de la constante adición de estos microorganismos en el reactor, su dominio en la biomasa del reactor no se ha observado, de hecho, los T-RF de 78, 486 y 557 nucleótidos fueron detectados en pequeñas proporciones relativas en las muestras del reactor (Figura 37).

5.2.4 Caracterización de los aislamientos

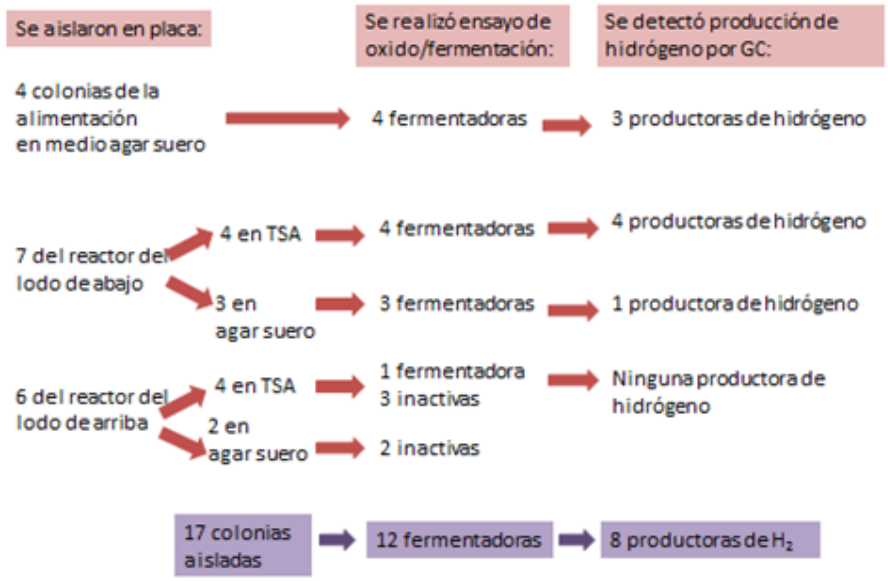

Figura 39- Aislamientos a partir de lodo del reactor y del suero de alimentación.

Se aislaron un total de 17 cepas de las muestras tomadas del reactor de la parte superior (arriba) y de la parte inferior del reactor (abajo) (Figura 39). Se estudió la capacidad de producir hidrógeno y se las caracterizó mediante análisis del gen del ARNr de 16S, encontrándose dos cepas productoras de hidrógeno pertenecientes a los géneros *Klebsiella* y *Proteus* mientras que las cepas no productoras de hidrogeno se caracterizaron dentro de los géneros *Pseudomonas* y *Chryseobacterium* (Tabla 22).

Dentro de las cepas aisladas de la alimentación se identificaron microorganismos pertenecientes al género *Enterobacter,* el cual ha sido reportado como productor de hidrógeno.

En un trabajo paralelo se aislaron dos bacterias no productoras de hidrogeno provenientes de un ensayo en batch en el que se fermentó suero de queso para evaluar la capacidad de las bacterias autóctonas del suero para producir hidrógeno (V13 y Ab6) (Wenzel, Perez, Zinola, & Etchebehere, 2011) que se incluyen en este trabajo a modo de comparación.

Tabla 22- Cepas aisladas del reactor y de la alimentación. Número de pb de las secuencias de las bacterias aisladas: 733-900pb.

Muestra	Cepa	Medio	Ensayo OF	Producción de H_2	Identificación	% Similitud	Número de acceso (NCBI)
Reactor arriba	V3	TSA	Dudoso	no	*Chryseobacterium* sp. MH19	100	EU182848
Reactor abajo	V10	Agar suero	fermentadora	si	*Klebsiella oxytoca*	99	HM461887
	V11	Agar suero	Dudoso	no	*Pseudomonas aeruginosa*	99	HQ162484
	V12	Agar suero	Dudoso	no	*Pseudomonas aeruginosa*	99	HQ162484
	V7	TSA	fermentadora	si	*Proteus vulgaris*	99	X07652
Alimenta-ción	V4	Agar suero	fermentador	no	*Leuconostoc mesenteroides*	99	EF204326
	V5	Agar suero	fermentador	si	*Enterobacter* sp. S6BB	99	AB428448
	V13	Agar suero	fermentador	no	*Enterococcus avium*	99	HQ169120
	Ab6	MRS	No se realizó	no	*Lactobacillus delbrueckii*	99	AY050171

5.2.5 Análisis filogenético

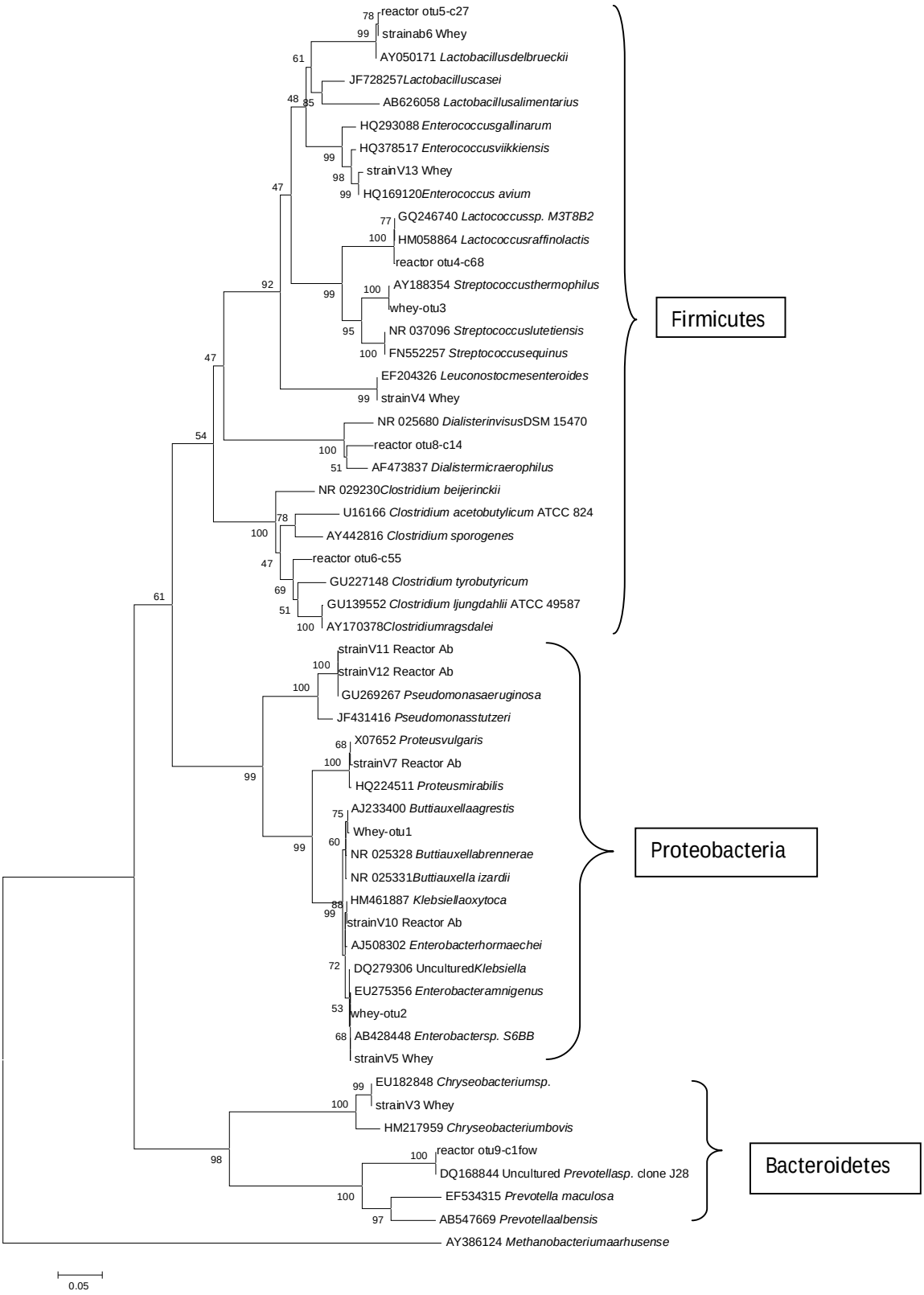

Figura 40- Árbol filogenético incluyendo las secuencias obtenidas del clonado del día 71 de la biomasa del reactor y de la biomasa de la alimentación del día 223. También se incluyen secuencias de los

aislamientos de la biomasa del reactor del día 239 y de la alimentación del día 58. El árbol se construyó con secuencias de 676 pb.

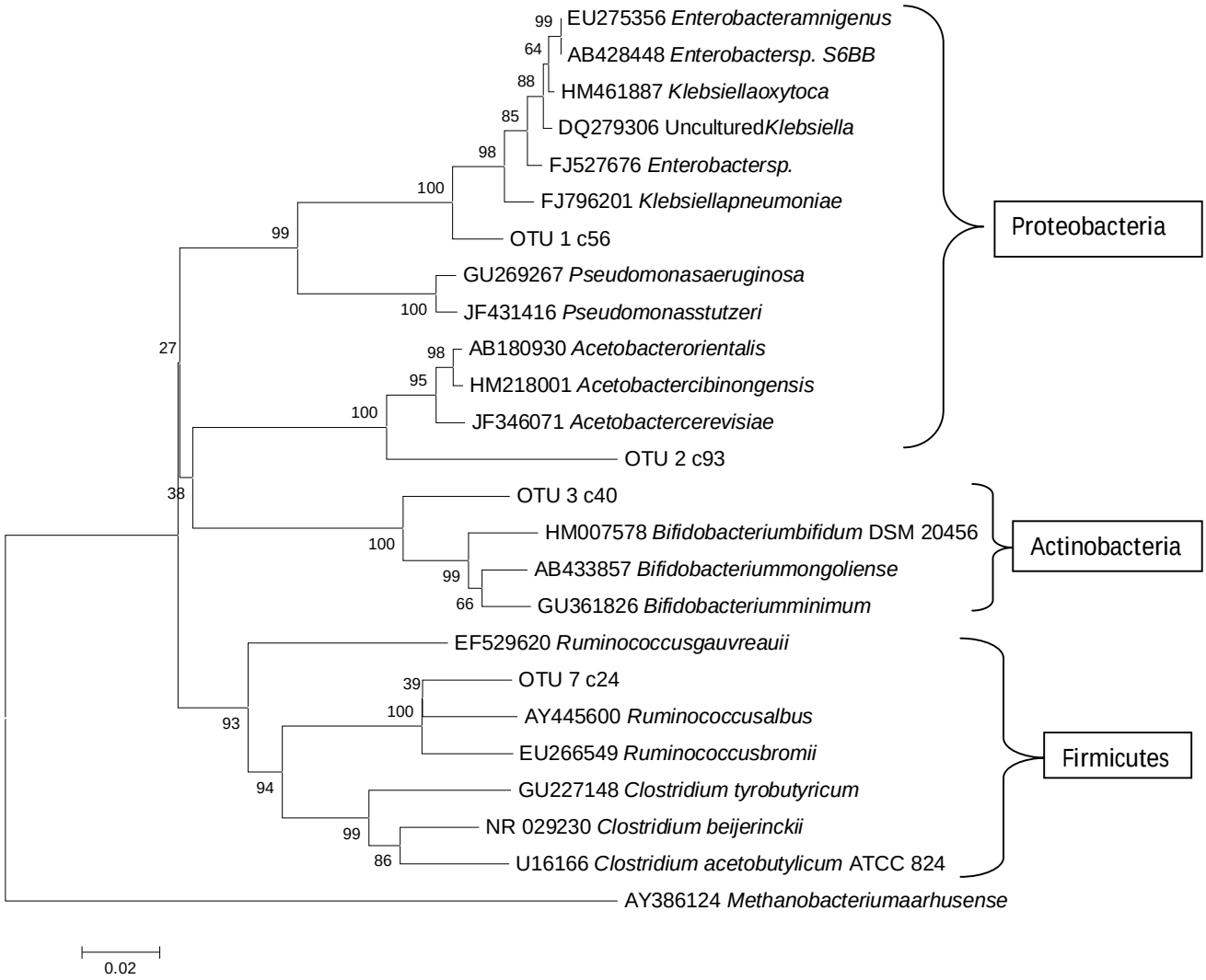

Figura 41-Arbol filogenético incluyendo las secuencias que se encontraron en sentido reverso en la biblioteca de clones de la muestra tomada del reactor. El árbol fue construido con secuencias de 724 pb.

Con las secuencias obtenidas de los aislamientos y de las bibliotecas de clones se construyeron dos árboles filogenéticos, uno con las secuencias en sentido forward y otro con las secuencias en sentido reverso.

De las 9 OTUs del reactor, un 56,6% pertenece al filum Firmicutes, un 22,2% a Proteobacteria, un 11,1% al Bacteroidetes y un 11,1% al Actinobacteria (Figuras 40 y 41).

De las 3 OTUs de la librería de clones realizada con la muestra de suero de la alimentación, el 66,7% perteneció al filum Proteobacteria y el 33,3% al Firmicutes.

Según el árbol filogenético de las secuencias en sentido forward (Figura 40) la cepa Ab 6 aislada de la alimentación coincide con la secuencia del reactor perteneciente a la OTU 5 que se corresponde con *Lactobacillus delbrueckii*. También coincide la secuencia de la OTU 2 con la secuencia de la cepa V5 identificadas como *Enterobacter*. Esto significa que ambas cepas que ingresan con la alimentación logran persistir en el reactor.

5.2.6 Biomasa

Las Figuras 42 y 43 son fotos tomadas del lodo del reactor el día 231 de operación. En las mismas se observan aglomerados de una sustancia blanca y pueden distinguirse pequeños gránulos. El día 239 (Figura 44) se observan aglomerados similares a los del día 231 pero sin embargo no se detectó la presencia de gránulos. La biomasa presentó buena sedimentación, sin embargo, la granulación de la misma no fue suficiente como para evitar la expansión excesiva del manto de lodos en momentos de alta producción de gas. En estos casos se procedió a disminuir la recirculación para evitar la salida de biomasa junto con el efluente. Pero, cuando la producción de gas disminuyó se produjo la compactación del lodo, en consecuencia la superficie de contacto entre la biomasa y el suero disminuía, deteniéndose la producción de biogás.

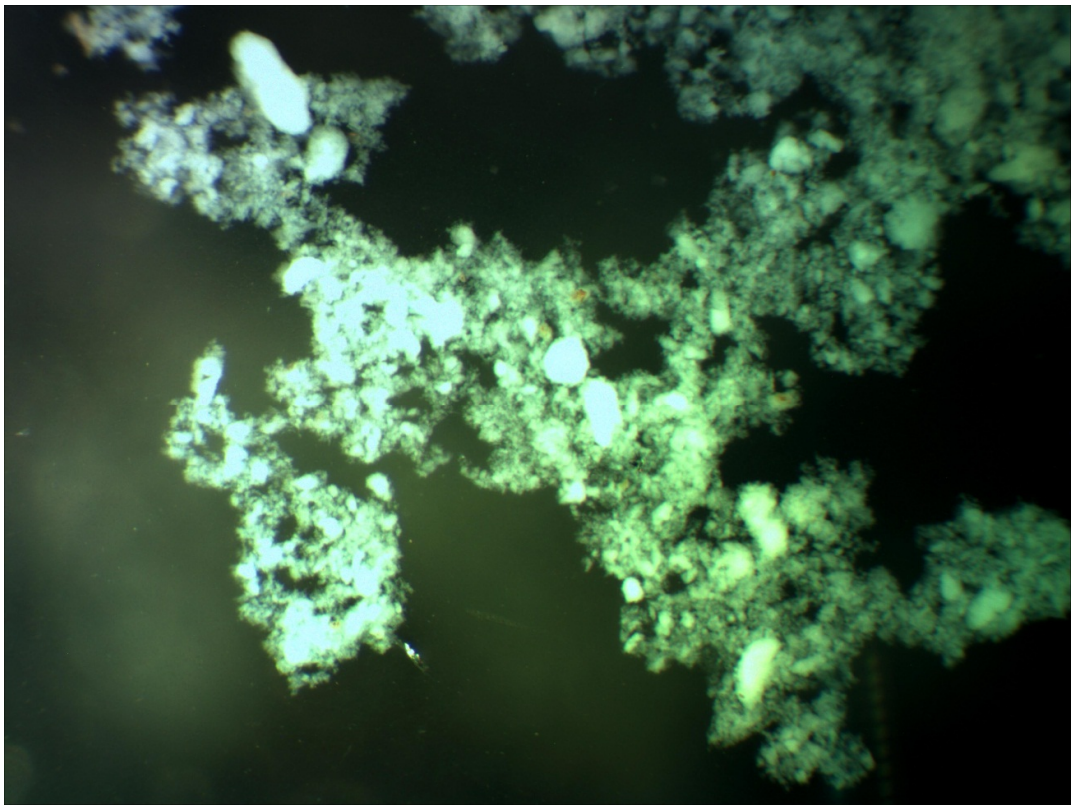

Figura 42- Biomasa del reactor del día 231 de operación.

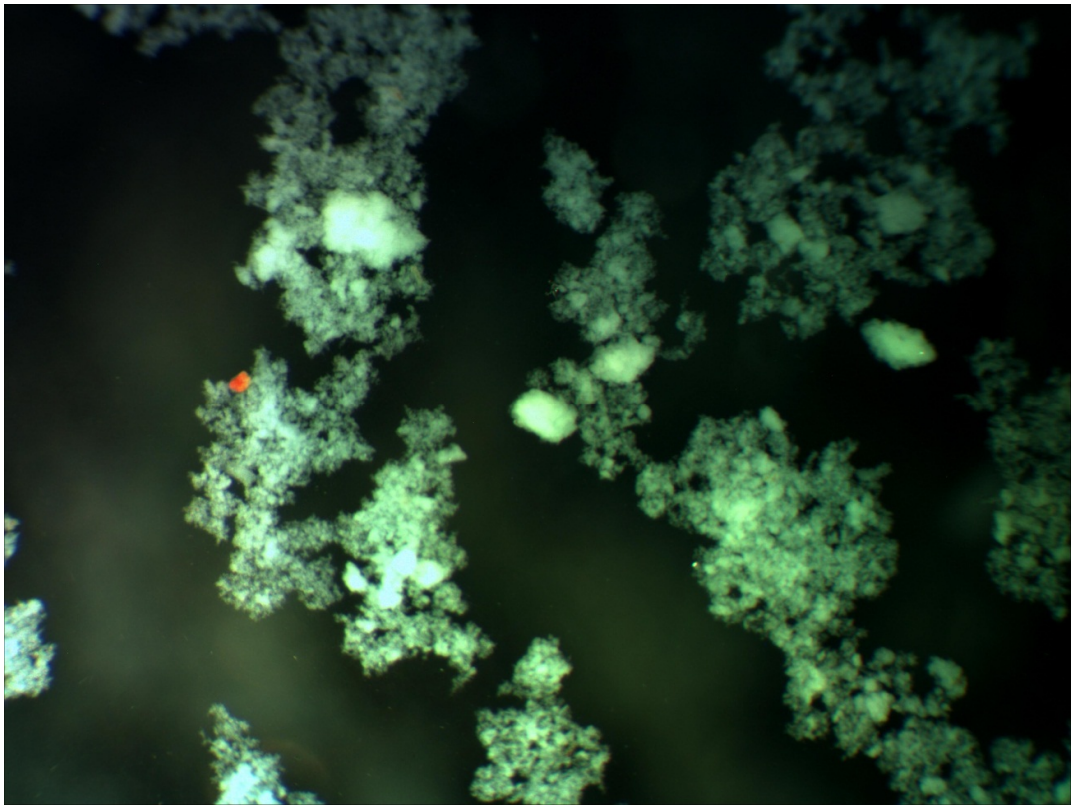

Figura 43- Biomasa del reactor del día 231 de operación.

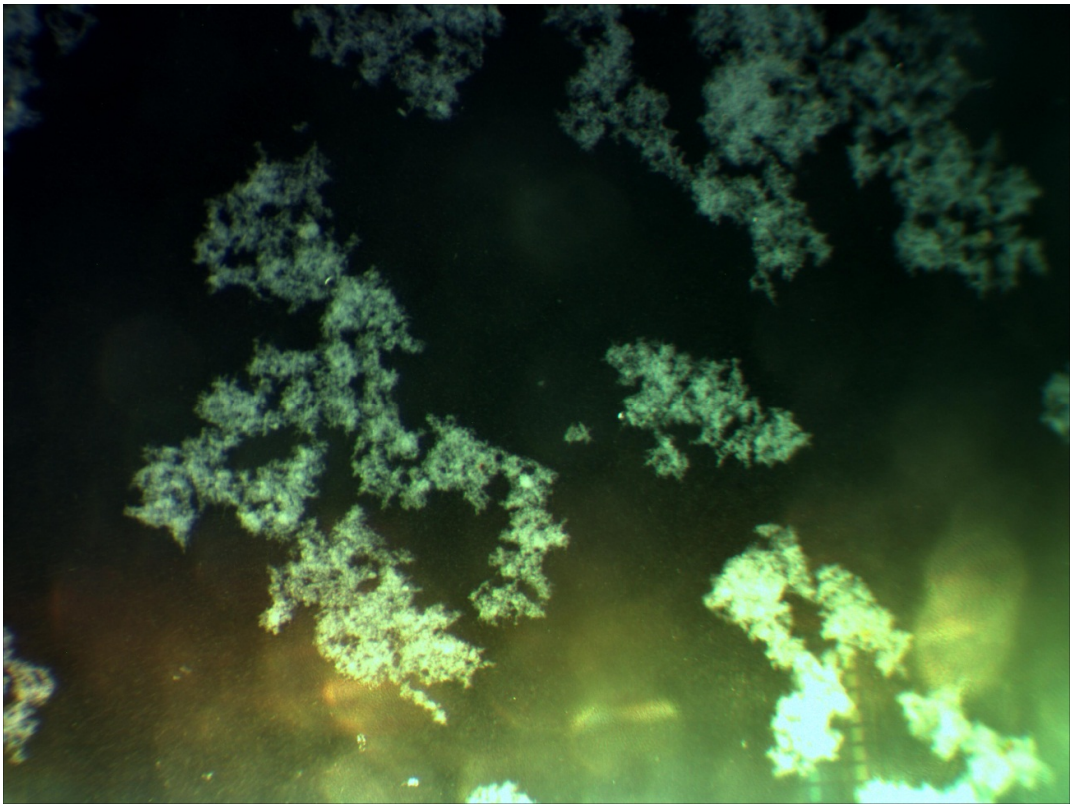

Figura 44- Biomasa del reactor del día 239 de operación.

Se observaron al microscopio en fresco, muestras de lodo del reactor. Se distinguieron bastones largos (Figuras 45 y 46) y bastones más cortos esporulados (Figura 46).

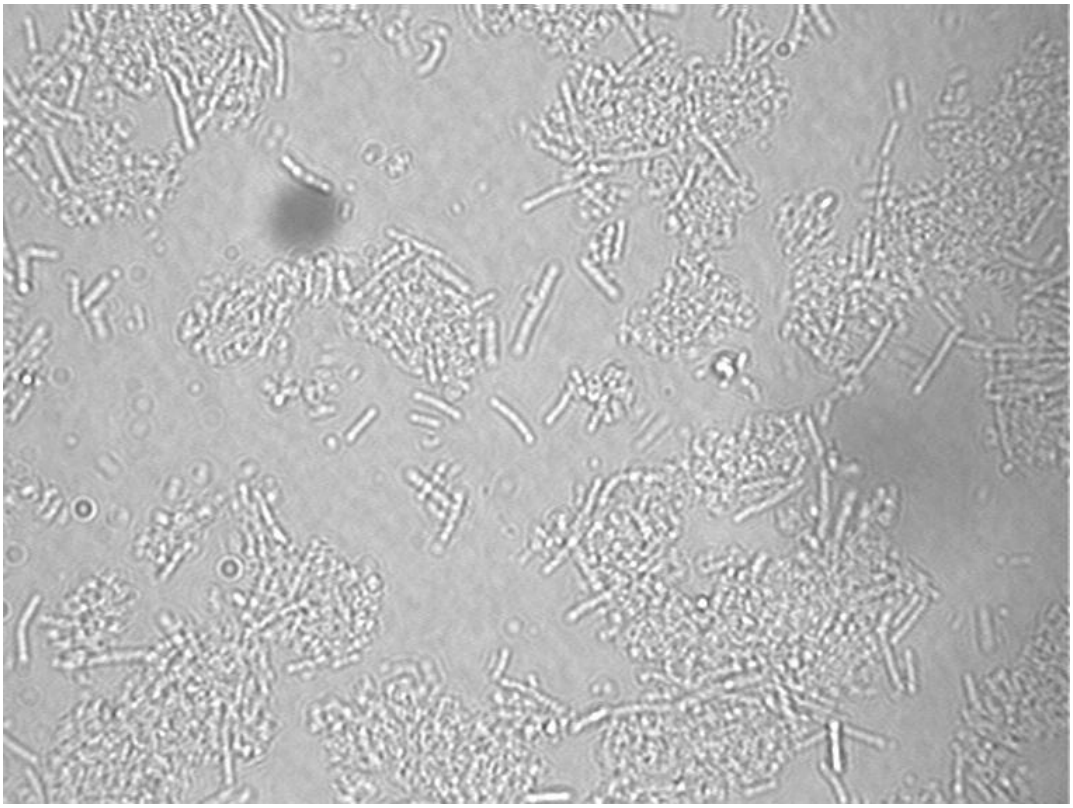

Figura 45- Biomasa del reactor observada al microscopio el día 211.

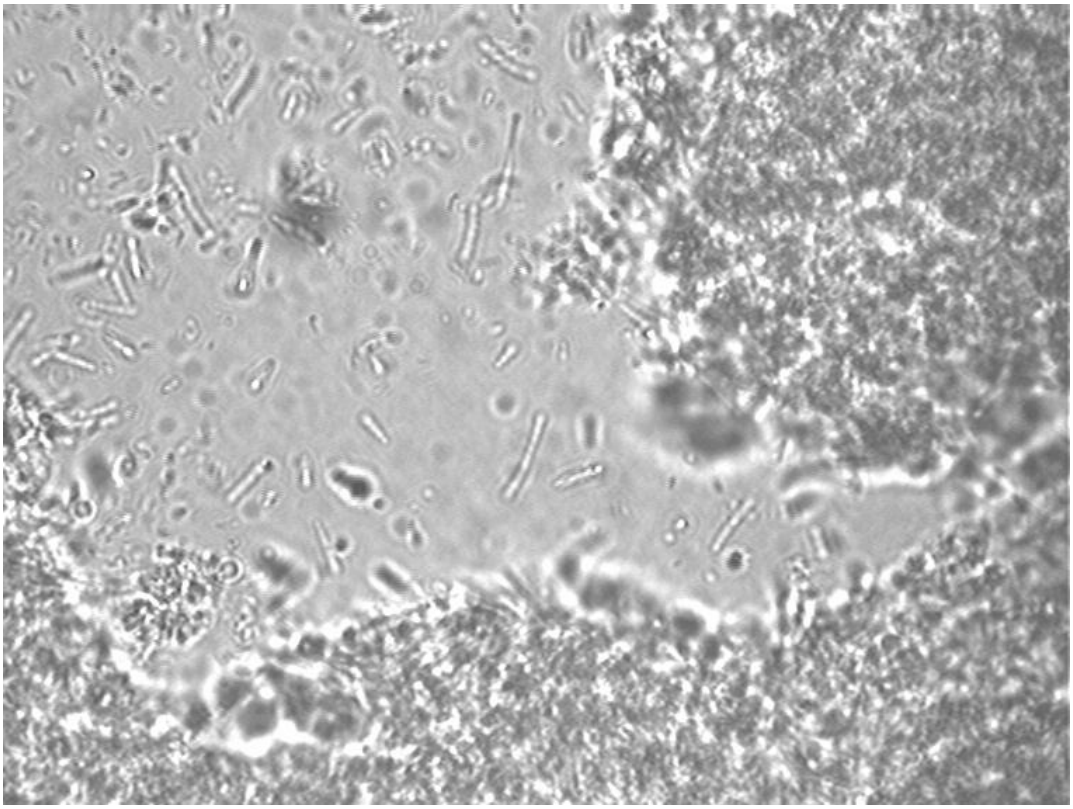

Figura 46- Biomasa del reactor observada al microscopio el día 211.

6 Discusión UASB

Para el arranque del reactor se utilizó un inóculo libre de arqueas metanogénicas y rico en bacterias productoras de hidrógeno. Estas dos propiedades se verificaron en el compost con el que se procedió a inocular el reactor, con un número de bacterias productoras de hidrógeno de $46x10^7$NMP/g, y un nivel de actividad metanogénica debajo del límite de detección, por lo que se decidió no someter al compost a un tratamiento térmico. Sin embargo, en ciertos momentos de la operación se detectó la presencia de metano sobre todo cuando hubo fallas con el ajuste de la carga, por lo que es necesario buscar las condiciones y controlarlas de tal manera que estas arqueas metanogénicas no prevalezcan.

En la Tabla 23 se comparan trabajos en los que se utilizaron reactores UASB para producir hidrógeno.

Tabla 23- Comparación de trabajos en donde se utilizaron reactores UASB para producción de hidrógeno.

UASB	Inóculo	Sustrato	TRH	moles H_2/mol sustrato	VPH (LH_2/Ld)	Gránulos
Fang y col., 2002	Sedimentador de planta tratamiento	sacarosa	6h	0,43	13	1,6mm
Gavala y col., 2006	Gránulos tratados térmicamente (3 veces sucesivas T= 140°C, t=30min) de un UASB de tratamiento de efluentes de la industria papelera	glucosa	2 h opt. (12; 6 y 2h)	0.7	10,24	
Zhao y col., 2008	UASB tratingcitrate	sacarosa	16,4 h opt	1,62	2,95	~1mm
Castelló y col., 2009	Reactor metanogenico adaptado	suero de queso	24 h	0,3	0,1	<1mm
Este trabajo	Compost	suero de queso	24 h	0,7	0,8	<1mm

Comparando la performance con la de otros reactores UASB (Tabla 23) el rendimiento obtenido en este trabajo, es la mitad del máximo reportado por (Zhao, y otros, 2008) que estudiaron la producción de hidrógeno en un UASB a diferentes concentraciones iniciales de sustrato y tiempos de retención hidráulicos llegando a que el óptimo (Tabla 23) se obtuvo a una concentración inicial de 14,5 g/L y un TRH de 16,4 h.
La mayoría de los trabajos con UASB se han realizado con sustratos artificiales con suplementos, por lo tanto el menor rendimiento de este trabajo puede deberse a que no son las condiciones nutricionales ideales para el crecimiento de los microorganismos que presentan mayores rendimientos en producción de hidrógeno.
Hay pocos estudios del tema de la granulación en los UASB, pero, en general los trabajos reportan gránulos pequeños (alrededor de 1mm) con buena capacidad de sedimentar. En nuestro trabajo se observaron pequeños agregados con buena capacidad de sedimentar, pero con problemas de compactación del lodo cuando no se produjo biogás.

En cuanto a la presencia de metano en reactores UASB productores de hidrógeno, solo en el trabajo de (Castelló, y otros, 2009) con suero de queso fue detectado.
En estos reactores tampoco se reportan problemas de inestabilidad en la producción de hidrógeno, por lo tanto los problemas que surgieron en este estudio, pueden estar asociados a la variación de composición del sustrato y de la carga inicial y a los problemas de compactación o expansión excesiva del lodo.
En los estudios realizados con UASB trabajan en general a TRH menores a los utilizados en este trabajo. Este TRH fue elegido basándose en los trabajos de (Yang, Zhang, & Benemann, 2007) en el cual los autores demostraron que a TRH menores de 24 h no se degradaba la lactosa utilizando suero de queso. Sin embargo, en un trabajo posterior (Davila-Vazquez, Cota - Navarro, Rosales - Colunga, de León- Rodríguez, & Razo- Flores, 2009) llegan a un óptimo en la producción de hidrógeno a las 6 h.
Sería entonces importante estudiar TRH menores para determinar si es posible aumentar la producción de hidrógeno.

Para la carga orgánica de 30 gDQO/Ld se constataron los mayores valores de producción de hidrógeno que fueron, en promedio en esta etapa de 0,7 LH_2/Ld, alcanzando un valor máximo de 2 de LH_2 /Ld. Debido a las altas fluctuaciones en la cantidad de hidrógeno producido se considera el promedio de la etapa en la que se detectó mayor producción (0,7 LH_2/Ld) para comparar con otros estudios.

El rendimiento se determinó como la relación entre los moles de H_2 producidos y la DQO a la entrada del reactor que se convirtió a moles de lactosa (la concentración de lactosa se determinó en cinco muestras y se relacionó con los valores de DQO). El rendimiento presentó también una gran variabilidad, que puede deberse a cambios en las rutas metabólicas predominantes y variaciones en la composición de suero de queso (% de proteínas, grasa y aceite, ácido láctico). Sin embargo, el rendimiento promedio en hidrógeno no presentó variación con el aumento de la carga de 20 a 30 gDQO/Ld manteniéndose en 0,7 mol de hidrógeno /mol de lactosa.

En el trabajo de Hafez y colaboradores (Hafez, Nakhla, Hesham, Naggar, Elbeshbishy, & Baghchehsaraee, 2010) los autores señalan una correlación entre la carga orgánica y la comunidad microbiana seleccionada en el reactor. Los autores reportan un funcionamiento óptimo a la carga de 103 gDQO/Ld en un reactor RCA alimentado con glucosa y un TRH de 8 horas. También proponen una relación F/M óptima entre 4,4 y 6,4 gDQO/gSSVd. En el presente trabajo, la relación entre la carga orgánica de entrada y la concentración de sólidos suspendidos volátiles, fue en promedio 2 gDQO/gSSVd en las etapas 1 y 2 y 3 gDQO/gSSVd en la etapa 3. Esta relación F/M se encuentra cercana a la óptima reportada por Hafez y colaboradores de 4,4- 6,4 gQO/gSSVd (Hafez, Nakhla, Hesham, Naggar, Elbeshbishy, & Baghchehsaraee, 2010). El metano fue detectado siempre en condiciones en que la carga se situó debajo de 20 gDQO/Ld (F/M < 2gDQO/gSSVd) o que el pH alcanzó valores cercanos a 5,5, por lo que resulta conveniente mantener el valor F/M mayor a 2.

En trabajos anteriores (Castelló, y otros, 2009) se alcanzó una producción volumétrica de 0,1 LH_2/Ld y se detectó metano en el biogás. A pesar de las variaciones en la producción de hidrógeno, su valor aumentó siete veces en el presente trabajo con respecto al anterior. Dicho incremento podría atribuirse a que en el trabajo de Castelló y colaboradores se detectó metano durante toda la operación disminuyendo el rendimiento en hidrógeno. Además en el

trabajo de Castelló y colaboradores se detectó la producción de propiónico indicando que las vías metabólicas predominantes fueron de menor rendimiento en hidrogeno.

En el trabajo de Dávila-Vazquez y colaboradores (Davila-Vazquez, Cota - Navarro, Rosales - Colunga, de León- Rodríguez, & Razo- Flores, 2009), en el que realizaron un ensayo con un RCA alimentado con suero de queso en polvo, a tres tiempos de retención hidráulica diferentes (10, 6 y 4 h), las especies del género *Clostridium* (*Clostridium sp., C. butyricum, C.paraputrificum*) fueron predominantes a TRH de 10 y 6 h, pero la intensidad de estas bandas disminuyó o desapareció al TRH de 4 h. La presencia del género *Clostridium* era sospechada debido a la presencia principalmente de ácido acético y butírico en el efluente. También se detectaron *Enterococcus faecium y Streptococcus* sp. En nuestro estudio también se detectaron ambos géneros de microorganismos, indicando que es una flora típicamente seleccionada en la fermentación del suero de queso.

La ausencia de ácido láctico en el efluente durante la mayor parte de la operación a pesar de la alta concentración del mismo en el influente sobre todo en la etapa 1, indica que pudo haber sido transformado por bacterias con la capacidad de degradar lactato. Si la conversión del lactato es acompañada o no de la producción de hidrógeno depende de los géneros bacterianos presentes en el reactor. Por ejemplo, se ha reportado que cultivos de organismos caracterizados como *Clostridium tyrobutyricum* en presencia de acetato, pueden fermentar el lactato a butirato, CO_2 e H_2 (Balow, Truper, Dworkin, & Harder, 1992).

En un estudio complementario a esta Tesis (Wenzel, Perez, Zinola, & Etchebehere, 2011) se realizaron estudios con aislamientos de *Lactobacillus, Clostridium beijerinckii y Enterobacter* evaluando su rendimiento en hidrógeno a partir de dos efluentes de interés en nuestro país como lo son el suero de queso y la vinaza. Se estudió también el efecto de la concentración de sustrato en el medio y el del agregado de ácido láctico en la producción de hidrógeno. Con respecto a los ensayos con adición de diferentes cantidades de ácido láctico, se observó que el agregado de 1 g/L de ácido láctico produjo una disminución del 32% en la producción de hidrógeno en cultivos de *Clostridium.* Sin embargo, un efecto de inhibición similar (37% de disminución en la producción de hidrógeno) sólo se detectó en concentraciones más altas de ácido láctico (2g/L) para los cultivos de *Enterobacter sp*. Esto indica que las cepas de *Enterobacter* podrían ser más resistentes a la inhibición por ácido láctico. A concentraciones superiores 4 g/L, ambas cepas presentaron una disminución de más del 70% en la producción de hidrógeno.

En el presente trabajo, durante la primera etapa de operación el ácido láctico presentó un valor de 7 g/L el día 99, momento en el cual no se detectó hidrógeno en el biogás. Los días anteriores el promedio fue de 0,323 g/L por lo que según el estudio de (Wenzel, Perez, Zinola, & Etchebehere, 2011) los principales géneros hidrogenogénicos no estarían siendo afectados por el ácido láctico.

Luego del re arranque del reactor si bien el día 198 y 210 se observó una concentración de 6 y 5g/L de ácido láctico, no parece haber sido afectada la producción de hidrógeno. Puede que el efecto inhibitorio del ácido láctico haya sido compensado por un mayor agregado de bicarbonato a la entrada, ya que los pH observados esos días fueron de 4,7 y 6,1 respectivamente. Y según el estudio de (Wenzel, Perez, Zinola, & Etchebehere, 2011) puede que a estas concentraciones más altas de ácido láctico, el hidrógeno esté siendo producido por microorganismos con mayor tolerancia al ácido láctico (como *Enterobacter*) más que por

microorganismos del género *Clostridium*, ya que si bien estos primeros estarían siendo afectados, sería en menor medida que los segundos.

Los organismos predominantes fueron identificados construyendo una biblioteca de genes que codifican para el ARNr de 16S, que fue construida con una muestra del reactor obtenida el día 71. Secuencias de 89 clones se analizaron y se agruparon en 9 OTUs. De acuerdo con el análisis de la secuencia, se verificó un predominio de fermentadores, algunos de ellos productores de hidrógeno como *Clostridium, Ruminococcus y Enterobacter*, y otros no hidrogenogénicos como *Dialister ,Prevotella, Acetobacter, Bifidobacterium y Lactococcus*. También se detectó la prevalencia de organismos del género *Lactobacillus.* Con respecto a este último, se ha informado la capacidad de algunas especies para producir hidrógeno (Kandler y Weiss, 1986) y, más recientemente, fue reportado un productor eficiente de hidrógeno de dicho género por Yang y colaboradores en el año 2007 (Yang, Zhang, & Benemann, 2007). En un trabajo en paralelo, (Wenzel, Perez, Zinola, & Etchebehere, 2011) para determinar si los organismos del género *Lactobacillus* eran capaces de producir hidrógeno en este reactor, las bacterias ácido lácticas fueron aisladas de una muestra obtenida al final de la operación. Dos cepas fueron aisladas y caracterizadas como pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, dichos microorganismos no produjeron hidrógeno durante la fermentación en el medio líquido PYG. Por lo tanto, la producción de hidrógeno en nuestro reactor no estaría asociada a la presencia de *Lactobacillus*, por lo menos no a los que se consiguieron aislar. De acuerdo con estos resultados, debería investigarse la capacidad de organismos del género *Lactobacillus* para producir hidrógeno.

La presencia de los microorganismos detectados en la muestra de la alimentación se han reportado anteriormente en productos lácteos. De hecho, *Streptococcus thermophilus* (no hidrogenogénico) es ampliamente utilizado como cultivo iniciador en la fabricación de productos lácteos (Hols, y otros, 2005), y, los organismos del género *Buttiauxella* (productores de H_2 pero con bajo rendimiento) se han asociado con el deterioro de la leche (He, Jin, Lee, & Li, 2009). Sin embargo, a pesar de la constante adición de estos microorganismos al sistema, no se observó su dominio en la biomasa del reactor, de todas formas, estos fermentadores podrían competir por el sustrato, causando una disminución en la producción de hidrógeno. Para minimizar este efecto, se decidió mantener la materia prima a 4°C, mientras que se operó el reactor a 30 gDQO/Ld.

En su estudio (Pattra, Lay, Lin, O-Thong, & Reungsang, 2010) estudiaron el efecto de la adición de un sustrato no estéril (jugo de caña de azúcar) a un cultivo puro de *Clostridium butyricum* para la producción de hidrógeno en un reactor RCA operado a diferentes TRH. Al TRH de 36 h, otras especies relacionadas con *L.harbinensis y K. pneumoniae* estuvieron presentes como grupos predominantes en el reactor. Cuando el TRH se redujo a 12, 6 y 4h, *C. butyricum* predominó compitiendo con *L. harbinensis* y *K. pneumoniae*. Estos estudios muestran que, bajo determinadas condiciones, es posible mantener los microorganismos introducidos al sistema con el inóculo a pesar de la constante adición de otras especies bacterianas con el ingreso de la alimentación.

Sin embargo, en nuestro estudio, el efecto de la alimentación sobre la población que se desarrolle en el reactor, depende de la velocidad de crecimiento de los microorganismos que

ingresan, su capacidad para aglomerarse y sedimentar y no ser arrastrados con el efluente, ya que por ser un UASB, el TRH es diferente del tiempo de retención celular.

De los resultados obtenidos se ha observado la persistencia de organismos de los géneros *Enterobacter y Lactobacillus* en el reactor que, aparentemente, habrían sido introducidos al sistema con el suero de queso. Organismos del género *Prevotella* fueron detectados en el compost, este género de microorganismos reportado como no productor de hidrógeno, estuvo presente durante la primera etapa de operación en forma significativa. Sin embargo, después de que el lodo del reactor permaneció almacenado a 4°C (día 100 a día 181) dicho microorganismo disminuyó su abundancia relativa de un 40 a un 3%. El tratamiento en frío podría ser conveniente para desfavorecer su crecimiento de algunas bacterias no productoras de hidrógeno.

Para que el reactor UASB funcione eficientemente es necesario que la biomasa forme gránulos con buena capacidad de sedimentar, este tema no está muy estudiado en reactores UASB de producción de hidrógeno. En este trabajo se observó que si bien la biomasa presentó buena sedimentación, la granulación de la misma no fue suficiente como para evitar la expansión excesiva del manto de lodos en momentos de alta producción de gas. En estos casos se procedió a disminuir la recirculación para evitar la salida de biomasa junto con el efluente. Pero, cuando la producción de gas disminuyó se produjo la compactación del lodo, en consecuencia la superficie de contacto entre la biomasa y el suero disminuía, deteniéndose la producción de biogás. Ante esta situación se buscaba la expansión del manto de lodos aumentando la velocidad de la bomba de recirculación, produciéndose nuevamente el problema anteriormente descripto al aumentar el gas en el sistema.

El trabajo de Fang y colaboradores (Fang, Liu, & Zhang, Characterisation of a hydrogen-producing granular sludge., 2002) demostró que la biomasa en reactores de producción de hidrógeno podría desarrollar gránulos con una alta actividad. En un experimento de 90 días, estos autores operaron un UASB inoculado con biomasa de un reactor de tratamiento de un efluente doméstico no tratado térmicamente. Se observaron gránulos durante el día 15 y el día 60 cuando el reactor estaba operando a una carga orgánica de 49 g/Ld. El tamaño promedio de los gránulos fue de 1,6 mm. El estudio microbiológico realizado mediante clonado y secuenciación, mostró que el 69,1% de los clones pertenecieron a 4 especies de *Clostridium* de la familia *Clostridiaceae* y un 13,5% de *Sporolactobacillus recemicus*. Por lo que demuestran estos autores la granulación en reactores productores de hidrógeno es posible, pero no está claro aún las condiciones que la favorecen ni los microorganismos que están involucrados en el proceso.

El tema de la granulación en reactores hidrogenogénicos, debido a la importancia que tiene para que los reactores UASB funcionen eficientemente, es un tema crucial que amerita más estudios.

7 Resultados RLF

7.1 Operación del reactor

La operación se dividió en 5 etapas (Tabla 24). La etapa 0 se consideró de adaptación, en la que no se detectó producción de gas y se buscó ajustar las distintas variables de operación. En la etapa 1 y 2 se alimentó al reactor con una carga de 20 gDQO/Ld (la diferencia entre ambas fue la diferencia de pH), en la 3 con 30 gDQO/Ld y en la 4 con 40 gDQO/Ld.

Tabla 24-Valores promedios de: carga, pH, remoción de DQO, volumen de gas producido (Qg), proporción de hidrógeno en el gas, velocidad de producción de hidrógeno (VPH) y rendimiento en cada etapa.

	Días	Carga (gDQO /Ld)	pH	% de remoción de DQO	Qg (L/d)	% H_2	VPH (LH_2/Ld)	Rendimiento (mol H_2/mol lactosa)	Conversión de lactosa (%)
Etapa 0	0-6	25,6	4,0	0	0	0	0	0	-
Etapa 1	7-32	21,0	4,8	14,1	2,6	5,6	0,063	0,050	91,6
Etapa 2	33-40	24,0	5,7	31,7	21,6	4,5	0,23	0,16	97,9
Etapa 3	41-47	33,6	6,2	16,2	20,2	9,5	0,76	0,68	99,0
Etapa 4	48-56	35,8	5,6	17,5	26,1	10,3	1,1	0,93	99,0

7.1.1 pH

En la Figura 47 se muestra el pH a lo largo de la operación. El promedio del pH de la alimentación fue de 8,2 con una desviación estándar de 0,4 y el pH promedio de operación fue de 5,2 con una desviación estándar de 0,8 (número de muestras=39). Se observa que en la etapa 1 el valor promedio de pH fue de 4,8, debido a que este valor se consideró muy bajo para la producción de hidrógeno, se decidió ajustar el pH a valores más altos (cercanos a 5,5) durante la etapa 2.

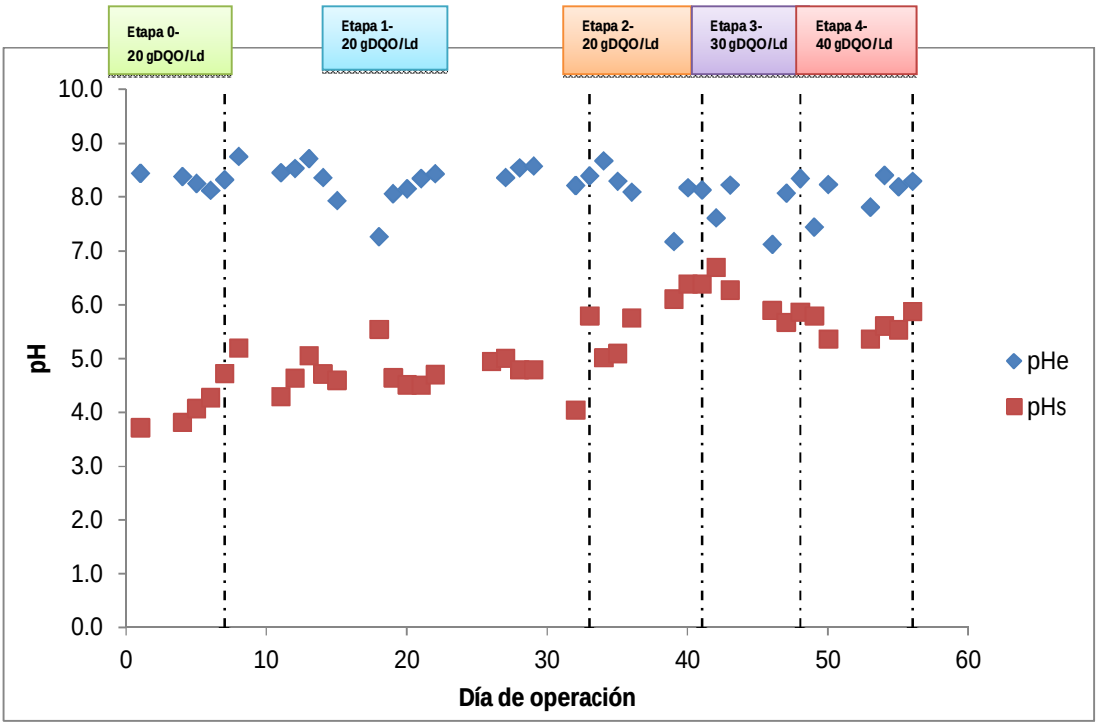

Figura 47- pH entrada y pH salida VS día de operación.

7.1.2 Remoción de DQO

Como se esperaba, la remoción de DQO fue baja, presentando valores en promedio de 16,5% con una desviación estándar de 7,4 (número de muestras=13) (Figura 48).

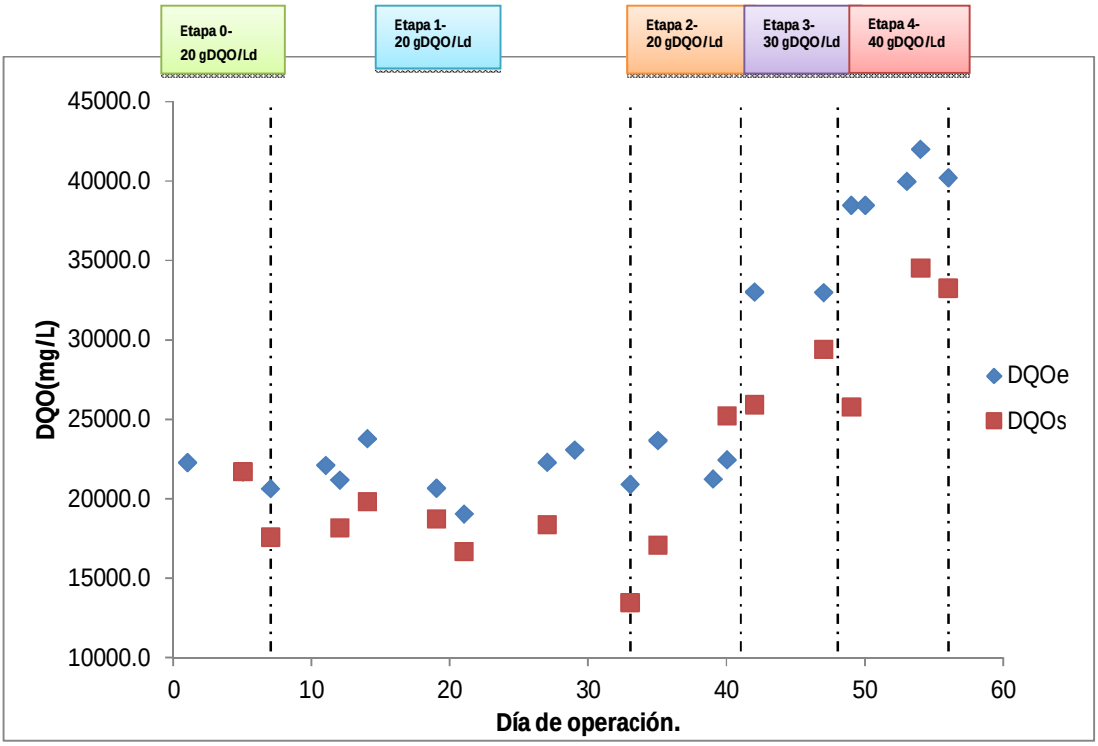

Figura 48- DQOe, DQOs a lo largo de la operación.

7.1.3 Producción de gas

Como se muestra en la Figura 49, se detectó producción de gas a partir del día 7 y la misma fue aumentando al avanzar la operación detectándose un máximo de 28,7 L/d el día 54 etapa 4. En el día 33 se observó una mayor producción de gas que no siguió la tendencia, lo cual se debió a un aumento en el caudal de entrada por problemas operativos con la bomba de alimentación. Tanto el aumento del pH de operación (etapa 2) como el incremento de la carga orgánica (etapas 3 y 4) produjeron un aumento en el caudal de gas producido.

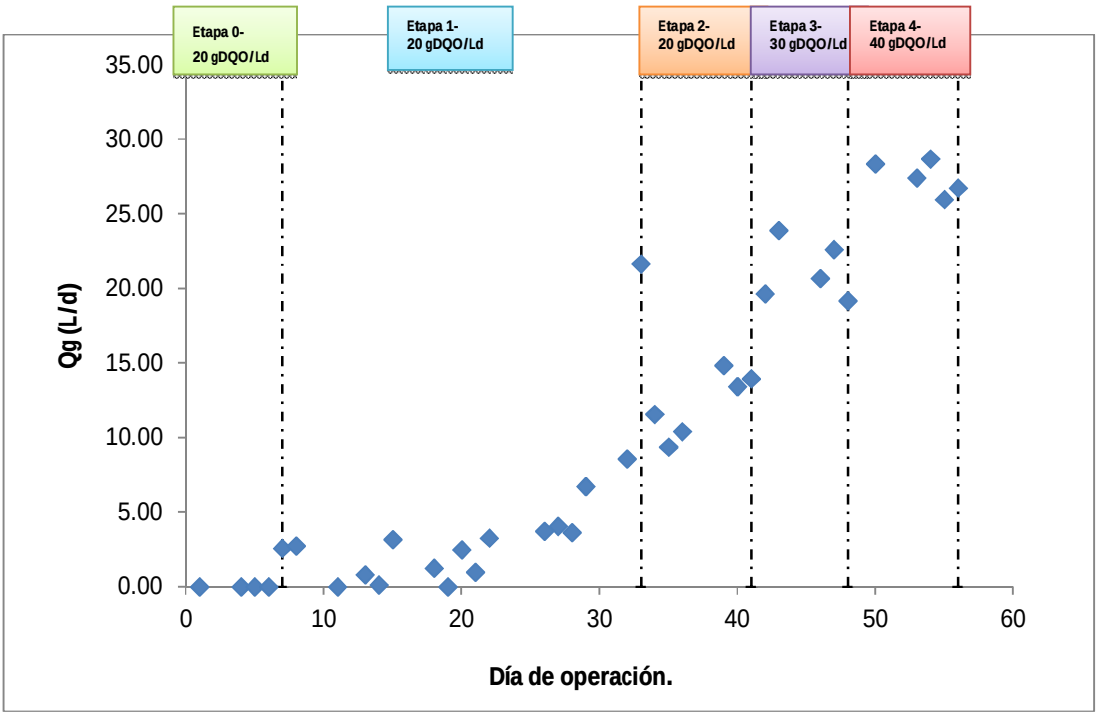

Figura 49- Caudal de gas producido a lo largo de la operación del reactor.

7.1.4 Proporción de hidrógeno en el biogás

Se observó un incremento de la proporción de hidrógeno en el biogás al aumentar la carga orgánica (Figura 50). El máximo porcentaje en la producción de hidrógeno fue detectado en el último día de operación (día 56) con un valor de 13,8% del biogás de salida constituyendo el resto CO_2. En ningún momento de la operación se detectó producción de metano.

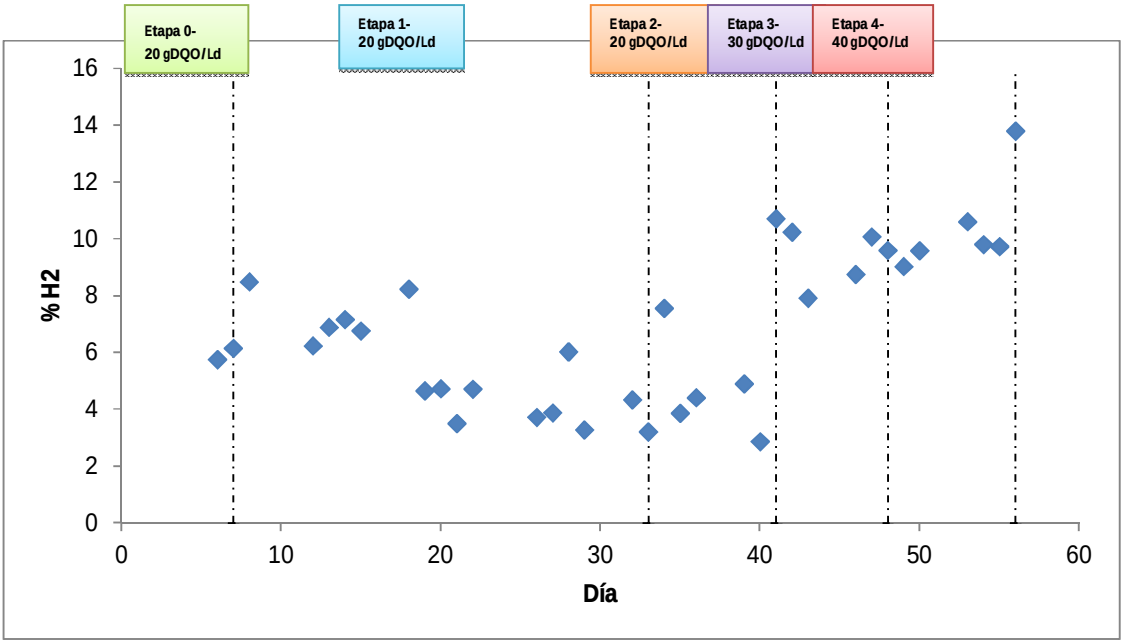

Figura 50- Proporción de H_2 en el biogás a lo largo de la operación.

7.1.5 Velocidad de producción de hidrógeno

La velocidad de producción de hidrógeno también se vio favorecida por el aumento del pH de operación y el aumento en la carga orgánica (Figura 51). La máxima velocidad de producción de hidrógeno fue observada en el día 56, alcanzando un valor de 1,48 LH_2/Ld. El rendimiento fue el mayor observado también el mismo día presentando un valor de 1,1 mol de H_2/mol de lactosa consumida.

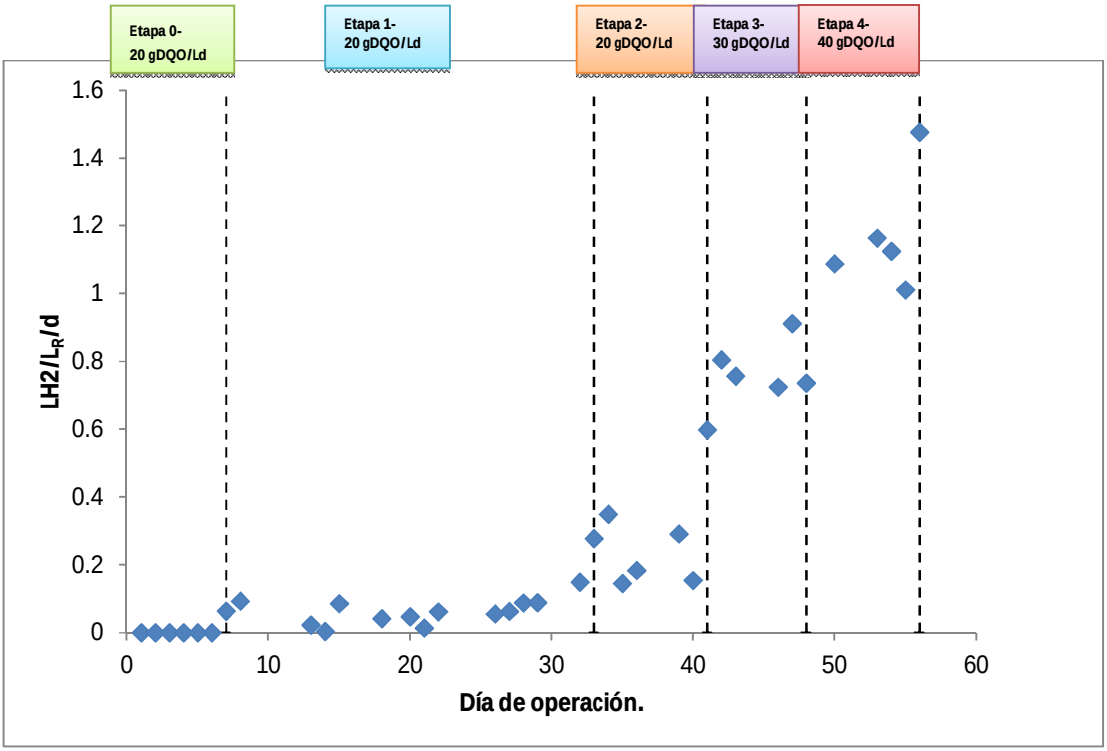

Figura 51- Velocidad de Producción de H_2 durante la operación.

7.1.6 Sólidos volátiles

La concentración de biomasa en todo el reactor fue determinada el último día de operación (día 56), ya que para dicho análisis es necesario desarmar el mismo.

La mayor parte de la biomasa se localizó como biomasa dispersa en los intersticios que deja el lecho representando los SV un 48,3% del total contenida en un volumen de 2 L. En la zona de abajo (cámara de mezcla) se situó el 33,3% de la biomasa en un volumen de 0,5L y la adherida al soporte representó un 18,4% (Figura 52).

El promedio de la concentración de sólidos volátiles en todo el reactor fue de 27,6 g/L. Los sólidos medidos en el efluente presentaron un promedio de 1,4 g/L con una desviación estándar de 0,43 (número de muestras=13) (Tabla 25).

Durante la operación se formó una sustancia blanca que fue acumulándose en la parte inferior del reactor, probablemente constituida por una mezcla de proteínas precipitadas proveniente del suero y biomasa. Dicha acumulación de sólidos representó un problema ya que producía la obstrucción de la entrada de influente. Las medidas que se tomaron de manera de prevenir o minimizar la obstrucción de la entrada fue realizar purgas en la zona de abajo de aproximadamente 100 mL de volumen. Las mismas comenzaron a realizarse todos los días a partir del día 39. Se realizó un total de 11 purgas y se estima que en cada una se purgaron 5 g de SV aproximadamente. De todas maneras se obstruyó la entrada el día 55, situación que se detectó y se solucionó rápidamente mediante una purga de 100 mL volviendo el reactor a su régimen normal de operación. No se observaron problemas de taponamiento del lecho.

Fue necesario lavar y desinfectar periódicamente el tanque de alimentación que se encontraba refrigerado a 4^{o}C, ya que a pesar de la baja temperatura se observó producción de gas en el bidón de stock, indicando la fermentación del suero previo a su entrada al reactor.

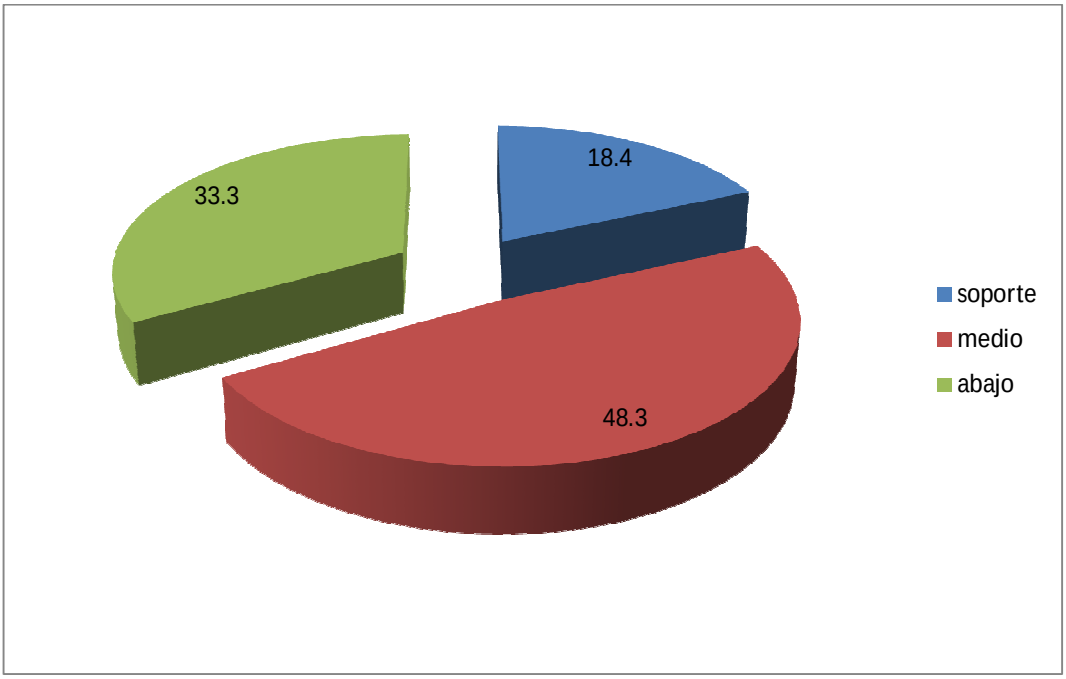

Figura 52-Distribución de la biomasa en el reactor en el día 56.

Tabla 25- Sólidos volátiles del reactor en el día 56.

Localización en el reactor	SV (g)	Concentración de SV
Soporte	12,7	0,016 gSV/g soporte
Medio	33,3	16,64 g SV/L
Abajo	22,9	45,87 gSV/L
Solidos volátiles totales	68,9 g	CSV= 27,6 g/L

7.1.7 Productos de fermentación: ácidos grasos y alcoholes

En la alimentación se detectó la presencia de ácidos grasos en una concentración variable pero siempre menor que 10000m g/L (Figura 53).

La composición de los ácidos grasos producidos varió a lo largo de la operación (Figura 54); con un predominio en la producción de ácidos láctico y acético en las etapas 0 y 1 y un aumento de la producción de ácido butírico y disminución de láctico en las etapas 2, 3 y 4.

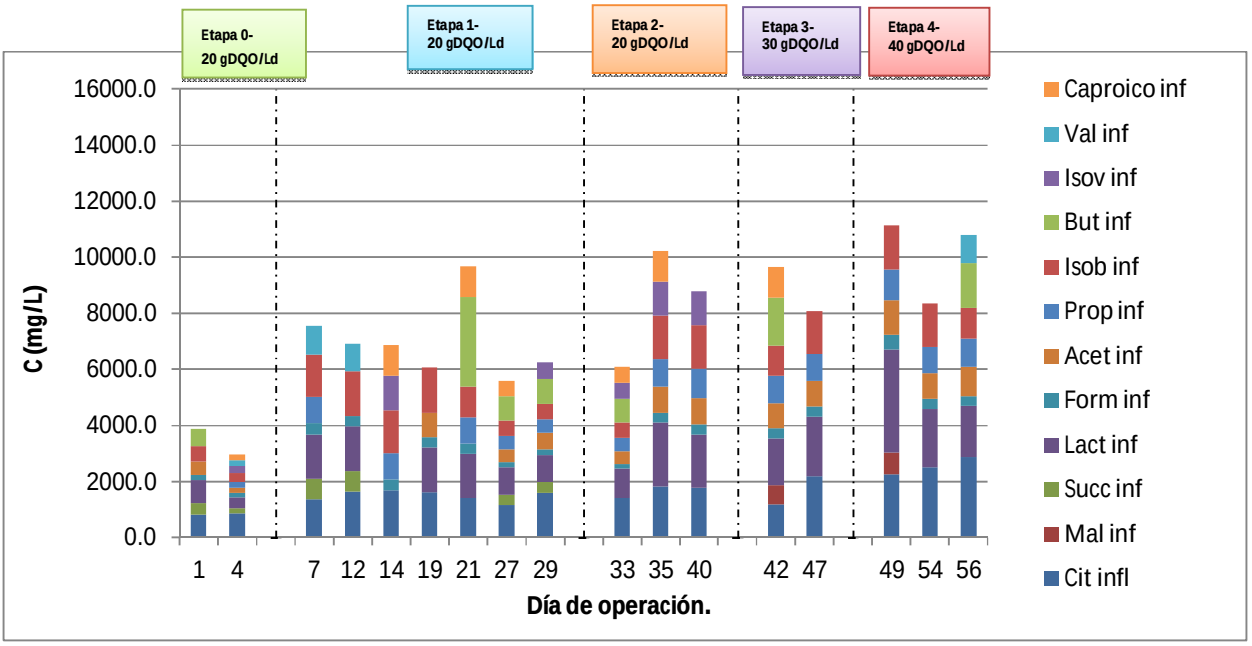

Figura 53- Concentración de ácidos grasos del influente.

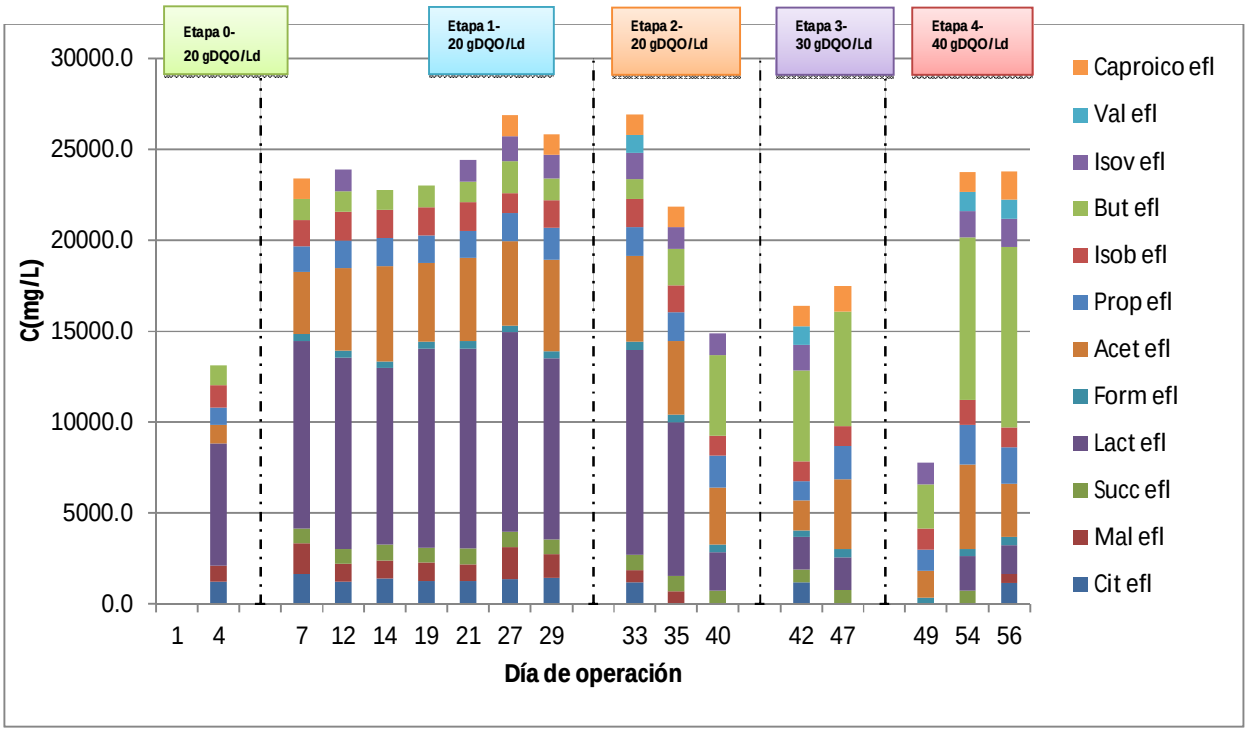

Figura 54- Concentración de ácidos grasos del efluente.

En la Figura 55 se muestra la proporción relativa convertida a DQO de cada ácido graso en el efluente.

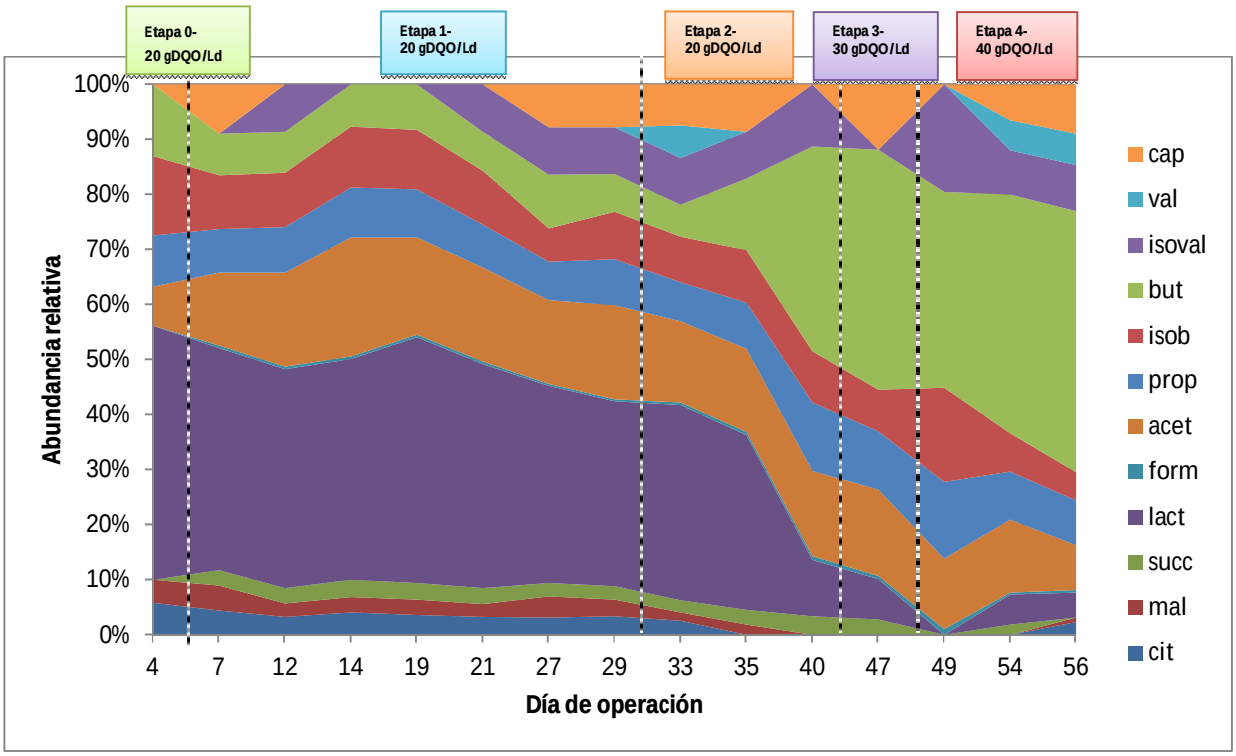

Figura 55- Proporción de ácidos grasos volátiles a la salida expresados en % de DQO.

A partir del día 35 se observó una disminución en la producción de ácido láctico (Figura 56). Dicha disminución coincidió con un aumento en la carga orgánica de entrada que pasó de 20 a 26 gDQO/Ld y a un aumento del pH que paso de 4,8 (etapa 1) a 5,7 (etapa 2) en promedio.

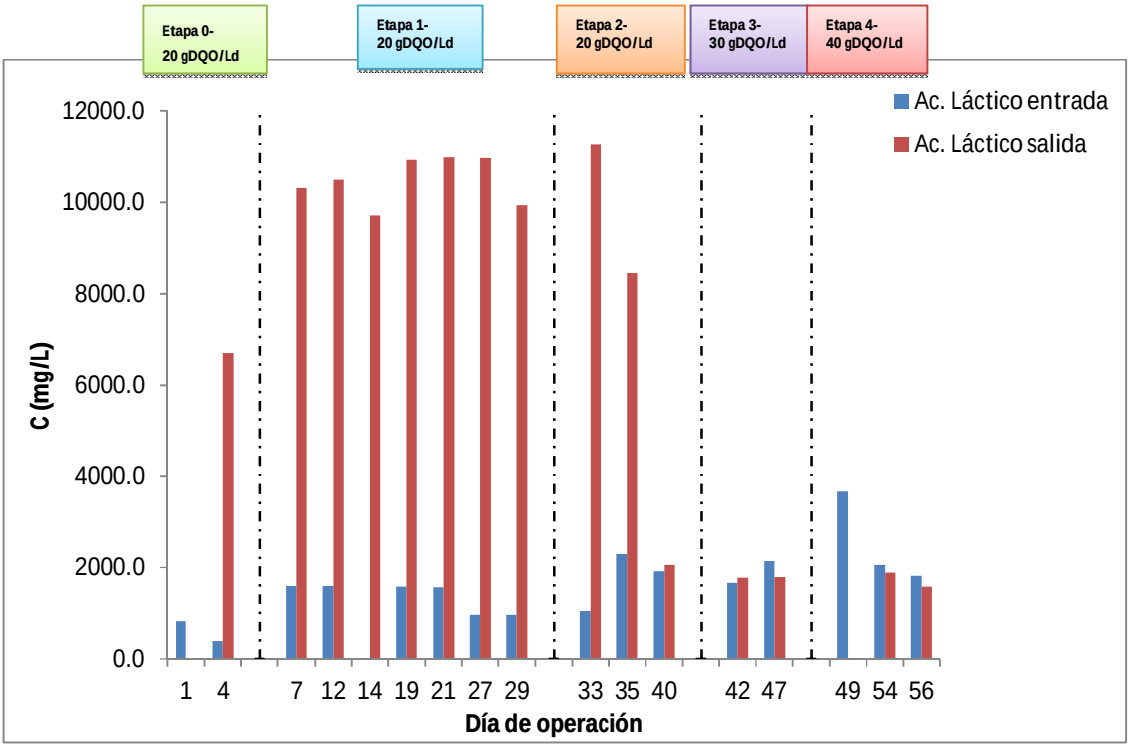

Figura 56- Ácido láctico del influente y del efluente.

A partir del mismo día se comenzó a notar un incremento en la producción de ácido butírico (Figura 57). Dicha tendencia fue observada hasta el final de la operación.

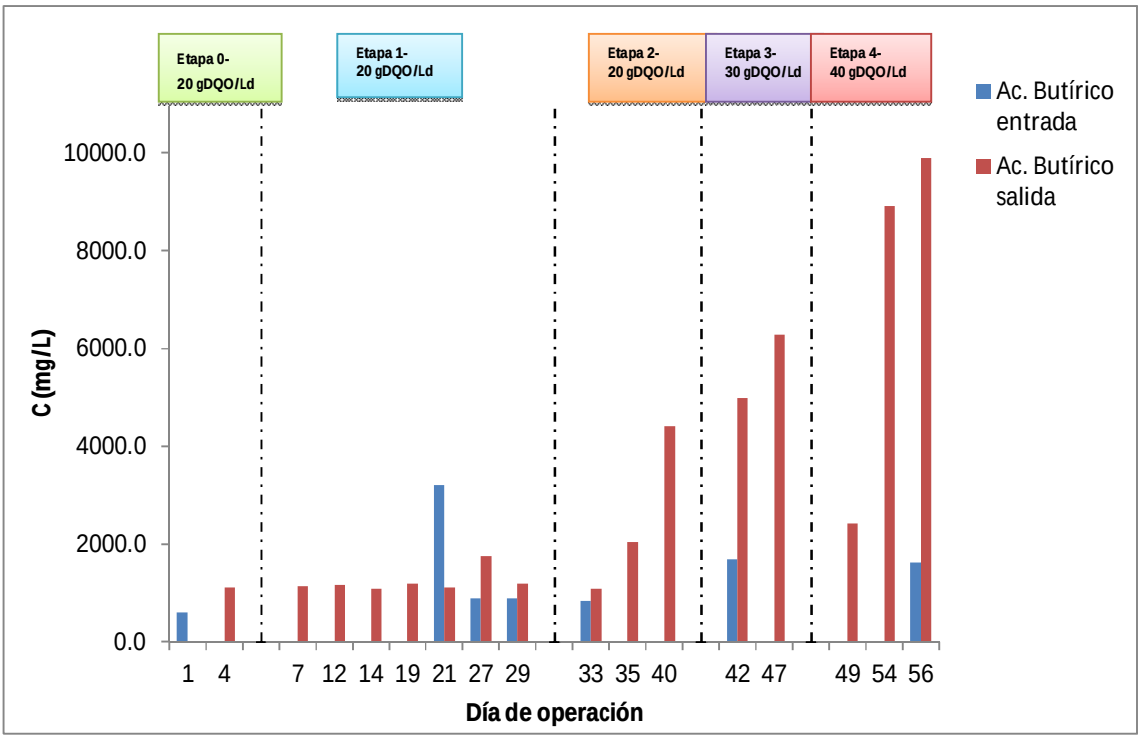

Figura 57- Acido butírico del influente y del efluente.

No se observa una tendencia en la concentración de ácido acético que parecería no haber sido afectado por los cambios de carga y pH (Figura 58).

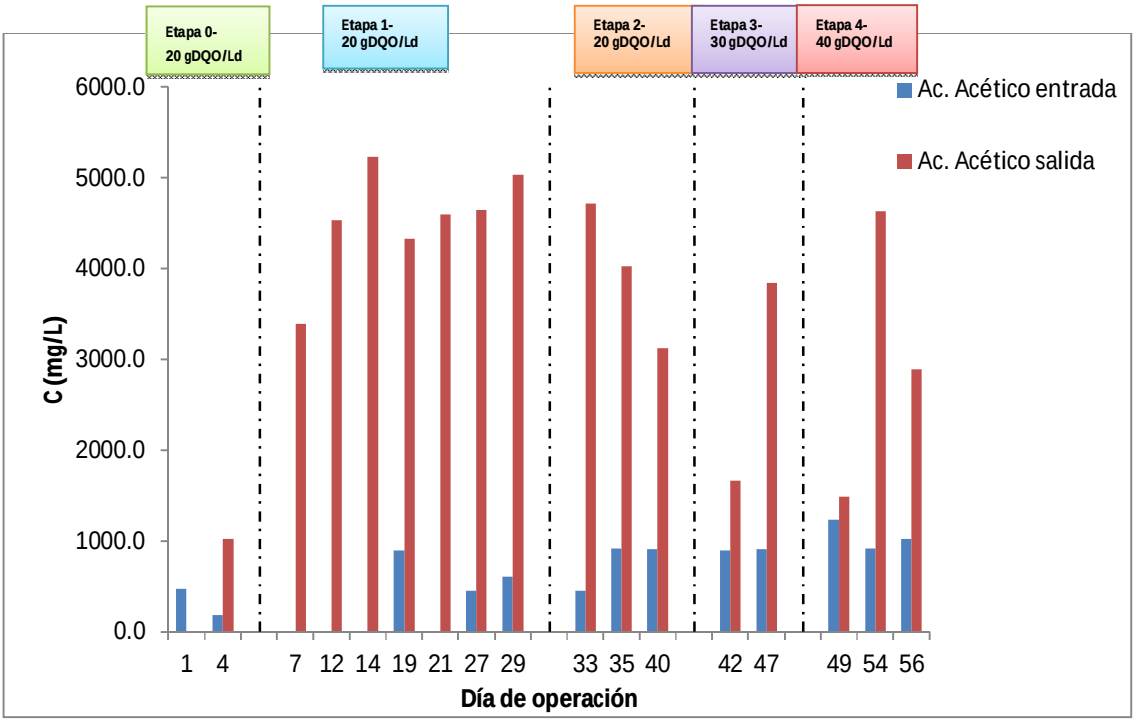

Figura 58- Ácido acético del influente y del efluente.

La producción de ácido propiónico no presentó variaciones significativas a lo largo de la operación, siendo siempre menor a 2500 mg/L.

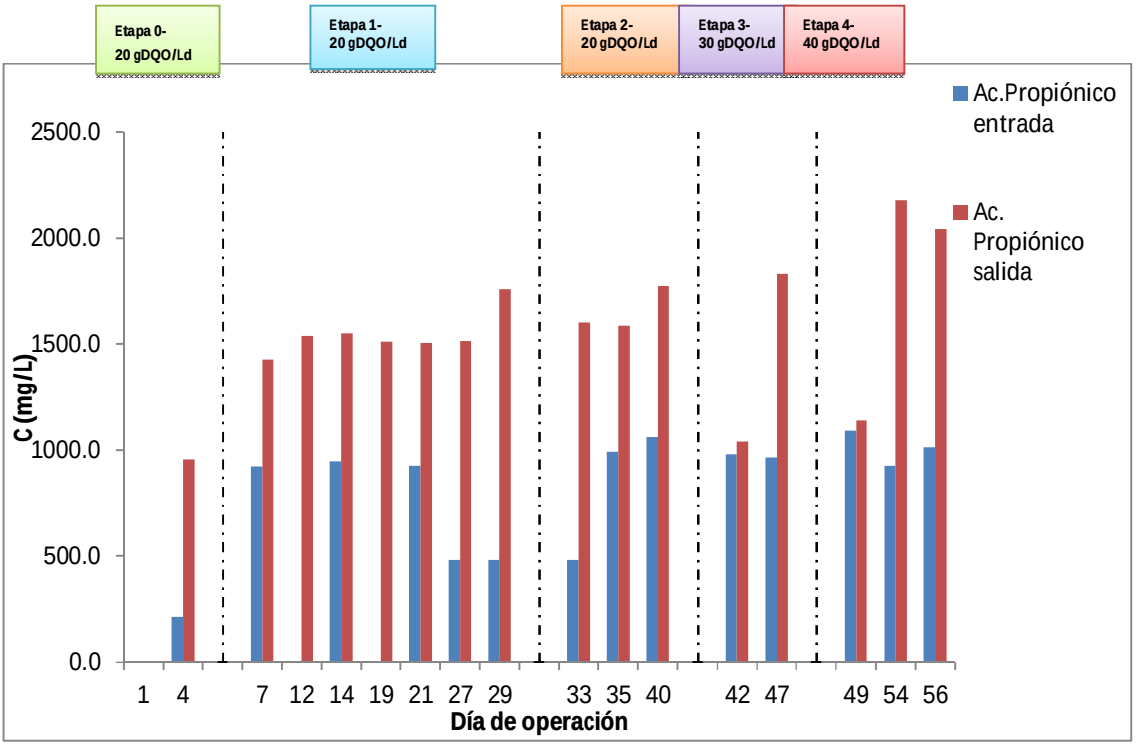

Figura 59- Acido propiónico del influente y del efluente.

Como se observa en la Figura 60 la producción de etanol se incrementó con el aumento de la carga de 20 a 30 gDQO/Ld, aunque disminuyó con el cambio de 30 a 40, siempre permaneciendo mayor que cuando el reactor fue alimentado con 20 gDQO/Ld.

La disminución que se observó en la concentración del influente del día 42 es debida al lavado y desinfección del bidón donde se almacenaba la alimentación. Se había observado la formación de un bio-film que podría estar involucrado en la fermentación del influente almacenado a 4^{o}C. Para evitar esta fermentación se decidió lavar y desinfectar el recipiente donde se almacenaba.

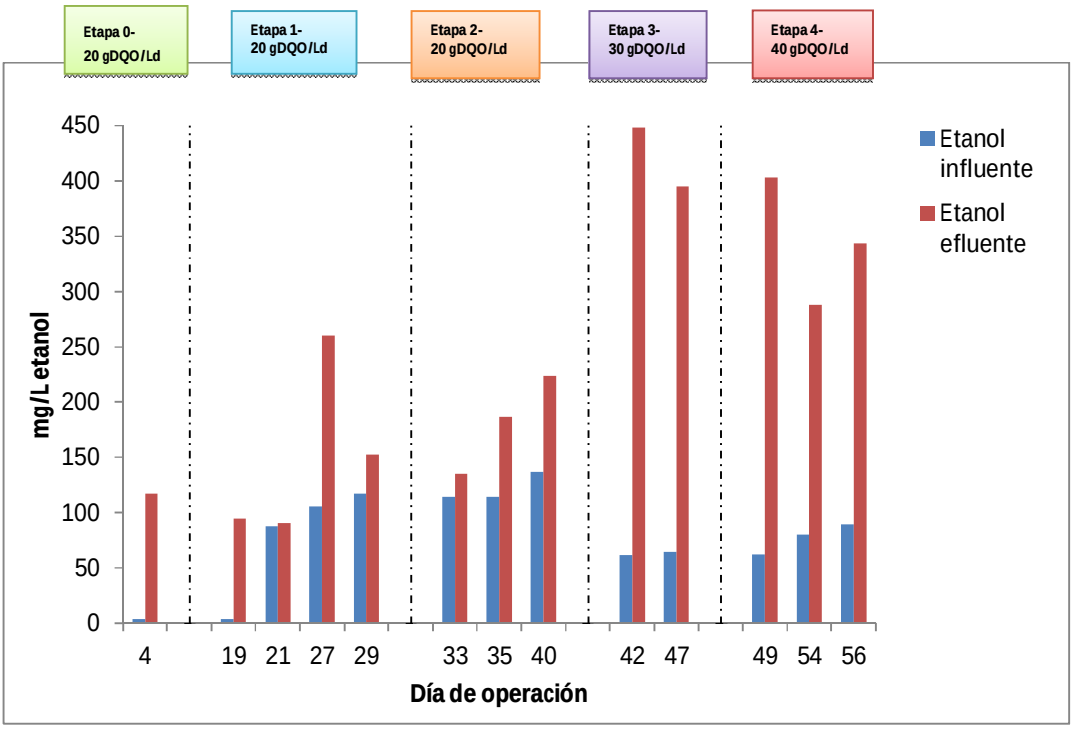

Figura 60- Etanol del influente y del efluente.

7.2 Seguimiento de la población bacteriana

7.2.1 Cuantificación del gen de Fe-Fe hidrogenasa mediante Real-time PCR

Como forma de determinar la proporción de bacterias productoras de hidrógeno con la enzima Fe-Fe hidrogenasa, se determinó el número de copias de este gen/ng de ADN en muestras tomadas a lo largo de la operación y en diferentes partes del reactor. Se observó un incremento en el número de copias del gen durante la operación respecto a la cantidad presente en el inóculo. Este incremento indica un enriquecimiento en bacterias productoras de hidrógeno a lo largo de la operación. La mayor proporción se obtuvo cuando la carga fue de 40 gDQO/Ld, coincidente con el incremento en la producción de ácido butírico a esa carga y con el mayor rendimiento en hidrógeno (Figura 61).

También se detectaron, para un mismo día, mayor número de genes Fe-Fe hidrogenasa en las muestras obtenidas de la zona del medio del reactor (líquido de intersticio entre el soporte) que las tomadas de abajo (cámara de mezcla). La muestra obtenida de la biomasa adherida al soporte fue la que presentó menor proporción de este gen. La relación entre las proporciones de este gen en las distintas zonas del reactor fueron: 9:2:1 (zona del medio: zona de abajo: superficie del soporte) (Figura 62). Estos resultados indican que si bien se detectan los genes de Fe-Fe hidrogenasa en todas las muestras de biomasa del reactor, la mayor proporción de organismos con este gen está presente en la biomasa suspendida en la zona del lecho, y no adherida al soporte.

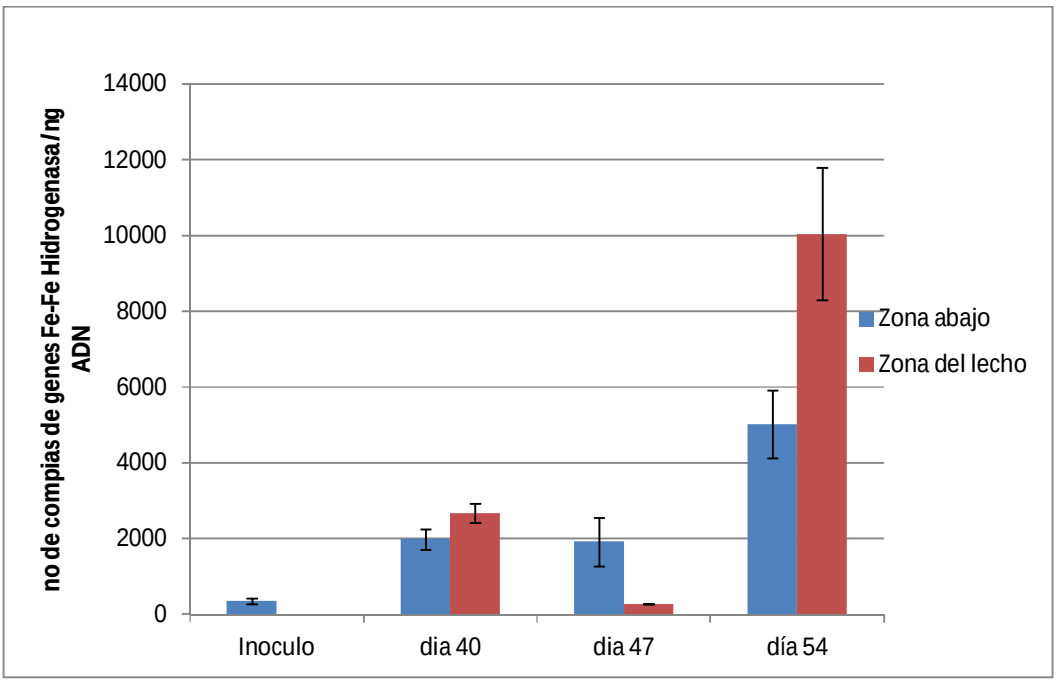

Figura 61-Copias de Fe-Fe hidrogenasa/ng ADN del inóculo y de muestras tomadas de la zona de abajo del reactor y de la zona del lecho del reactor a las diferentes cargas a las que fue operado el mismo. Los resultados son los promedios de triplicados de la cuantificación por PCR en tiempo real, se muestran las barras de error que representan la desviación estándar entre los triplicados.

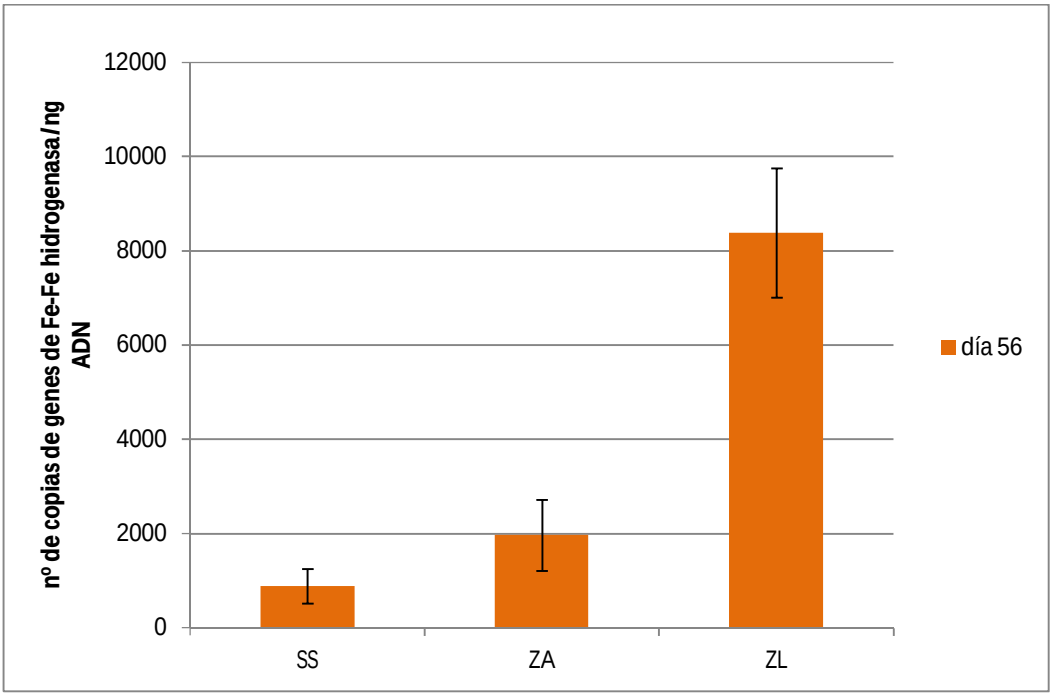

Figura 62- Copias de Fe-Fe hidrogenasa ng ADN en muestras tomadas en diferentes zonas del reactor al final de la operación (día 56), SS=biomasa adherida a la superficie del soporte, ZA=zona de la cámara de mezcla en la parte de abajo del reactor, ZL=biomasa en suspensión en el liquido de los intersticios del lecho.Los resultados son los promedios de triplicados de la cuantificación por PCR en tiempo real, se muestran las barras de error que representan la desviación estándar entre los triplicados.

7.2.2 Análisis de la comunidad microbiana por T- RFLP del gen del ARNr de 16S

Del análisis de la comunidad microbiana realizado por T-RFLP se observó que la comunidad del inóculo era más diversa que la de las muestras del reactor (Figura 63). Existen además diferencias entre las muestras tomadas de la biomasa de la zona de abajo del reactor y las tomadas de la zona del medio. En las muestras de la zona de abajo del reactor prevalecen los picos 178 y 569 y en la zona del medio el pico 67.

En el gráfico y en el análisis de Cluster (Figuras 63 y 64), se observa claramente la diferencia entre la población desarrollada en la parte de abajo del reactor (cámara de mezcla) y en la zona del medio del reactor (zona del lecho) para todas las cargas. Ambas poblaciones presentaron tan solo un 24% de similitud y el inóculo menos de un 12 % con ambas.

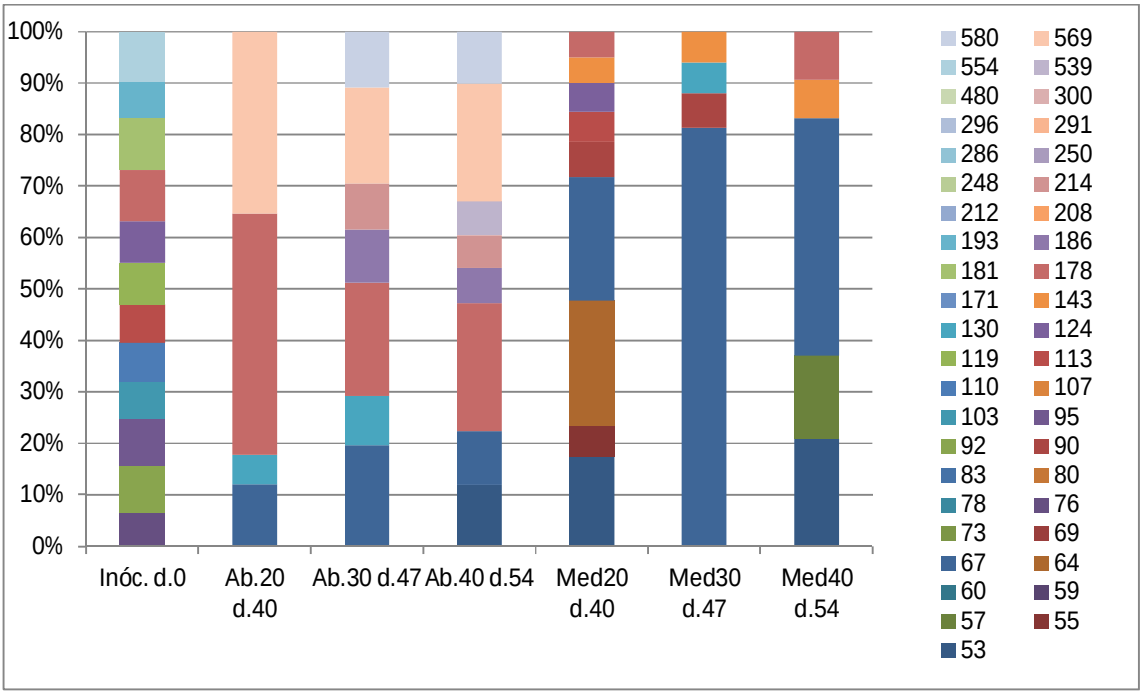

Figura 63- Análisis de la comunidad microbiana por T- RFLP del gen del ARNr de 16S del reactor.

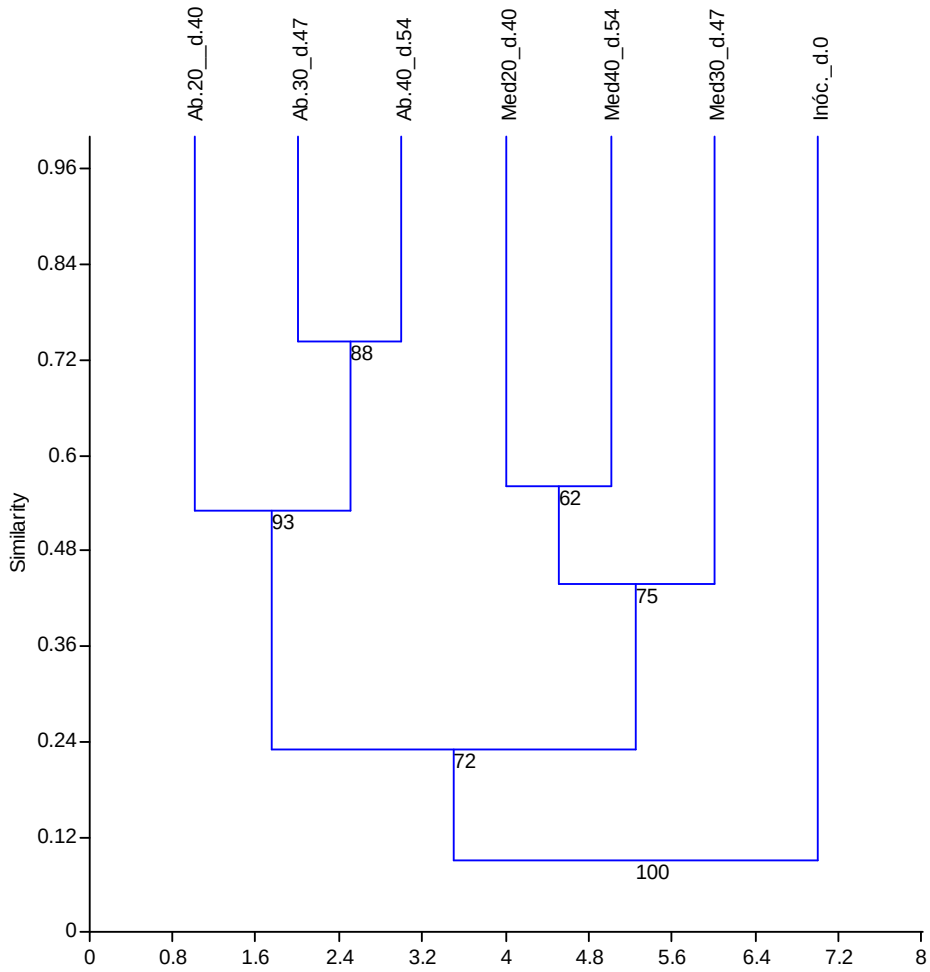

Figura 64- Análisis de Cluster delos perfiles obtenidas por T-RFLP del gen del ARNr de 16S del reactor, utilizando el programa PAST y el algoritmo "pairedgroup" y la medida de similitud de Bray Curtis.

En el día 56, antes de desarmar el reactor se tomaron muestras de 3 puntos del reactor. De la zona de abajo, 1P, 3P (medio) y 5P, en orden ascendente a lo largo del lecho para determinar si se podían detectar diferencias a lo largo del mismo también. También se tomó una muestra de biomasa de la superficie del soporte.

Los perfiles de T-RFLP de las muestras tomadas en los diferentes puntos del reactor mostraron una gran diversidad y una gran variación entre ellas (Figura 65). No se observó un predominio de ninguno de los T-RFs en las muestras tomadas de los perfiles. Las muestras del soporte presentaron menor diversidad con una abundancia relativa alta de los picos correspondientes a 178 y 186 nucleótidos (24 y 23% respectivamente).

De acuerdo al resultado del análisis de Cluster (Figura 66), las muestras que mejor agruparon fueron la tomada de la parte de abajo del reactor con la tomada de la superficie del soporte, con una similitud de aproximadamente 50 %. Ambas muestras presentaron un 40% de similitud con la muestra 1P.

La muestras superiores mostraron alrededor de un 20% de similitud entre ellas y con las muestras de abajo, soporte y 1P.

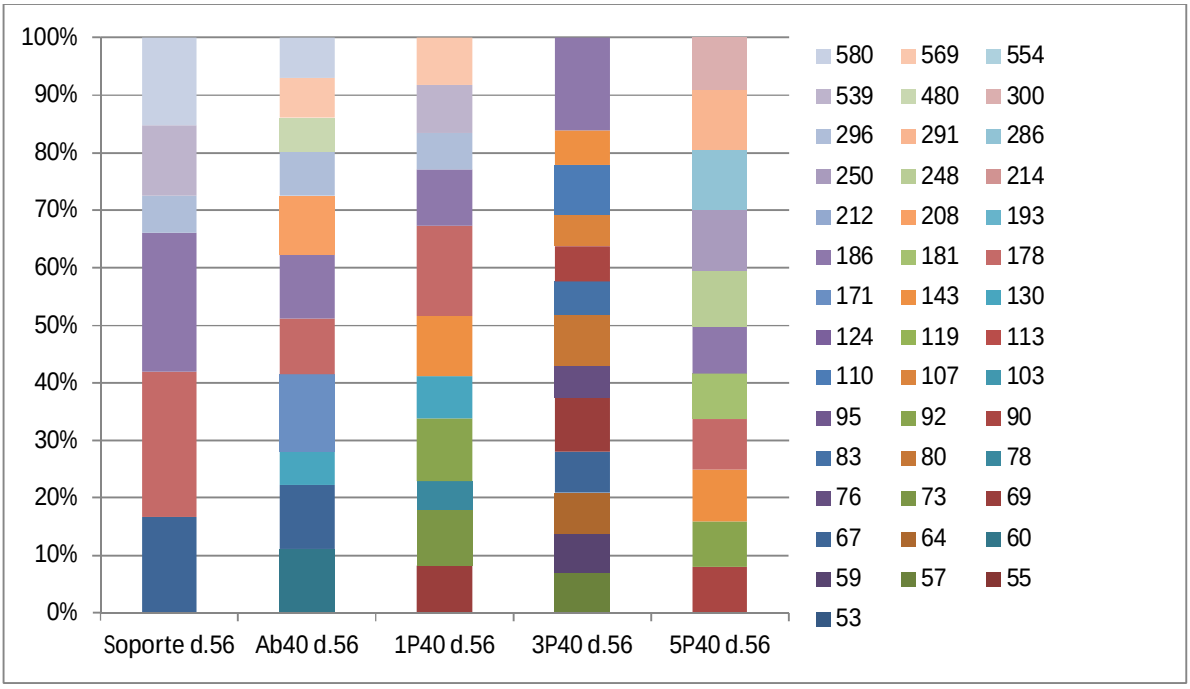

Figura 65- Análisis de la comunidad microbiana por T- RFLP del gen del ARNr de 16S del reactor de muestras tomadas de diferentes puntos del reactor el día 56.

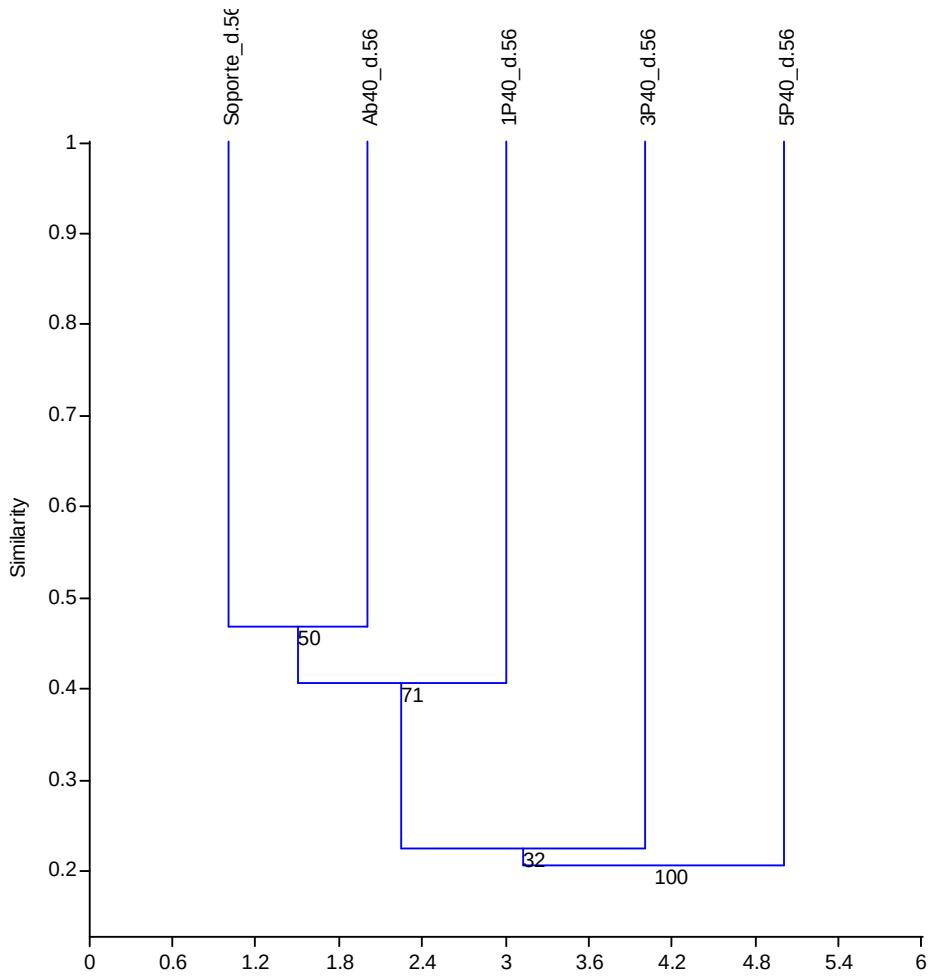

Figura 66- Análisis de Cluster de los perfiles de T-RFLP del gen del ARNr de 16S de muestras tomadas de diferentes puntos del reactor el día 56.

7.2.3 Caracterización de los aislamientos

Se aislaron 16 microorganismos de las muestras tomadas de las diferentes zonas del reactor utilizando las diferentes estrategias de aislamiento. Según el análisis de la secuencia de gen del ARNr de 16S los aislamientos se clasificaron dentro de los géneros *Klebsiella, Clostridium, Enterococcus, Streptococcus, Pseudomonas, Achromobacter, Micrococcus y Lactobacillus*. Se determinó la capacidad de producir hidrógeno de los aislamientos por cultivo en batch. Solamente los aislamientos caracterizados dentro de los géneros *Clostridium y Klebseilla* presentaron producción de hidrógeno por fermentación. En el cultivo de la cepa caracterizada como *Lactobacillus casei* se detectó una muy baja producción de hidrógeno (cerca del límite de detección del método (Tabla 26)).

De los 16 aislamientos caracterizados 13 se pudieron correlacionar con picos presentes en el T-RFLP. Estos aislamientos se caracterizaron dentro de los géneros *Streptococcus, Pseudomonas, Lactobacillus* y *Clostridium* (Tabla 26).

De acuerdo a la bibliografía (Gottschalk, 1986) los principales productos de fermentación de los aislamientos fermentadores serían los ácidos acético, butírico y láctico lo que está de acuerdo con los ácidos producidos en el reactor (Tabla 26).

Tabla 26- Cepas aisladas del reactor, caracterización de acuerdo al análisis del gen del ARNr de 16S producción de hidrógeno en cultivos en batch. Se incluye el tamaño del fragmento esperado calculado a partir de la secuencia (T-RF) y los productos de fermentación según la bibliografía (Gottschalk, 1986). Muestras tomadas el día 56. Los métodos se encuentran detallados en Materiales y Métodos.

Método	Identificación	Localización	Clasificación	H_2	T-RF esperado	Productos de fermentación	Muestras en que se detecta el T-RF
2	P1	Abajo	*Streptococcus sp. G3*	-	555	Láctico	Inóculo
2	P2	Abajo	*Klebsiella pneumoniae*	+	494	2,3-butanodiol Láctico, acético, fórmico, etanol	n.d.
1	P3	Abajo	*Streptococcus sp. G3*	-	555	Láctico	Inóculo
2	P5	SL (3 L)	*Enterococcus gallinarum*	-	59	Láctico	Medio 54 y 56. Abajo 56
2	P6	ZL (1P)	*Streptococcus sp. G3*	-	555	Láctico	Inóculo
2	P7	ZL (5P)	*Pseudomona stutzeri*	-	490	No fermentadora	n.d.
2	P8	ZL (6P)	*Pseudomona aeruginosa*	-	143	No fermentadora	Medio 40, 47, 54, 56 1P, 3P, 5P
1	P9	ZL	*Achromobacter piechaudii*	-	490	No fermetnadora	n.d.
1	P11	Abajo	*Micrococcus luteus*	-	279	No fermentadora	n.d.

3	**L1**	**Abajo**	***Lactobacillus casei***	**-**	**573**	**Láctico**	**Medio y abajo días 40, 47, 54, 56, 1P, 3P, 5P**
3	**L2**	**SL**	***Lactobacillus brevis***	**-**	**572**	**Láctico**	**Medio y abajo días 40, 47, 54, 56, 1P, 3P, 5P**
3	**L4**	**ZL**	***Lactobacillus casei***	**-**	**573**	**Láctico**	**Medio y abajo días 40, 47, 54, 56, 1P, 3P, 5P**
6	**V1**	**Abajo**	***Lactobacillus casei***	**+/-**	**573**	**Láctico**	**Medio y abajo días 40, 47, 54, 56, 1P, 3P, 5P**
4	**V2**	**Abajo**	***Clostridium tyrobutyricum***	**+**	**519**	**Acético, butírico**	**Sup lecho, abajo dia 47, 54, 56 medio día 47**
5	**V3**	**SL**	***Clostridium beijerinckii***	**+**	**520**	**Acético, butírico**	**Sup lecho, abajo dia 47, 54, 56 medio día 47**
4	**V4**	**SL**	***Clostridium tyrobutyricum***	**+**	**519**	**Acético, butírico**	**Sup lecho, abajo dia 47, 54, 56 medio día 47**
5	**V5**	**ZL**	***Clostridium tyrobutyricum***	**+**	**519**	**Acético, butírico**	**Sup.lecho, abajo dia 47, 54, 56 medio d. 47**

7.2.4 Análisis filogenético

Con las secuencias de los aislamientos y las secuencias depositadas en el banco de datos (NCBI) más cercanas se construyó un árbol filogenético (Figura 67). El análisis muestra que los aislamientos se distribuyen en tres filum: Firmicutes (54,5%), Proteobacteria (36,4%) y Actinobacteria (9,1%).

Dentro del filum Firmicutes las secuencias se agruparon con secuencias de *Clostridium, Lactobacillus, Streptococcus , Enterococos y Leuconostoc.* Del de Actinobacteria con secuencias de *Micrococcus* y dentro del *Proteobacteria* se encontraron los géneros *Achromobacter, Pseudomonas y Enterobacter.*

Organismos del género *Clostridium* solo fueron aislados de muestras tratadas térmicamente (método 4 y 5). Organismos del género *Lactobacillus* se lograron aislar a partir de diluciones

sucesivas en medio PYG de la muestra no tratado térmicamente (método 6) y de placas con MRS (método 3). Las demás especies fueron aisladas de muestras no tratadas térmicamente y aisladas en TSA en condiciones aerobias (métodos 1 y 2).

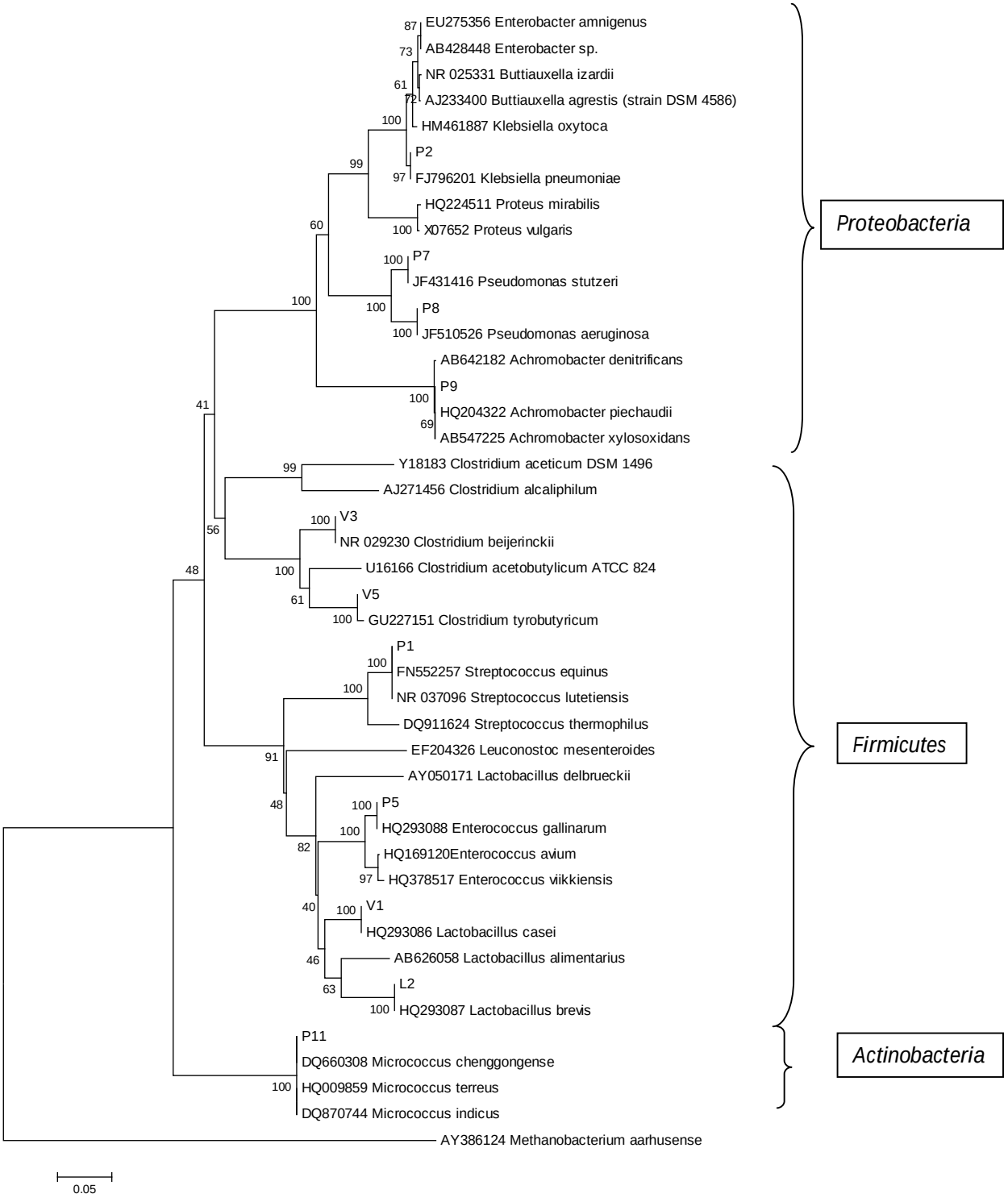

Figura 67- Árbol filogenético con los aislamientos del reactor de lecho fijo del día 56 de operación. El árbol fue construido con secuencias de 608 pb.

8 Discusión RLF

En el presente estudio se demostró que es posible la producción de hidrógeno en un reactor de lecho fijo utilizando suero de queso en polvo como sustrato. El reactor se comenzó a operar a una carga de 20 gDQO/Ld y se fijó un TRH de 24 h, de manera de poder comparar la performance de este reactor con la del UASB descripto en la primera parte de este trabajo.

La producción de gas fue estable en cada etapa, y a lo largo de la operación aumentó el rendimiento y la velocidad de producción de hidrógeno llegando a un máximo de 1,1 mol de H_2 por mol de lactosa consumida y 1,48 LH_2/Ld respectivamente, ambos valores registrados el último día de operación (día 56), correspondiente a la etapa en la cual el reactor se alimentó a una carga de 36 gDQO/Ld y un pH de 5,6 en promedio.

Se realizó un perfil de ácidos grasos, lactosa y DQO el día que se desarmó el reactor obteniéndose valores similares a lo largo del lecho, lo que podría indicar en principio que la mayor parte del hidrógeno y conversión de sustrato se estaría produciendo únicamente en la zona de abajo. Sin embargo, en los resultados de T-RFLP se observaron picos correspondientes a microorganismos del género *Clostridium* a lo largo de todo el reactor y en el análisis de real time PCR, se constató mayor proporción de genes de Fe-Fe hidrogenasa en los intersticios del lecho y adheridos al soporte, que abajo, lo cual sugiere que en el lecho también se estaría produciendo H_2. La ausencia de un perfil en los valores de DQO, ácidos grasos y lactosa podría deberse entonces, a la agitación del líquido debido a la alta producción de gas en el sistema.

De muestras tomadas de diferentes partes del reactor, se aislaron microorganismos de los géneros *Clostridium y Klebsiella,* cuya propiedad de producción de hidrógeno ha sido ampliamente reportada (Gottschalk, 1986) y verificada experimentalmente en este trabajo. Pero, también se aislaron microorganismos no productores de hidrógeno pertenecientes a los siguientes géneros: *Enterococcus, Streptococcus, Pseudomonas, Achromobacter, Micrococcus y Lactobacillus.* Estos microorganismos pueden competir por el sustrato disminuyendo la eficiencia del proceso. Sin embargo, todos estos organismos pueden respirar oxígeno contribuyendo a la anoxia dentro del sistema, ventaja para microorganismos anaerobios estrictos tales como los del género *Clostridium*.

De los 16 aislamientos caracterizados 13 se pudieron correlacionar con picos presentes en el T-RFLP. Estos aislamientos se caracterizaron dentro de los géneros *Streptococcus, Pseudomonas, Lactobacillus* y *Clostridium.* T-RF correspondientes a *Clostridium* se detectaron en baja proporción (menos de un 4% de la población).

Los resultados de T-RFLP marcaron una diferencia notoria entre la biomasa tomada de muestras de la zona de abajo y la zona intersticial ocupada por el soporte. Picos predominantes en la muestra tomada de la cámara de mezcla de abajo del reactor se correlacionaron a secuencias de aislamientos del género *Lactobacillus*. El pico en mayor proporción detectado en la muestra de la zona del lecho fue el 67 nucleótidos (también detectado en el UASB), que no se pudo correlacionar con ninguna secuencia proveniente de los aislamientos.

El inóculo presentó mayor diversidad que las muestras tomadas a lo largo de la operación, esto indica que hubo una selección de microorganismos durante la operación. Las muestras del perfil del reactor en el día 56 no resultaron muy similares. Se observó mayor similitud entre la muestra tomada de la parte de abajo del reactor y la de la superficie del soporte que con las tomadas de los diferentes puntos del lecho. Esto indicaría que la biomasa del soporte remanente podría estar cayendo acumulándose en la zona de abajo a medida que se desprende del soporte.

La presencia de bacterias del género *Clostridium* se correlacionó con la producción de ácido butírico que acompañó la producción de hidrógeno. Las cepas aisladas provenientes de la superficie del lecho se caracterizaron como *Clostridium beijerinckii*, mientras que las cepas aisladas de todo el reactor (Ab, ZL, SL) como *Clostridium tyrobutyricum.* Se ha reportado que cultivos de organismos caracterizados como *Clostridium tyrobutyricum* en presencia de acetato, puede fermentar el lactato a butirato, CO_2 y H_2 (Balow, Truper, Dworkin, & Harder, 1992), por lo que la presencia de este microorganismo es altamente favorable, ya que podría estar consumiendo el ácido láctico y transformándolo a butírico con producción de hidrógeno.
T-RFs correlacionados con secuencias del género *Lactobacillus* fueron detectados en la zona de abajo en donde representaron una abundancia relativa de 82% en el día 40, disminuyendo a 25% el último día, momento en que también representaron el 25% de la población adherida al soporte. Correlacionando estos datos con la producción de hidrógeno, se observa que la disminución de la población del género *Lactobacillus* acompañó el aumento en la producción de hidrógeno.
La cepa del género *Klebsiella* si bien no se detectó en el T- RFLP, fue aislada del reactor de la muestra tomada de la cámara de abajo. Este microorganismo podría estar compitiendo por la lactosa en la entrada del reactor, con los organismos del género *Lactobacillus* no hidrógenogénicos. La producción de etanol observada en el efluente podría deberse a la presencia de organismos del género *Klebsiella*, que iría acompañada de producción de hidrógeno.

Comparando los resultados con otros trabajos de reactores de lecho fijo (Tabla 3) se observa que los rendimientos obtenidos en este trabajo son menores pero la carga aplicada fue también mucho menor que la utilizada por los otros autores.
En particular, otros autores (Peixoto, 2008) y (Leite, Fernandes, Pozzi, Barboza, & Zaiat, 2008) operaron reactores de lecho fijo a cargas de 100 gDQO/Ld, lo que indicaría que es posible en nuestro reactor llegar a cargas mayores. Incluso podría llegar a operarse a una carga tal en la que no resultara necesario diluir el suero resultante del proceso de producción de queso (entre 60 y 80 gDQO/L), lo que resulta una ventaja en lo que respecta al tamaño de los equipos para tratar dicho residuo y en el ahorro de agua, lo que hace más económica esta alternativa para tratar el suero de quesería.

Sin embargo, en este trabajo de Tesis no se observaron problemas de taponamiento del lecho, esto puede también deberse a que no se operó a cargas tan altas por lo que habría que determinar cuál sería la carga óptima para aumentar la producción de hidrógeno evitando problemas de colmatación del lecho.

Por otra parte, habría que intentar lograr proporciones de hidrógeno mayores en el biogás, una alternativa seria partir de un inóculo sin bacterias lácticas e investigar si se alcanzan porcentajes similares o superiores a los detectados en el UASB

9 Comparación UASB y RLF

El tiempo de retención hidráulico tanto en el UASB como en el reactor de lecho fijo fueron fijados en base al estudio de Yang y colaboradores (Yang, Zhang, & Benemann, 2007), que utilizaron un RCA alimentado con suero de queso para producción de hidrógeno y observaron que no se degradó completamente la lactosa a TRH menores a 24 horas. Sin embargo, en este trabajo, la conversión de lactosa en el reactor de lecho fijo fue en promedio de 95%, llegando a 99% en la última etapa y en el UASB la conversión fue total en los puntos medidos. Además, en un trabajo posterior (Davila-Vazquez, Cota - Navarro, Rosales - Colunga, de León- Rodríguez, & Razo- Flores, 2009) llegan a un óptimo en la producción de hidrógeno trabajando a TRH de 6 h, y mencionan también la diferencia en el óptimo TRH que tienen con el trabajo de Yang y colaboradores.

Estos resultados sugieren que ambos sistemas podrían operar a TRH menores, y de este modo hacer uso de la ventaja operativa de los filtros anaerobios y los UASB, que permiten mantener una alta concentración de biomasa a bajos tiempos de retención hidráulicos.

Tabla 27- Comparación de máximos puntuales y promedios de la etapa en que se detectó mayor producción de hidrógeno en ambos reactores.

	UASB		RLF	
	Promedio	Máxima	Promedio	Máxima
Velocidad de producción LH_2/Ld	0,7	2	1,1	1,5
Rendimiento mol H_2/mol lactosa	0,7	1.9	0,9	1,1

Como se observa en la Tabla 27 el UASB presentó mayores valores máximos puntuales de velocidad de producción de hidrógeno y rendimiento, 1,3 y 1,7 veces más que el reactor de lecho fijo. Sin embargo, en las etapas en las que se dio la producción más alta de hidrógeno, los valores promedios fueron mayores para el reactor de lecho fijo. Debido a la gran variación obtenida en la producción de hidrógeno para el UASB los valores máximos fueron puntuales y no son muy representativos de la operación del reactor.

Por otro lado la mayor carga alcanzada en el UASB fue de 30 gDQO/Ld, deteniéndose la producción de gas al tratar de aumentar la misma a 40 gDQO/Ld, mientras que en el reactor de lecho fijo se alcanzó este valor sin dificultades y con una respuesta favorable del sistema. Cabe resaltar que el UASB fue alimentado con suero crudo, influente más inestable que una preparación a partir de suero de queso en polvo, factor que podría ser en parte responsable de las grandes fluctuaciones en la producción de gas detectadas en el UASB.

El porcentaje de H_2 fue mayor en el UASB en el que se inoculó el reactor con un compost y se llegó a valores de 36% de hidrógeno en el biogás de salida, mientras que el máximo en el lecho fijo, inoculado con lactosuero crudo, fue de 13,8% (día 56) coincidente con la detección de menor cantidad de bacterias lácticas. En el estudio de Noike y colaboradores (Noike, Takabatake, Mizuno, & Ohba, 2002), se plantea que las bacteriocinas excretadas por las

bacterias del ácido láctico (por ejemplo, *Lactobacillus paracasei*) podrían inhibir la producción de hidrógeno. En base a estos resultados, sería conveniente en próximos estudios utilizar un inóculo con menor contenido de bacterias del ácido láctico. También se realizó en el reactor de lecho fijo un mayor agregado de bicarbonato de sodio para ajustar el pH. Se debe evaluar la conveniencia de agregar NaOH para el ajuste del pH, de manera de no diluir tanto el biogás con CO_2.

Tabla 28- Microorganismos detectados en ambos reactores y en el trabajo de (Castelló, y otros, 2009). Técnica: UASB1-Clonado del gen que codifica para el ARNr de 16S. UASB2 (este estudio): Clonado del gen que codifica para el ARNr de 16S y aislamientos aerobios. RLF (este estudio): Aislamientos aerobios y anaerobios.

Género	Productos de fermentación	UASB1	UASB2	RLF	H_2
Enterobacter	H_2, fórmico, acético, láctico, etanol, butanodiol		+		si
Klebsiella	H_2, fórmico, acético, láctico, etanol, butanodiol		+	+	si
Acetobacter	No fermentador		+		no
Pseudomonas	No fermentador		+	+	no
Bifidobacterium	láctico, acético		+		no
Lactococcus	láctico, acético		+	+	no
Lactobacillus	láctico	+	+	+	no
Clostridium	H_2, acético, butírico	+	+	+	si
Ruminococcus	H_2,acético,etanol, fórmico/láctico		+		si
Dialister	Acético, succínico	+	+		no
Prevotella	Acético, láctico	+			no
Olsenella	Acético, láctico	+			no
Bulleidia	Acético, láctico	+			no
Anaerotruncus	H_2, acético, butírico	+			si
Mitsuokella	Acético, láctico, succinico	+			no

Selenomonas	Acético, láctico (no todos), propiónico	+			**no**
Megasphaera	H_2 (no todos), Acético, propiónico	+			**si**
Pectinatus	H_2 (no todos), Acético, propiónico	+			**si**
Chryseobacterium	No fermentador		+		**no**
Proteus	H_2, fórmico, acético, láctico, etanol, butanodiol		+		**si**

En la Tabla 28 se muestra los microorganismos detectados en ambos reactores y en un trabajo anterior con el reactor UASB alimentado con suero de queso crudo pero inoculados con un lodo de un reactor metanogénico (Castelló, y otros, 2009) .

Con respecto a las bacterias productoras de hidrógeno, en los tres reactores se detectó la presencia de organismos del género *Clostridium* y en el reactor de lecho fijo y en el UASB del presente estudio organismos del género *Klebsiella*.

Los productores de ácido propiónico, encontrados en el UASB 1 no fueron detectados en el UASB2 ni en el reactor de lecho fijo. Esto significa que los mismos provendrían del inóculo utilizado, por lo que los inóculos de los que se partió en este trabajo presentaron una ventaja al no contener este tipo de bacterias, ya que las rutas por las que se produce propionato no están asociadas a la producción de hidrógeno.

Organismos del género *Lactobacillus* fueron detectados en los 3 estudios y dadas sus características metabólicas es muy probable que provenga del suero lácteo, sin embargo no se detectaron en la muestra de la alimentación analizada (suero de queso crudo). Entonces este microorganismo podría estar presente en el suero de queso pero en bajas concentraciones y ser seleccionado por las condiciones aplicadas en la operación de los reactores.

10 Conclusiones

Es posible obtener hidrógeno utilizando como sustrato suero de queso tanto en el reactor UASB como en un RLF.

En ambos casos el rendimiento está lejos del máximo teórico llegando a valores promedios en la etapa de mayor producción de 0,7 moles H_2/mol lactosa (en el UASB) y 0,9 molesH_2/mol lactosa (en el RLF). Con respecto a la velocidad de producción de hidrógeno los valores promedios en la etapa de mayor producción fueron en el UASB de 0,7 LH_2/Ld y para el RLF de 0,9 LH_2/Ld. El rendimiento, que se encuentra por debajo del máximo teórico (8 mol H_2/mol de lactosa) puede estar asociado a que en ambos reactores se seleccionó una microflora mixta con presencia de microorganismos fermentadores productores y no productores de hidrógeno.

La velocidad de producción de hidrógeno en ambos reactores se vio favorecido por el aumento de la carga, sin embargo, es necesario realizar más experiencias para determinar si es posible llegar a operar con cargas mayores, para evitar tener que diluir el suero de queso.

El pH también demostró tener un efecto sobre la producción de hidrógeno, en general la operación a pH menores a 4,5 disminuyó la producción de hidrógeno con un aumento de la producción de ácido láctico.

En ambos reactores se detectaron organismos del género *Clostridium* pero en baja proporción que podrían ser los responsables de la producción de hidrógeno. También se detectó la presencia de Enterobacterias (*Enterobacter, Klebsiella*) que aportarían a la producción de hidrógeno. En ambos reactores se constató la persistencia de bacterias lácticas del género *Lactobacillus* que compiten con el sustrato y pueden además tener efecto inhibitorio de la producción de hidrógeno. Por lo tanto, para aumentar el rendimiento de estos reactores es necesario estudiar la competencia entre estos microorganismos para buscar la forma de evitar la predominancia de las bacterias lácticas

El reactor UASB presentó mayores problemas de operación debido a compactación del lodo durante los períodos de baja producción de gas. Este reactor además presentó variaciones en la carga debido a que se operó con suero de queso crudo que llevo a grandes fluctuaciones en la producción de hidrógeno.

En el RLF no se observaron problemas de colmatación y la producción de hidrógeno fue más estable. El sistema de purgas con el cual se operó este reactor puede haber evitado los problemas de colmatación.

De acuerdo con nuestros resultados, el tratamiento del suero de queso en dos etapas una primera etapa de producción de hidrógeno y otra metanogénica es una alternativa posible para obtener energía a partir de este desecho.

11 Perspectivas

En futuros trabajos es necesario probar cargas más altas de manera de no diluir el suero de queso previo a su entrada al reactor, lo que resulta una ventaja en lo que respecta al tamaño de los equipos y en el ahorro de agua, esta alternativa sería por lo tanto más económica para tratar el suero de quesería.

Ya que se observó que a un tiempo de retención hidráulica de 24 horas la lactosa se degradó totalmente, debe ensayarse el efecto de disminuir la misma.

El reactor UASB no presentó una buena granulación, por lo habría que ensayar qué condiciones de carga, TRH, pH, etc, favorecen la misma. Así como diseñar estrategias de granulación previa al arranque.

Se debe estudiar la competencia entre bacterias lácticas como *Lactobacillus* y las bacterias productoras de hidrógeno que predominaron en los reactores *(Clostridium y* algunos géneros de *Enterobacterias)* de manera de evaluar la producción de hidrógeno cuando estos géneros se encuentran en el mismo sistema.

Por otra parte, con respecto a los bajos % de H_2 alcanzados en el RLF habría que intentar lograr proporciones de hidrógeno mayores en el biogás, una alternativa seria partir de un inóculo sin bacterias lácticas e investigar si se alcanzan porcentajes similares o superiores a los detectados en el UASB o ajustar el pH interno sin adicionar bicarbonato para disminuir el CO_2 producido.

Si bien el objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de hidrógeno, es parte de un objetivo mayor que abarca tratar este residuo industrial, que constituye un problema para nuestro país en lo que respecta a su disposición. Por lo tanto, es necesario comenzar a estudiar la eficiencia de un sistema en dos etapas donde el efluente del primer reactor productor de hidrógeno, pase a otro reactor metanogénico donde sean tratados los ácidos grasos. Evaluar la remoción de DQO que se alcanza, la producción de hidrógeno y la producción de metano de manera de tener una visión más global de las posibles alternativas.

12 Financiación

Proyecto OPCW

Beca de Maestría Nacional de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)

Programa CAPES-UDELAR - 2009-2011 Formación de investigadores en el tema de “Producción de hidrógeno a partir de aguas residuales” Colaboración entre el Departamento de Hidráulica e Saneamento - Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) / Universiddade de São Paulo (USP), Brasil y el Departamento de Ingeniería de Reactores de la Facultad de Ingeniería y la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química y Facultad de Ciencias-UDELAR

13 Trabajos citados

Anzola, M. d. (2010). *Influência da relação c/n na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo.* São Carlos, SP, Brasil: Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

Applied Biosystems. (s.f.). Recuperado el 09 de 05 de 2011, de http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html

Azbar, N., Çetinkaya Dokgöz, F. T., Keskin, T., Korkmaz, K. S., & Syed, H. M. (2009). Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *International journal of hydrogen energy, 34*, 7441 – 7447.

Balow, A., Truper, H., Dworkin, M., & Harder, W. (1992). The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. *Springer-Verlag*, 1800–1839.

Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). Analysis of mRNA Expression by Real- Time PCR. En K. Edwards, J. Logan, & N. Saunders, *Real- Time PCR. An Essential Guide* (págs. 125-184). London, UK: Horizon bioscience.

Castelló, E., Bonner, R., Crolla, I., Paolino, G., & Borzacconi, L. (2008). Start-up of anaerobic UASB hydrogen producing reactors. *IX Taller y Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia, Isla de Pascua, Chile del 19-23 Octubre.*

Castelló, E., García y Santos, C., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., y Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int J Hydrogen Energy, 34*(14), 5674-5682.

Castro, G. Entrevista personal. (08 de 2010).

Chang, F. Y., & Lin, C. Y. (2004). Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Int J Hydrogen Energy, 29*, 33-9.

Chang, J.-S., Lee, K.-S., & Lin, P.-J. (2002). Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy, 27*, 1167-74.

Claassen, P., Budde, M., van Niel, E., & de Vrije, T. (2005). Utilisation of biomass for hydrogen fermentation. In: Lens P, Westermann P, Harberbauer M, Moreno A, editors. Biofuels for fuel cells: renewable energy from biomass fermentation. *London, UK: IWA Publishing*, 221-30.

CNEA, I. (2009). *Conocimientos mínimos. Hidrógeno como vector de energía.*

Cota-Navarro, C., Carrillo-Reyes, J., Davila-Vazquez, G., Alatriste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2010). Continuous hydrogen and methane production in a two stage cheese whey

fermentation system. *XII Congreso Mundial de Digestión anaerobia, Guadalajara-México.*

Das, D., & Veziroglu, T. (2001). Hydrogen production by biological process: a survey of literatura. *Int. J. Hydrogen Energy, 26*, 13-28.

Davila-Vazquez, G., Alatriste-Mondragón, F., de León- Rodríguez, A., & Razo- Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International journal of hydrogen energy, 33*, 4989 – 4997.

Davila-Vazquez, G., Cota - Navarro, C. B., Rosales - Colunga, L. M., de León- Rodríguez, A., & Razo- Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of hydrogen energy, 34*, 4296-4304.

De Lemos Chernicharo, C. A. (1997). *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Reactores Anaerobios.* (Vol. 5). (D. d. DESA, Ed.) Belo Horizonte: Universidad Federal de Minas Gerais - UFMG.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., P, A. R., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 350-356.

Dunbar, J., Ticknor, L. O., & Kuske, C. R. (2001). Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *App Environ Microbiol, 67*(1), 190-197.

Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., & Bottger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research, 17*(19), 7843-7853.

Etchebehere, C., & Menes, R. J. (2007). Microbiología, Ecología y Bioquímica. En W. Schmidell, H. Moreira Soares, C. Etchebehere, R. J. Menes, N. C. Bertola, & E. M. Contreras, *Tratamiento Biológico de Aguas Residuales* (págs. 115-132). Florianópolis: CNPq.

Fan, K.-S., Kan, N.-R., & Lay, J.-J. (2006). Effect of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenesis in CSTR. *Bioresource Technology, 97*, 84-9.

Fang, H., & Liu, H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology, 82*, 87-93.

Fang, H., Liu, H., & Zhang, T. (2002). Characterisation of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnol Bioeng, 78*, 44–52.

Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G.-H., Hintz, W., & Almadidy, A. (2005). Influence ofinitial pH on hydrogen production from cheeses whey. *Journal of Biotechnology, 120*, 402-409.

Gavala, H., Skiadas, I., & Ahring, B. (2006). Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *Int J Hydrogen Energy, 31*, 1164–75.

Gottschalk, G. (1986). *Bacterial fermentations. In: Bacterial Metabolism.* USA: Springer-Verlag.

Hafez, H., Nakhla, G., Hesham, E., Naggar, M., Elbeshbishy, E., & Baghchehsaraee, B. (2010). Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy, 35*(1), 81-92.

Hallenbeck, P. C. (2005). Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Science and Technology, 52*(1-2), 21-29.

Hallenbeck, P., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology, 27*(5), 287 – 297.

Hammer, Ø. H. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron, 4*, 1–9.

Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy, 32*, 172 – 84.

Hawkes, F., Dinsdale, R., Hawkes, D., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy, 27*, 1339-47.

He, H., Jin, D., Lee, C.N. and Li, Y. (2009) Molecular analysis of spoilage-related bacteria in pasteurized milk during refrigeration by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *JourFood Protection*, 72(3), 572-577.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B.,Bolotin, A., Delome, C., Dusko Ehrlich, S., Guedo, E, Monnet, V, Renault, P & Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews, 29*, 435-463.

Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of Clostridium tyrobutyricum JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology , 99*, 6666–6672.

Kandler, O. &Weiss, N. Genus Lactobacillus. In: Bergey'sManual of Systematic Bacteriology (P. H. A.Sneath,N. S.Mair,M. E. Sharpe & J. G. Holt, eds.).Williams &Wilkins, Baltimore, 2, pp. 1209–1234.

Kapdan, I., & Kargi, F. (2006). Biohydrogen production from waste materials. *Enzyme Microbial Technology, 38*, 569–82.

Kraemer, J. T., & Bagley, Æ. D. (2007). Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnology letters, 29*, 685-95.

Kumar, N., & Das, D. (2001). Continuous hydrogen production by immobilized Enterobacter cloacae IIT-BT 08 using lignocellulosic materials as solid matrices. *Enzyme Microbial Technology, 29*, 280-287.

Lay, J. J. (2000). Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol Bioeng, 68*, 269–78.

Lay, J. J., Lee, Y. J., & Noike, T. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research, 33*(11), 2579-86.

Lay, J., Tsai, C., Huang, C., Chang, J., Chou, C., & Fan, K. (2005). Influences of pH and hydraulic retention time on anaerobes converting beer processing wastes into hydrogen. *Water Sci Technol, 52*, 1-2.

Lee, K., Lo, Y., Lo, Y., Lin, P., & Chang, J. (2003). H2 production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors. *Biotechnology Letters, 25* , 133-138.

Lee, K.-S., Lo, Y.-S., Lo, Y.-C., Lin, P.-J., & Chang, J.-S. (2004). Operational strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor. *Enzyme Microbial Technol, 35*, 605–12.

Lee, K.-S., Wu, J.-F., Lo, Y.-S., Lo, Y.-C., Lin, P.-J., & Chang, J.-S. (2004). Anaerobic hydrogen production with an efficient carrier-induced granular sludge bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng, 87*(5), 648–57.

Leite, J. A., Fernandes, B. S., Pozzi, E., Barboza, M., & Zaiat, M. (2008). Application of an anarobic packed-- bed bioreactor for the production of hydrogen and organic acids. *International Journal of Hydrogen Energy, 33*, 570-586.

Levin, B., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical applications. *International Journal of Hydrogen Energy, 29*, 173–85 [Erratum 1425–6].

Li, C., & Fang, H. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Env Sci Technol, 37*, 1–39.

Lin, C., & Chang, R. (1999). Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose . *J Chem Tech Biotechnol, 74*, 498-500.

Lin, C., & Chou, C. (2004). Anaerobic hydrogen production from sucrose using an acid-enriched sewage sludge microflora. *Eng Life Sci, 4*(1), 66-70.

Lin, C.-Y., Lee, C.-Y., Tseng, I.-C., & Shaio, I. (2006). Biohydrogen production from sucrose using base-enriched anaerobic mixed microflora. *Process Biochem , 41*, 915–9.

Maintinguer, S., Fernandes, B., Duarte, I., Saavedra, N., Adorno, M., & Varesche, M. B. (2008). Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy, 33*(16), 4309-4317.

Mallo, M. (1998). *Degradación anaerobia con separación de etapas de suero de queso. Proyecto de iniciación a la investigación.*

Menes, R. J. (2007). Microbiología, Ecología y Bioquímica. En W. Schmidell, H. Moreira Soares, C. Etchebehere, R. J. Menes, N. C. Bertola, & E. M. Contreras, *Tratamiento Biológico de Aguas Residuales* (págs. 367-380). Florianópolis: CNPq.

MIEM/Banner, D. (s.f.). *Polìtica energética 2005- 2030*. Recuperado el 07 de 2011, de (http://www.miem.gub.uy/portal/hgxpp001?5,6,452,O,S,0,MNU;E;50;6;MNU;,).

MIEM/DNE/Estadística. (s.f.). *Balance Energético Nacional* . Recuperado el 07 de 2011, de http://www.miem.gub.uy/portal/hgxpp001?5,6,219,O,S,0,PAG;CONC;36;2;D;7152;4;PAG;MNU;E;30;5;MNU;,

Muyzer, G., Teske, A., Wirsen, C. O., & Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology, 164*(3), 165-172.

Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., & Ohba, M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by acid lactic bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy, 27*, 1367-1371.

Noyola, A. (1994). Diseño, Inoculación y arranque de reatores UASB. En UDELAR, *Tratamiento anaerobio. III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales"* (págs. 133-143). Montevideo, Uruguay.

Ntaikou, I., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. *Waste Biomass Valor, 1*, 21–39.

Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production–review. *Food Chem, 105*, 1–14.

Pattra, S., Lay, C.-H., Lin, C.-Y., O-Thong, S., & Reungsang, A. (2010). Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with Clostridium butyricum. *International Journal of Hydrogen Energy*, doi:10.1016/j.ijhydene.2010.05.120.

Peixoto, G. (2008). *Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo e fluxo ascendente a partir de água residuária de indústria de refrigerantes.* São Carlos, SP_ Brasil: Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

Peixoto, G., Saavedra, N. K., Varesche, M. B., & Zaiat, M. (2010). Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. *International journal of hydrogen energy*. Doi:10.1016/j.ijhydene.2011.05.014

Pycke, B., Etchebehere, C., Van De Caveye, P., Negroni, A., Verstraete, W., & Boon, N. (2010). A time-course analysis of four full-scale anaerobic digesters in relation to the dynamics of change of their microbial communities. *Water Sci and Technol SSN/ISBN: 0273-122, in press.*

Rachman, M., Nakashimada, Y., Kakizono, T., & Nishio, N. (1998). Hydrogen production with high yield and high evolution rate by self-flocculated cells of enterobacter aerogenes in a packed-bed reactor. *Applied Microbiology Biotechnology, 49* , 450-454.

Saunders, N. A. (2004). An Introduction to Real- Time PCR. En K. Edwards, J. Logan, & N. Saunders, *Real- Time PCR. An Essential Guide* (págs. 1-11). London, UK: Horizon bioscience.

Silva, A., Hirasawa, J., Varesche, M., Foresti, E., & Zaiat, M. (2006). Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archea. *Anaerobe, 12*, 93-98.

Soto, M., Méndez, R., & & Lema, J. (1993). *Methanogenic and non-metanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. Wat. Res. , 27 (8), 1361-1376.* (Vol. 8). (27, Ed.) Wat. Res. .

Soubes, M. (1994). Microbiología de la fermentación anaerobia. En UDELAR, *Tratamiento anaerobio. III Taller y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales"* (págs. 15-28). Montevideo, Uruguay.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19º edición, 1. (s.f.).

Svensson, B., & Karlsson, A. (2005). Dark fermentation for hydrogen production from organic wastes. In: Lens P, Westermann P, Harberbauer M, Moreno A, editors. Biofuels for fuel cells: renewable energy from biomass fermentation. *London, UK: IWA Publishing*, 209–20.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.

Thauer, R., Jungerman, K., & Decker, K. (1977). Hydrogen conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev, 41*, 100-180.

T-RFPred. (2009). Recuperado el 27 de 09 de 2010, de http://nodens.ceab.csic.es/t-rfpred/method

Valdez-Vazquez, I., Rios-Leal, E., Esparza-Garcia, F., Cecchi, F., Pavan, P., & Poggi-Varaldo, H. (2004). A review on hydrogen production with anaerobic mixed cultures. In:. En *Proceedings of the H2-age: when, where, why* (Vol. 4, págs. 123–30 [ISBN 88-900775-3-0]). Pierucci S.

Van Ginkel, S., & Logan, B. (2005). Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environ Sci Technol, 39*, 9351–6.

Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology, 100*, 3713-3717.

Wang, J., & Wan, W. (2009). Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy, 34*(14), 5674 - 5682.

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol, 73* (16), 5261-7.

Wenzel, J., Perez, G., Zinola, F., & Etchebehere, C. (2011). Production of bio-hydrogen by dark fermentation of industrial wastewater by different isolates and cocultures. *4th World Hydrogen Technologies Convention, Glasgow, U.K.*, Paper ID: 0093.

Yang, P., Zhang, R. M., & Benemann, J. R. (2007). Biohydrogen production from cheese processingwastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy, 32*, 4761-4771.

Yokoi, H., Aratake, T., Hirose, J., Hayashi, S., & Takasaki, Y. (2001). Simultaneous production of H2 and bioflocculant by Enterobacter sp. BY-29. *World Journal of Microbiology Biotechnology, 17* , 609–613.

Zhao, B.-H., Yue, Z.-B., Zhao, Q.-B., Mu, Y., Yu, H.-Q., Harada, H., Li, Yu-You. (2008). Optimization of hydrogen production in a granule-based UASB reactor. *NTERNATIONAL JOURNAL OF HYDROGEN ENERGY , 33*, 2454 – 2461.

Zittel, W., & Wurster, R. (1996). *Hydrogen in the energy sector.* Obtenido de www.hyweb.de/knowledge/w-I-energiew-eng.html

Zuo, J., Zuo, Y., Zhang, W., & Chen, J. (2005). Anaerobic bio-hydrogen production using pre-heated river sediments as seed sludge. *Water Science Technology, 52*(10), 31–9.

ANEXO

PRUEBA DE ÓXIDO-FERMENTACIÓN (OF)

INTRODUCCIÓN

La prueba de óxido-fermentación es importante en las primeras etapas de identificación de un cultivo. Permite diferenciar las bacterias según el rol del oxígeno atmosférico en la utilización de carbohidratos.

MEDIOS Y REACTIVOS

Medio de Hugh-Leifson de glucosa

Peptona 2 g

Glucosa 10 g

Azul de bromotimol 0,03 g

NaCl 5 g

K2HPO4 0,30 g

Agar 3 g

Agua destilada c.s.p. 1 L

Se dispensa en tubos profundos (7 - 8cm). pH (luego de la esterilización): 7,1 ± 0,2.

PROCEDIMIENTO

Se inocula por picadura (con punta en vez de ansa) un solo tubo que tiene por lo menos 7 cm de altura de medio de cultivo y se incuba a 35ºC durante 48 horas o más.

INTERPRETACIÓN

La producción de ácido se detecta en el medio por la aparición de color amarillo. En el caso de microorganismos oxidativos, este aparece en la superficie. Cuando el microorganismo es fermentador se observa el viraje en todo el tubo.

Si el medio no cambia de color o vira al color azul (pH básico) con respecto a un tubo del mismo lote sin sembrar, se considera que el microorganismo es inactivo frente a la glucosa.

ANÁLISIS DE LACTOSA MEDIANTE MÉTODO COLORIMÉTRICO (Dubois, Gilles, Hamilton, P, & Smith, 1956)

1- Muestra - 1 mL.
2- Agregar 1 mL de solución de fenol al 5% (en campana).
3- Agregar 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (en campana).
4- Homogeneizar y dejar a temperatura ambiente 10 min.
5- Colocar en baño de agua durante 15 min.
6- Leer en espectrofotómetro a 490 nm.

T-RFLP

- Extracción de ADN
- PCR
- Purificación (PCR purification kit Qiagene)
- Corte con enzimas de restricción
- Precipitación de fragmentos con etanol
- Separación en secuenciador
- Análisis perfiles

PCR 16S

Primers:

27F- 5'-6-FAM AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´

1492R- 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

Para una reacción de 50 μl

Tabla 29- Reactivos, concentración y volumen de reactivos para una reacción de PCR.

Reactivo	Volúmen
H_2O	31 μL
Buffer 10x	5 μL
MgCl2 (Invitrogene, 50mM)	3 μL
BSA	0,5 μL
DNTP(2,5mM each)	4 μL
27F lab (10uM)	2 μL
1492 R (10uM)	2 μL
Taqpol (Invitrogene) (500U/ μL)	0,3 μL

Se reparten por reacción de PCR 47,8 μL y se agregan 2,2 μL de ADN.

Ciclo 16S Bact. (3hs y 20min aprox.)

94°C 5min + 30 ciclos (94°C 1min + 55°C 1min + 72°C 3min) + 72°C 7 min + 4°C 10min

Se juntan 2 productos de PCR (100 microlitros) y se purifica por PCR purification kit (Qiagene) en el último paso se agrega 50 microlitros de agua por lo tanto se concentra a 50 microlitros.

Corte con enzimas de restricción

Sitio de corte de MSPI : 5'- C CGG- 3´

Msp I por reacción:

Tabla 30- Condiciones para la restricción con Msp I.

Reactivos	Volumen (μL)
DNA	25
Buffer	4
MspI	1,2
H_2O	4,8

Se incuba overnight en baño de agua a 37°C. Se inactiva al día siguiente la enzima (65°C-10min)

Purificación de los fragmentos

Los fragmentos obtenidos se precipitan con etanol 95 % a 4°C (por 30 minutos).

Se centrifuga a 17000 g (30 minutos) y se lava el pellet con 100 ul de etanol 70 %.

Se centrifuga a 17000 g (10 min).

Se seca en estufa a 65°C (5 min).

Condiciones de corrida en Instituto Pasteur

Los fragmentos precipitados se resuspen en 8 uLde formamida and 0,3 uL of estándar interno (GeneScan -500 Liz Standard, Appliedbiosystems) y se separan por electroforesis capilar utilizando un secuenciador automático ABI3130 (AppliedBiosystems) en el servicio que brinda el Instituto Pasteur de Montevideo.

El programa de análisis es el Genemapper, la corrida se realiza con capilares de 36 cm y polímero POP7. La matriz usada es la DS-33 (depende de los fluorocromos y del marcador utilizado). La duración de la corrida es de 20 minutos, a 15 kV, tiempo de inyección 16 seg, con una precorrida de 180 seg. La temperatura del horno es de 60°C.

Procesamiento de datos

Los cromatogramas se analizan con el programa Peak scanner (AppliedBiosystem). Se estandarizan al cromatograma de menor intensidad de acuerdo a lo propuesto por (Dunbar, Ticknor, & Kuske, 2001).

AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN DEL ARNr DE 16S DE LOS AISLAMIENTOS

Tabla 31- Mezcla de reactivos para una reacción de PCR. Vol. tot=50 μL.

Reactivo	Volumen
H2O	31 μL
Buffer 10x	5 μL
MgCl2 (Invitrogene, 50mM)	3 μL
BSA	0,5 μL
DNTP(2,5mM each)	4 μL
27F (10 μM)	2 μL
1492 R (10 μM)	2 μL
Taqpol (Invitrogene) (500U/μl)	0,3 μL
ADN	2,2 μL

Se utilizó el siguiente programa en el termociclador: 94°C 5min, seguido por 30 ciclos de 94°C 1min, 55°C 1min y 72°C 3min y por último 72°C 7 min de terminación.

VISUALIZACIÓN DEL ADN MEDIANTE GELES DE AGAROSA

Para visualizar el peso molecular y la pureza del ADN extraído y de los productos de PCR se realizó electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) teñido con bromuro de etidio, utilizando el marcador de peso molecular de 1 Kb diluido al décimo (Invitrogene).

Tanto para la preparación del gel de agarosa como para la corrida electroforética se utilizó buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5x (Tris-Borato 45mM y EDTA 1mM). La corrida electroforética se realizó a una diferencia de potencial de 100V y se sembraron 4 uL de muestra con 2 μL de buffer de corrida (0,25% azul de bromofenol y 30% glicerol en agua) por pocillo. Se observó el gel utilizando un transiluminador y se fotografió utilizando el sistema de captura de imágenes.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio PYG

Para cultivo de bacterias anaerobias se utilizó el medio PYG compuesto por glucosa 10g/L (Difco), peptona 5g/L (Difco), extracto de carne 5g/L, extracto de levadura 5 g/L (Difco). El medio fue realizado en condiciones anaeróbicas, para ello se eliminó el aire de los viales y del medio por arrastre mediante una corriente de N2. Se dispensó 9 mL de medio en cada vial manteniendo la corriente de N2 y se cerraron con un septo de butilo con precinto. Los viales fueron esterilizados en autoclave 15 minutos a 1,1 atm. Antes de su inoculación, se añadió solución reductora, para eliminar los restos de oxígeno. La solución estaba compuesta por L-Cisteína 25g/L y Na_2S 25g/L, se agregó en condiciones asépticas al 2% en el volumen final del medio de cultivo.

El medio PYG en placa se realizó de la misma forma pero previo a la esterilización se lo suplementó con agar (Difco) en una concentración de 15 g/L.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y TINCIÓN GRAM

La pureza de las colonias y la morfología de los aislamientos fueron determinadas mediante observación al microscopio óptico (Olympus) con un lente 100X luego de realizar la tinción de Gram de acuerdo a la técnica descripta en Manual of Methods for General Bacteriology (American Society for Microbiology). Se realizó también estudios microscópicos de la biomasa mediante observación en fresco

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD METANOGÉNICA (Soto, Méndez, & Lema, 1993)

Materiales y equipos

- Viales de 150 mL con sus correspondientes septos de goma y precintos metálicos
- Máquina de sellar precintos
- Llaves de 3 vías con aguja y septo de goma
- Transductor de presión
- Shaker en ambiente a temperatura controlada
- Cromatógrafo de gases y jeringas de 1mL

Procedimiento

Los ensayos se realizan por triplicado.

Preparación de los viales

1) Homogeneizar la muestra.

2) Si es necesario, lavar el lodo suspendiendo el mismo en agua destilada y dejando decantar, centrifugando o filtrando descartar el líquido de lavado.

3) Pesar en el vial una cantidad de lodo suficiente como para lograr una concentración en SSV adecuada. La concentración a utilizar de inóculo está determinada por la actividad metanogénica del lodo. Si disponemos de un lodo cuya actividad metanogénica es de 0.1 gDQO/gSSV.d la concentración del mismo en el vial debe ser 8 gSSV/L; para un lodo con actividad de 1 gDQO/gSSV.d usamos 0.8 gSSV/L. De esta forma nos aseguramos de obtener puntos suficientes para un resultado confiable, en un tiempo de ensayo razonable. Si el lodo lo permite, hacer una toma con pipeta en lugar de pesarlo.

4) Agregar en el vial 10mL de la solución de acetato de sodio de concentración 20g/L (33,2g/L de acetato de sodio trihidratado)

5) Completar con agua hasta un volumen total de 100 mL.

6) Elaborar un blanco conteniendo únicamente lodo y agua destilada.

7) Ajustar el pH entre 6,8 y 7,2 con solución de ácido clorhídrico o soda según corresponda. Registrar el pH.

8) Colocar tapón de goma y precinto metálico y sellarlo con la máquina de sellar.

9) Colocar la aguja y el septo de goma en la llave de tres vías de forma que queden alineados, verificar que estén bien secos.

10) Perforar el tapón de goma de cada vial con una aguja de manera que quede conectada la vía lateral de la llave de tres vías al vial.

11) Verificar la hermeticidad del vial procediendo de la siguiente manera:

Abrir la llave del cilindro de N_2 de manera que el manómetro indique 20 psi. Conectar la manguera desde el cilindro de N_2 a la vía lateral de la llave, presurizar el mismo y cerrar la llave de 3 vías. Sumergir el vial en agua y observar que no hay fuga de gas.

Medir la presión con el transductor de presión , está debe ser superior a 700 mmHg (de no ser así volver a presurizar). Purgar el vial y medir la presión nuevamente, anotar la misma en la hoja de seguimiento como presión final y registrar la hora de purga.

12) Colocar los 3 viales en el shaker a temperatura constante.

Seguimiento

13) Durante la experiencia se realizan medidas de presión y composición de gas. Registrar la presión inicial y la hora de muestra Si la medida de presión supera los 100 mmHg, luego de medir se procede a extraer la muestra como sigue.

14) Para extraer la muestra se utiliza una microjeringa. Ésta se cierra presionando el botón rojo y se abre con el verde. La microjeringa en posición de vaciado se introduce a través del septo de goma colocado en la llave de tres vías. Se toma la muestra moviendo el vástago hacia atrás y se retira la microjeringa (cerrar la microjeringa y la llave de tres vías). Se descarta la muestra y se repite. Tener la precaución de abrir y cerrar la llave cuando corresponda para evitar pérdidas de gas. Luego de los descartes, extraer la muestra para análisis tomando 1mL de gas. Cerrar la conexión de la llave con el septo de goma.

15) Despresurizar en forma rápida la jeringa e introducir el gas en el cromatógrafo previamente estabilizado, arrancando el cromatograma. (Controlar que la presión del gas portador sea la misma que la de la curva de calibración).

16) Purgar el vial una vez que el análisis en el GC se completo correctamente. Registrar la presión remanente en el vial y hora de purga.

17) Una vez finalizada la corrida, leer las áreas de los picos y calcular los porcentajes mediante las curvas de calibración.

18) Calcular los moles de metano generados en cada intervalo de tiempo.

19) Finalizado el ensayo medir y registrar el pH