

Evaluación de la producción de hidrógeno usando la bacteria *Clostridium butyricum* en un reactor tipo cstr a escala laboratorio

Grupo de Investigación: Energías Alternativas
Línea de Investigación: Economía del Hidrogeno
Freddy Alfonso• Adriana Páez•• Wilmer Zambrano••• Daniel Torres••••

Recibido: 30 de mayo de 2012 Aceptado: Marzo 22 de 2.013

RESUMEN

Dada la preocupación actual por el medio ambiente y ante una posible escasez futura de las fuentes energéticas convencionales, se están desarrollando nuevas alternativas de energía más limpia para la conservación de nuestro planeta a partir de fuentes renovables. De acuerdo con esto, el Grupo de Investigaciones en Energías Alternativas – IENA de la Universidad de América, ha desarrollado una línea de investigación titulada: Establecimiento de condiciones para la producción, distribución y utilización de hidrógeno en Colombia, como medio energético para la sostenibilidad. Dentro de esta línea se estructuró un proyecto de investigación, en el cual contempló la producción de hidrógeno a partir de biomasa.

Con base en lo anterior, este trabajo desarrolló una propuesta de diseño de un biorreactor para la producción de hidrógeno a partir de biomasa, en el cual se pretendió determinar, en primer lugar, el microorganismo con el que se trabajó: *Clostridium butyricum*, sus características y sus condiciones de crecimiento, el medio de cultivo en el que se realizó la siembra y la biomasa o sustrato utilizado para producir el hi-

drógeno. De acuerdo con lo anterior se seleccionó, se diseñó y se construyó un biorreactor a escala de laboratorio.

La experimentación se llevó a cabo por 36 horas, realizándose 4 descargas de biomasa consumida y posteriores cargas de sustrato fresco a partir de la hora 20, de un volumen de 500 ml; se evaluó el crecimiento celular por hora a través de conteo en cámara de Neubauer y el sustrato consumido en cada carga usando la técnica del reactivo DNS. También se estimó el volumen de gas y el porcentaje de hidrogeno contenido en la muestra bajo cromatografía gaseosa usando 14 g de glucosa, 200 rpm y una temperatura de 37 °C.

Palabras clave: biorreactor, bio-hidrógeno, *Clostridium butyricum*, fermentación oscura.

ABSTRACT

Given the current concern for the environment and a possible future shortage of conventional energy sources, are developing new cleaner energy alternatives for the conservation of our planet from renewable

- Químico. Especialista Gestión Ambiental Urbana. Candidato Mg Sc. Ingeniería en Sistemas de Calidad y Productividad. Instituto de estudios Superiores de Monterrey-México. Docente Investigador, Universidad de América. Grupo de Investigación en Energías Alternativas, IENA. Universidad de América. flamoreno17@yahoo.com.ar
- Microbióloga. Mg Sc. Docente Investigador, Grupo de Investigación en Energías Alternativas, IENA. Universidad de América.
- Estudiante de Ingeniería Química. Universidad de América.
- Estudiante de Ingeniería Química. Universidad de América.

sources. Accordingly the Group for Research in Alternative Energy - IENA University of America has developed a research entitled: Establishment of conditions for production, distribution and use of hydrogen in Colombia, as a means for sustainable energy. This line was structured a research project, which contemplated the production of hydrogen from biomass.

Based on this, this paper developed a proposal for design of a bioreactor for the production of hydrogen from biomass, which was intended to first identify the organism with which they worked: *Clostridium butyricum*, their characteristics and their growth conditions, the culture medium was performed in which the planting substrate and biomass or used to produce hydrogen. According to the above is selected, we designed and built a laboratory-scale bioreactor.

The experiment was carried out for 36 hours, performing 4 downloads of biomass consumed and subsequent loads fresh substrate from the time 20 of a volume of 500 ml cell growth was assessed by counting time through in camera Neubauer and substrate consumed in each load using the technique of DNS reagent. Was also calculated gas volume and the proportion of hydrogen contained in the sample under gas chromatography using 14 g glucose, 200 rpm and a temperature of 37 ° C.

Keywords: bioreactor, bio-hydrogen, *Clostridium butyricum*, dark fermentation.

INTRODUCCIÓN

El hidrogeno es actualmente uno de los vectores energéticos más prometedores para solventar la crisis energética, debido a su alto poder calorífico, si se compara con otras fuentes tales como derivados de petróleo Se puede observar como el hidrógeno tiene 47 veces mayor energía por unidad de volumen que el octano de la gasolina (Yaws, 2000). Otra de las ventajas del uso del hidrogeno es la ausencia total o parcial de gases de combustión, puesto que la reacción sólo origina agua como subproducto (Bedoya & Castrillón, 2008).

Actualmente, el hidrógeno puede producirse por reformado de metano, nafta, residuos de petróleo y carbón; la mayor relación atómica H/C en el metano con respecto a otros combustibles

hace del gas natural la materia prima por excelencia para fabricar hidrógeno. Específicamente, la metodología más extendida de producción de H₂ es el reformado con vapor de agua. Dentro de los métodos no convencionales, el hidrogeno puede ser obtenido a través de electrolisis de agua o a través de métodos biológicos entre otros (Fierro *et al.*, 2003).

Una alternativa a la producción de hidrógeno son los procesos biológicos, los cuales agrupan series de transformaciones catalizadas por enzimas que hacen parte de células de bacterias fotosintéticas o fermentativas. El bio-hidrógeno es entonces, el producido a partir de fuentes renovables como agua, desechos orgánicos o biomasa por acción de las enzimas hidrogenadas (Montoya, 2003). Los procesos biológicos de producción de hidrógeno son la bio-fotólisis directa, también conocida como foto-disociación de agua, la bio-fotólisis indirecta, la foto-fermentación y la fermentación oscura (Hallenbeck & Benemann, 2002).

OBTENCIÓN DE HIDRÓGENO POR FERMENTACIÓN

Proceso biológico degradativo por el cual se produce gas, generalmente hidrogeno y dióxido de carbono a partir de un sustrato orgánico por medio de bacterias anaerobias. La fermentación se lleva a cabo a temperatura ambiente, mesófila (25-40 °C), produciéndose biogás que contiene H₂, CO₂, CO. Este proceso comprende las siguientes etapas: *hidrólisis* la cual es realizada por enzimas extracelulares excretadas por las bacterias fermentativas; *acidogénesis* en la cual las moléculas orgánicas solubles son fermentadas por medio de endo-enzimas produciendo compuestos orgánicos como ácido acético, fórmico, hidrógeno y compuestos micro-moleculares como ácido láctico, propiónico, butírico, etanol (Sánchez, 2007); *acetogénesis* en donde los ácidos grasos volátiles se convierten en ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno y *metanogénesis* en la cual los acetatos producidos en la acetogénesis se convierten en metano

y dióxido de carbono, a la vez que se consume hidrógeno (Montoya, 2003).

La producción de hidrógeno por fermentación oscura se puede obtener usando variedad de cultivos ya sean puros o mixtos, igualmente la eficiencia de esta producción depende del cultivo que se use (Valdez *et al.*, 2010). La eficiencia de producción de hidrógeno usando diferentes cultivos de microorganismos se describe en la Tabla 2.

Los cultivos puros se pueden clasificar en anaerobios estrictos (clostridium: *Clostridium butyricum*, rumen bacteria: *R. albus*, termófilas: *Anaerocellum*, *Caldicellulosiruptor*, *Dictyoglomus*, *Fervidobacterium*, *Spirocheta*, *Thermotoga* and *Thermoanaerobacter*, *Pyrococcus furiosus*, metanógenas: *Methanosarcina barkeri* (Sasaki, 1998; Zürrer & Bachofen, 1979; Nakada *et al.*, 1998)), anaerobios facultativos resistentes al oxígeno, lo consumen rápidamente, restableciendo condiciones anaeróbicas en los reactores (enterobacter: *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Citrobacteria* (Nakada *et al.*, 1998; Otsuki *et al.*, 1998; Bedoya & Castillón, 2008; Shigeharu, 2005)) y cultivos mixtos.

El sistema fermentativo de generación de hidrógeno tiene como limitación la no conversión completa de la materia orgánica presente en el residuo en dióxido de carbono e hidrógeno. Esto sucede debido a que se trata de un sistema fermentativo, que debe mantener el balance de oxidación-reducción final del proceso. Por lo tanto, una vez realizado el proceso de fermentación se obtiene un residuo con una elevada proporción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que pueden bien ser recuperados como subproductos valorizables o bien utilizados en una segunda etapa de producción de hidrógeno. Esta segunda etapa podría consistir en la utilización de bacterias fotosintéticas que tienen la capacidad de utilizar los ácidos orgánicos y alcoholes para su metabolismo y generar hidrógeno a partir de ellos (Valero *et al.*, 2004). Realizando pre-tratamientos como aireación, inhibición de metanógenos por ácido 2-bromoe-

tanosulfónico y yodopropano, calor y pHs extremos, se ha logrado enriquecer los medios de cultivos de microflora productora de hidrógeno e inhibir microorganismos metanógenos evitando el consumo de hidrógeno para la conversión a metano (Bedoya & Castillón, 2008).

***Clostridium butyricum* es un Anaerobio estricto** que macroscópicamente se caracteriza por producir colonias blancas, de bordes irregulares, cremosos y presentan fenómeno de swarming. A nivel microscópico se caracterizan por ser bacilos Gram-positivos formadores de esporas situadas en un extremo sub-terminal del bacilo. Mesófilos cuya temperatura óptima es de 35 °C a 37 °C. Obtienen energía por medio de fosforilación de carbohidratos (sustrato), careciendo de sistemas cito-crómicos y de mecanismos de fosforilación por transporte de electrones. Productoras de ácido fermentando hidratos de carbono a butirato, acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Capaces de producir hidrógeno a partir de dos rutas metabólicas las cuales son: 1) rompimiento de piruvato en dióxido de carbono e hidrógeno el cual es catalizado por la enzima ferredoxi-óxidoreductasa en donde una parte de los electrones es transferida a protones para producir hidrógeno y el resto a NAD⁺ para generar NADH₂ y 2) el NADH₂ reacciona con los equivalentes generados en la glucólisis para que por medio de la hidrogenasa produzca hidrógeno, biomasa, acetato, butirato, y ATP. (Bedoya & Castillón, 2008).

El sustrato es un recurso renovable, constituido por carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, presente en múltiples recursos que pueden usarse para producir hidrógeno: cultivos energéticos desarrollados específicamente para la producción de combustible, entre ellos están cultivos herbáceos, cultivos agrícolas y plantas acuáticas, residuos agrícolas y desechos orgánicos, residuos y desechos forestales como madera, residuos de tala, arboles comerciales imperfectos, etc. y desechos municipales e industriales (Sánchez, 2007). Para que la producción de hidrógeno sea un proceso sostenible, los sustratos utilizados deben cumplir ciertos

critérios; los sustratos deben ser producidos a partir de recursos renovables, estar disponibles en suficiente cantidad y/o concentración para que la fermentación ocurra de forma eficiente y se produzca hidrógeno de una forma energéticamente favorable (hidrógeno como fuente de energía renovable) y que los pre-tratamientos sean mínimos y de bajo costo. Aunque los sustratos puros han sido ampliamente estudiados, las investigaciones más recientes se enfocan en la utilización de desechos orgánicos, como sustratos aptos para un proceso sostenible. Existe gran variedad de sustratos provenientes de recursos renovables como los azúcares contenidos en productos agrícolas como maíz, arroz, trigo, sorgo o material ligno-celulósico de la biomasa. Se debe tener cuidado con los requerimientos de nutrientes inorgánicos para una producción óptima de bio-hidrógeno a partir de sustratos que contienen carbohidratos (Bedoya & Castellón, 2008). Los sustratos y rendimientos comúnmente usados en la producción de hidrógeno usando *Clostridium butyricum*

Los distintos parámetros y condiciones de operación (principalmente pH, tiempo de retención hidráulica (HRT), presión parcial de hidrógeno y dióxido de carbono, subproductos, temperatura, concentración inicial de sustrato, edad y volumen del inóculo, etc.) deben ser controlados durante el proceso de fermentación oscura, pues estos pueden afectar directamente la eficiencia de producción, el contenido del biogás, el tipo de ácidos producidos y la tasa específica de producción de hidrógeno. Cuando se trabaja con cultivos mixtos, un descontrol en uno de estos parámetros podría afectar el metabolismo de la microflora productora de hidrógeno o cambiar las comunidades de microorganismos presentes en el proceso y, por tanto, alterar los subproductos de la fermentación. Los ácidos acético y butírico son los subproductos que están directamente relacionados con la producción de hidrógeno y por lo tanto el rendimiento de hidrógeno es mucho mayor cuando estos se obtienen en alto porcentaje. Por esto para maximizar el rendimiento de hidrógeno, se deben buscar las condiciones óptimas para direc-

cionar el metabolismo de las bacterias hacia la producción de ácidos grasos volátiles (VFA), específicamente acetato y butirato, y fuera la producción de alcoholes (como etanol y butanol) y ácidos reducidos (como el lactato) que contienen hidrógeno que todavía no ha sido liberado como gas (Bedoya & Castellón, 2008). A continuación se describen los factores ambientales más importantes que controlan la producción de hidrógeno.

Efecto del pH: el pH del sistema tiene varios efectos sobre las actividades vitales de los microorganismos. Uno de ellos es el cambio de la carga de la membrana celular, influenciando la asimilación del medio de cultivo por la bacteria. Un segundo efecto del pH está relacionado con la actividad enzimática de los procesos metabólicos y otro más es el cambio en la toxicidad de los ácidos grasos volátiles, que pueden llegar a causar inhibición por la disociación no polar, debido a que penetran la membrana celular cambiando el pH interno de la célula (Van Ginkel & Sung, 2001).

Temperatura de fermentación: la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen los procesos de producción biológica de hidrógeno por vías fermentativas. La degradación de sustrato, la producción de hidrógeno, la distribución de los productos y el crecimiento microbiano son todos afectados por esta (Wang, 2008).

Agitación en un biorreactor: la energía de transferencia, el sustrato y los metabolitos dentro del biorreactor deben ser puestos en contacto mediante un mecanismo apropiado de mezcla. La eficiencia del transporte de cualquier sustrato puede ser crucial para la eficiencia de toda la fermentación. La agitación de un biorreactor produce los siguientes efectos: dispersión del aire en la solución de nutrientes; homogenización de la temperatura y la concentración de los nutrientes en el fermentador y dispersión de los líquidos no miscibles, entre otros (Crueger, 1993).

Nutrientes y micronutrientes: se han reportado diversos artículos acerca de la importancia de la relación carbono/nitrógeno (C/N) en la producción de bio-hidrógeno (Lin & Lay, 2004), demostraron que la capacidad de producción de hidrógeno está estrechamente relacionada con la relación C/N además de la presencia de micronutrientes esenciales para el metabolismo de las bacterias durante la fermentación. Algunos de estos micronutrientes son los metales hierro, zinc y sodio, siendo el hierro el de mayor importancia para las enzimas hidrogenasas y otras enzimas que lo necesiten para la producción de hidrógeno (Zhang & Shen, 2006). En algunos estudios se ha mencionado que la concentración de hierro afecta la fermentación llevada a cabo por bacterias fermentativas. (Zhang & Shen, 2006) reportaron cómo el rendimiento en la producción de hidrógeno aumenta conforme se incrementa la concentración de FeSO_4 en el medio.

La producción de bio-hidrógeno por fermentación oscura se puede llevar a cabo en reactores los cuales son recipientes o sistemas que mantienen un ambiente biológicamente activo, en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos. La necesidad de construir diferentes configuraciones de fermentadores, se realiza para mantener un cultivo estable, llevando a operar en condiciones asépticas en recipientes de geometría relativamente simple que puedan ser esterilizados con un alto grado de eficiencia, teniendo en cuenta los diferentes parámetros, características y condiciones que el microorganismo necesite para un crecimiento aceptable. La principal influencia en el modo de operar de los reactores deriva de las propiedades físicas de los microorganismos. En condiciones normales los microorganismos contienen una cantidad de agua considerable (60-95%) y, en consecuencia, tienen una densidad sólo ligeramente diferente de la del agua. Se requiere pues un empuje hidrodinámico muy pequeño para mantenerlos en suspensión, con el resultado de que si el fluido circundante está en un estado de sua-

ve agitación los microorganismos estarán en suspensión.

Las diferentes configuraciones de biorreactores son: biorreactor intermitente o por lotes, biorreactor continuo de tanque agitado, biorreactor tubular y biorreactor de lecho fluidizado (Atkinson, 1986).

Los procesos por lotes se han llevado a cabo más en el laboratorio para investigar los requerimientos nutricionales y obtener rendimientos cuando se tienen sustratos particulares. Estos procesos se han realizado a volúmenes de no más de 4L con agitación magnética o en shakers. Quizás uno de los usos principales en la producción de hidrógeno de los procesos por lotes, cuando se tienen cultivos mixtos, es el acondicionamiento del inóculo antes de la fermentación, pues esto permite efectuar el proceso de germinación de esporas de las bacterias productoras de hidrógeno y así evitar un posible lavado de células en un proceso continuo. Además, este tiempo de adaptación por lotes permite disminuir la fase lag del microorganismo, haciendo que cuando se llegue a realizar la fermentación, éste empiece a crecer y producir hidrógeno rápidamente. Las bacterias del género *Clostridium*, reportadas como una de las mejores productoras de hidrógeno, han sido usadas en procesos por lotes a gran escala por producir solventes como acetona, butanol y etanol. Para la producción de hidrógeno, un proceso continuo es más atractivo, pues el modo por lotes involucra mayores tiempos de fermentación y no se garantizan condiciones de estado estacionario, que se pueda alcanzar con un proceso en continuo, que son de gran importancia para una óptima producción de hidrógeno. Los procesos por lotes alimentados no han sido muy utilizados; los pocos estudios que se han hecho, han sido para evaluar condiciones de germinación de bacterias esporuladas, un proceso que necesita de nutrientes específicos como aminoácidos para que se pueda llevar a cabo, pero no son muy recomendables, pues se ha visto que la interrupción en la alimentación por un periodo de 6h puede llevar a las bacterias a esporular

de nuevo de una forma irreversible y por esto se recomienda un suplemento de nutrientes continuo. En un proceso continuo es factible, y mucho más fácil, controlar el pH, HRT, presión parcial de hidrógeno y CO_2 y los subproductos del proceso (Bedoya & Castellón, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

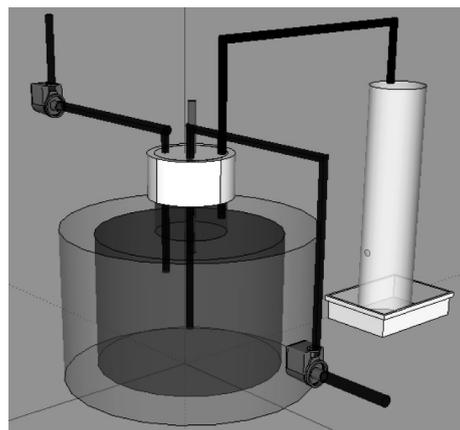
Diseño del biorreactor

En el diseño y operación del reactor se consideraron los parámetros que modifican la producción de hidrógeno y el crecimiento de la bacteria *Clostridium butyricum* en un reactor de operación continua: características morfológicas y metabólicas del microorganismo, sustrato a utilizar, volumen del biorreactor, variables a controlar y esterilidad (Mateus, 1997). De acuerdo con estos parámetros se realizó un diseño preliminar en el software Auto CAD 2007 para determinar los equipos necesarios para el control de las variables anteriormente mencionadas (ver Figura 1). Gracias al modelo se comprobó la necesidad de usar 2 bombas: una para el suministro de sustrato fresco y otra para la remoción de microorganismo junto con sustrato consumido, la potencia de ambas bombas se realizó por medio del balance hidráulico; también, se hizo evidente la necesidad de implantar tres válvulas: dos de globo y una de paso, las válvulas de globo se usaron en las entradas a las bombas para controlar el paso de medio de cultivo y evitar el escape de gases por las tuberías respectivas y la válvula de paso fue implantada en la tubería que conduce al colector de gases.

La producción de hidrógeno a través de métodos fermentativos se ve influenciada por factores inherentes al medio ambiente, estos factores se pueden resumir en el pH y la temperatura a la cual se realiza la fermentación. Los intervalos de pH reportados para el máximo rendimiento y la tasa de producción de hidrógeno están entre 5 y 6 siendo 5,5 el pH óptimo para la producción de hidrógeno usando la cepa *Clostridium butyricum* según lo reportado

por (Pattra&Sangyoka, 2008). La temperatura de fermentación que por lo general en los sistemas de producción de bio-hidrógeno descritos opera en rangos mesófilos (30-40 °C) y en algunos casos termófilos (50-60 °C). En el caso de la bacteria *C. butyricum* la temperatura óptima de crecimiento es 37°C (Wang, 2008).

Figura 1. Diseño preliminar del biorreactor.



Para el control de cada una de las variables implicadas en el funcionamiento se adecuó un equipo para la medición y control del biorreactor. Para el pH se midió cada descarga del biorreactor por medio de un pH-metro marca HANNA HI-9810 (ver Figura 2a). La concentración del microorganismo se controló tomando muestras de 3 ml cada hora, almacenándolas en viales de 7ml de capacidad y haciendo conteo en cámara de Neubauer (ver Figuras 2b y 2c).

La temperatura se midió usando dos termómetros: uno bimetálico que medía la temperatura interna del biorreactor y otro de mercurio que medía la temperatura del agua de calefacción del reactor, la cual fue controlada automáticamente por medio del sistema de calefacción, ajustando los set-points con una temperatura mínima de 38°C y una temperatura máxima de 40°C con el fin de contrarrestar las pérdidas energéticas de la chaqueta térmica. La agitación del biorreactor se mantuvo mediante un agitador magnético de 20-2000 rpm manteniéndose constante a 220 rpm (ver Figura 2d).

Figura 2a. pH-metro usado en la experimentación.



Figura 2b. Cámara de Neubauer marca BOECO Germany.

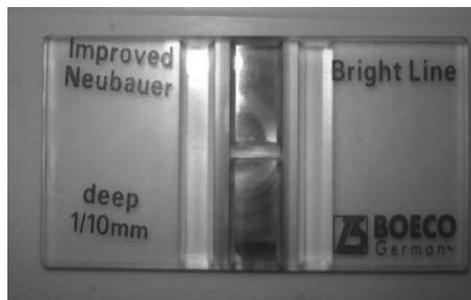


Figura 2c. Microscopio óptico usado en el conteo de microorganismo sobre cámara de Neubauer.



Figura 2d. Agitador magnético usado durante la experimentación.



CONSTRUCCIÓN DEL BIORREACTOR

Una vez definidas las variables y los elementos de control de éstas se procedió a ensamblar todas las partes del montaje del biorreactor. El cuerpo del biorreactor fue constituido por un frasco ISO de 1 L SCHOTT DURAN, la chaqueta fue adaptada de un vaso de precipitado SCHOTT DURAN de 3000 mlde capacidad como se observa en la Figura 3a. Como sistema de colección de gases, se adecuó una probeta plástica de 1000 ml de capacidad conectada a través de tubería plástica al biorreactor (ver Figura 3b).

Finalmente, se conectaron las bombas, válvulas y equipos de control obteniéndose el sistema ensamblado en el cual se realizó la fermentación por 36 horas continuas, realizando descargas cada 4 horas (ver Figura 4).

COMPROBACIÓN DE LA PUREZA DE LA CEPA BACTERIANA

De la cepa *Clostridium butyricum* DSM 2478, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, se tomaron varias muestras con el asa en una lámina de vidrio para realizar el procedimiento de tinción de Gram, encontrándose otro tipo de bacteria presentes en la muestra cuya morfología corresponde a bacterias tipo estreptococos. Debido a esta contaminación, fue necesario hacer resiembra en cámaras de Petri para poder aislar la bacteria *Clostridium butyricum*.

SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y SUSTRATO

Para la selección del medio de cultivo y sustrato se mantuvo el criterio de que la fermen-

tación se realizaría en un medio en el que la bacteria se encontrara en excelentes condiciones de crecimiento para obtener un mejor resultado, teniendo en cuenta las características como el metabolismo y sus rutas metabólicas. Es por esto que se usó el medio de cultivo RCM (Atlas & Parks, 1993), que de acuerdo con la literatura permite el crecimiento de Clostridios a partir de inóculos muy pequeños (CULTIMED, 2003). El extracto de carne, levadura y la peptona de caseína son los elementos nutritivos de este medio, la glucosa actúa como agente energético y la cisteína como reductor. El almidón favorece la germinación de las esporas y el sodio cloruro mantiene el equilibrio osmótico. El medio permite el crecimiento de Estreptococos y Lactobacilos (CULTIMED, 2003).

Figura 3a. Chaqueta y tanque del biorreactor.



Figura 3b. Sistema de colección de gas.



Figura 4. Montaje final del biorreactor CSTR.



PREPARACIÓN DEL INOCULO

En un frasco ISO SCHOTT DURAN de 250 ml se agregó 198 ml de medio de cultivo RCM y 2 ml de cepa bacteriana, luego se incubó a 37°C por 24 horas, tiempo en el cual la solución medio de cultivo-bacteria alcanza una densidad óptica mayor a 1 a 525 nm según lo descrito por (Arévalo *et al.*, 2002).

ANÁLISIS DE LA CINÉTICA

Usando la cinética de la *Clostridium butyricum* (ver Figura 5), realizada por (Moreno, 2010), la cual es evaluada en un biorreactor tipo Batch a nivel laboratorio (volumen de 1 L) usando glucosa como sustrato, RCM (reforzado para Clostridios) como medio de cultivo y *Clostridium butyricum* DSM 2478 como microorganismo, se determinaron las fases del metabolismo de la bacteria.

A partir de la cinética analizada anteriormente se determinaron los tiempos adecuados de carga del inóculo bacteriano, sustrato fresco y descarga de bacteria-sustrato consumido, teniendo en cuenta las fases metabólicas del microorganismo usado y teniendo en cuenta las condiciones de operación del proceso de fermentación.

FERMENTACIÓN, CARGAS Y DESCARGAS

Para este procedimiento es necesario mencionar que se mantuvieron condiciones de asepsia rigurosas, los equipos usados en este proceso fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y alcohol antiséptico durante dos horas; posteriormente se purgaron con cloruro de sodio al 0,9% y medio de cultivo fresco, inhibiendo el crecimiento de cualquier otro microorganismo que no fuera *Clostridium butyricum* que afectara la fermentación. Se diluyeron 14 g de glucosa en 1 L de medio de cultivo (Wang *et al.*, 2008), siendo este el sustrato usado en la fermentación. En 800 ml de sustrato se agregaron 200 ml de inóculo el cual se calentó hasta una temperatura de 37 °C y se depositó en una bolsa Vialflex de 1L usada como medio de almacenamiento (pre-carga). Se carga el biorreactor con este primer sustrato durante 18 horas, posteriormente se descargan 500 ml de sustrato consumido-bacteria, y se cargan 500 ml de sustrato fresco durante un periodo de 4 horas, así por 3 cargas más, para un total de 4 litros, manteniéndose un volumen de control de 1000 ml.

RECuento DE MICROORGANISMOS

Se aplicó la técnica directa de cuantificación en cámara de Neubauer empleada para bacterias. La unidad de medida que se obtiene por esta técnica es cantidad de biomasa en bacterias/ml.

DETERMINACIÓN DE CONSUMO DE SUSTRATO

Mediante la técnica del reactivo DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico), se realizó la cuantificación de azúcares, en la cual se determinó la concentración de glucosa en la biomasa. Por medio de un espectrofotómetro LOVIBOND, a 540 nm se leyó la absorbancia, por medio de una curva de calibración que la relaciona con el consumo de glucosa (g/L).

CUANTIFICACIÓN DE HIDRÓGENO

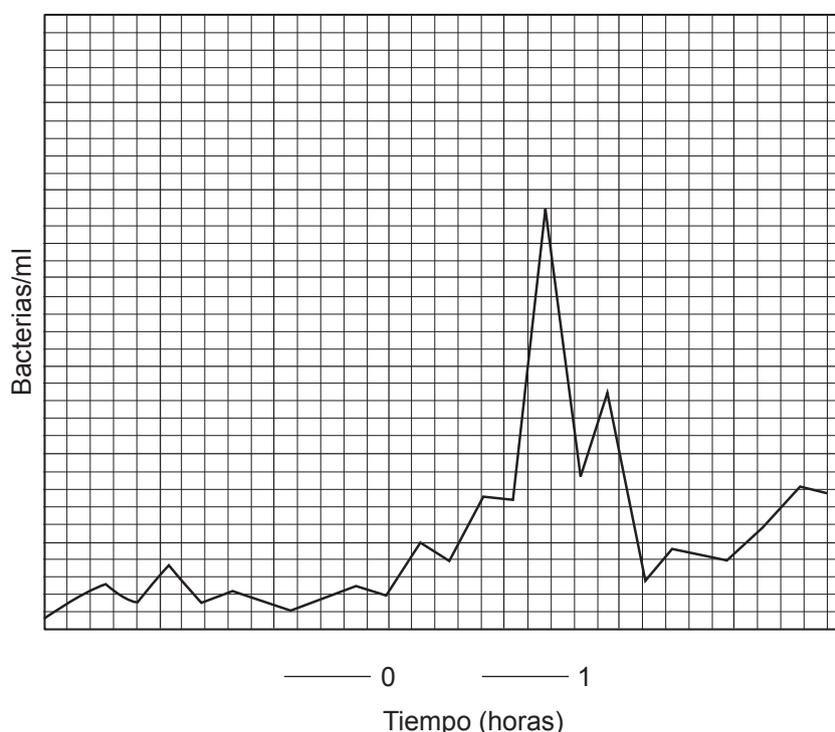
Con el fin de obtener una muestra representativa y homogénea del proceso fermentativo, se tomaron 50 ml de gas producido por cada hora depositados en una bolsa Tedlar (polivinilo de fluoruro) de 1000 ml, obteniendo un volumen total de 800 ml de gas, la cual fue analizada en el laboratorio de la facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional que por medio de la técnica de cromatografía de gases se determinó la concentración de hidrógeno producido en la fermentación.

Para esto se emplearon dos cromatógrafos de gases Hewlett Packard 5890 y Hewlett Packard 5890 series II (Hewlett Packard Co, Germany), equipados con detector de conductividad térmica (TCD). En el Hewlett Packard 5890 se usó una columna empacada Supelco 80/100 Mole Sieve 13X, 10 ft (longitud nominal) × 1/8" s/s (diámetro nominal) (Supelco, USA), para determinar la presencia de H₂, O₂, N₂, CO y CH₄. En el Hewlett Packard 5890 series II se usó una columna capilar Restek RT-Q-Bond, 30m (longitud nominal) × 320µm (diámetro nominal) (Restek Inc., USA), para determinar gases comunes, CH₄, CO₂, hidrocarburos y alcoholes ligeros. Se realizaron dos inyecciones por muestra en cada cromatógrafo, de forma manual. Los volúmenes inyectados y las condiciones de análisis fueron respectivamente: 1 ml, 30 °C constante durante 15 minutos, temperatura de inyector 50 °C, temperatura del detector, 200 °C, gas de arrastre y referencia Ar; 1 ml, 30 °C constante durante 15 minutos, temperatura de inyector 170 °C, temperatura del detector, 170 °C, gas de arrastre y referencia He.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño del biorreactor

Con base en las variables presentadas en el anterior capítulo, en el modelo digital realizado y en la bibliografía consultada se diseñó el biorreactor.

Figura 5. Cinética bacteriana evaluada en un biorreactor tipo BATCH

Fuente: Moreno, 2010

Usando la ecuación general de la energía (Bernoulli) se determinó la potencia requerida de las bombas usadas en el montaje del biorreactor en función de carga y descarga de sustrato fresco y sustrato consumido junto con *Clostridium butyricum*. Teniendo el dimensionamiento del biorreactor, se realizó el balance hidráulico para determinar la potencia de las bombas a utilizar en el procedimiento obviando pérdidas por tuberías y accesorios. De igual forma que se calculó el caudal para la bomba de cargas, se aplicó para la bomba de descarga. La bomba usada para la carga de sustrato fresco al biorreactor fue una bomba de acuario convencional de 2,5 Watts. Dimensiones: 3cm. x 4 cm. (ver Figura 6a). En el caso de la bomba de descarga, la necesidad energética es mayor, debido al vacío que se crea al succionar la biomasa junto al medio de cultivo consumido; la bomba usada para la descarga fue de 12 voltios y 1 amperio (ver Figura 6b).

Se realizó un balance de energía para determinar las pérdidas de calor por convección generado

por el exterior hacia el fluido dentro de la chaqueta y ratificar si era necesario un recubrimiento para eliminar estas pérdidas. Se calcularon las pérdidas de calor en un rango máximo de 0,5 W, el cual no afectó la temperatura de proceso y se calculó el espesor necesario del aislante que se requiere para mantener la temperatura adecuada del fluido usado dentro de la chaqueta: 6,0399 cm.

Comprobación de la pureza de la cepa bacteriana

Debido a la ausencia de colonias diferenciables entre la cepa *Clostridium butyricum* y el *Streptococo* contaminante en las cámaras de Petri, se hizo necesaria otra alternativa para la purificación de la misma; esta vez, se recurrió a usar un nuevo vial de la cepa *Clostridium butyricum* conservada en los laboratorios de la Universidad Javeriana sede Bogotá. Se realizó la técnica de tinción de Gram y como resultado se obtuvo una población uniforme de bacterias tipo bacilos, corroborando así la pureza de la cepa.

Figura 6a. Bomba de Agua usada para la carga de sustrato fresco al biorreactor



Figura 6b. Bomba usada para el descargue de la biomasa del reactor.



(<http://www.electrocyber.cl/bomba.html> Consultada el día 27 de marzo de 2011).

Preparación de inóculo

El inóculo se incubo por un periodo de 24 horas a 37 °C sin agitación, para que la bacteria acelerara su metabolismo, saliendo de la fase de latencia en la que se encontraba debido a las condiciones en que era preservada (15 °C) y para que la carga microbiana aumentara cumpliendo así la población necesaria para desarrollar el proceso de fermentación.

Análisis de la cinética

Con base en la cinética previamente desarrollada por Moreno (2010) se determinó que la fase de adaptación de la bacteria *Clostridium butyricum* usando el medio RCM OXOID® y glucosa como fuente de carbono fue de 12 horas en las cuales la bacteria prepara las enzimas necesarias para comenzar su reproducción; la fase de crecimiento exponencial fue de 4 horas, donde llegó a su máxima población ($2,4 \times 10^9$ bacterias/ml.) experimentando una caída en la carga microbiana en la hora 16 debido al consumo de glucosa inicial dejando las proteínas como única fuente de carbohidrato y nitrógeno en el medio disponibles (en esta hora se realizaría la primera descarga de biomasa y sustrato consumido y carga de alimento fresco), en el intervalo entre las horas 17 y 25, la bacteria se adecua al consumo de las proteínas incrementando levemente su pobla-

ción para finalmente entrar en fase de muerte en la hora 26.

De acuerdo con el análisis realizado a la cinética anteriormente expuesta, se determinó que el mejor tiempo para realizar la primera descarga de biomasa consumida y carga de sustrato fresco al biorreactor era en la hora 17, tiempo en el cual la concentración de microorganismo comienza a descender por la falta de carbohidrato (glucosa) disponible en el medio. La segunda y posteriores cargas se realizaron cada 4 horas, ya que este es el tiempo que le toma a la bacteria llegar nuevamente al punto máximo de concentración de microorganismo, además, usar un tiempo de retención hidráulico (HRT) de 4 horas proporciona favorables resultados en cuanto a producción de hidrógeno (Wuet *al.*, 2008).

Fermentación, cargas y descargas

El periodo de evaluación planteado fueron 36 horas continuas; este tiempo se seleccionó con el fin de obviar 12 horas de arranque del reactor en las cuales la bacteria se adecua al medio, estableciendo su metabolismo y produciendo las enzimas necesarias para la posterior reproducción, dejando 24 horas reales de fermentación continua y poder compararlas con el reactor tipo BATCH desarrollado anteriormente y de esta forma determi-

nar que biorreactor brinda las mayores ventajas en cuanto a producción de hidrógeno se refiere.

El medio de cultivo RCM OXOID® (reforzado para Clostridios) se adquirió en los laboratorios de biotecnología de la Universidad Nacional, fue preparado y esterilizado junto con el cuerpo y la chaqueta del biorreactor a 150 °C y 15 psi en el laboratorio de Investigaciones Microbiológicas Avanzadas Ltda.

En cuanto al sustrato (glucosa), es el hidrato de carbono más abundante en la naturaleza, es de fácil asimilación por parte de *Clostridium butyricum* (Chenet *al.*, 2008), se encuentra presente en el medio de cultivo RCM OXOID® (10% p/p), y se posee el modelo cinético de la bacteria con este sustrato; razones por las cuales se seleccionó la glucosa como fuente de carbono.

Las tuberías, bombas, válvulas, elementos de control (sistema de calefacción, ánodo del pH-metro y agitador magnético) y superficies de trabajo se lavaron inicialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (Block, 1983) por 2 horas para garantizar la eliminación de cualquier agente patógeno y/o microbiano presente en estos elementos. Posteriormente, se hicieron 3 lavados con alcohol etílico al 40% para eliminar la mayor cantidad de hipoclorito residente en los elementos desinfectados y finalmente se dejó pasar agua destilada por todos los sistemas de tubería, bombas y válvulas por 10 minutos para eliminar los rastros de hipoclorito y alcohol etílico que pudieran haber quedado dentro de los equipos.

Una vez garantizada la inocuidad del reactor y de todos los sistemas que lo componen, se realizó el ensamble del mismo y se realizó una purga con solución salina al 0,9% p/V de NaCl estéril para comprobar la ausencia de fugas en los diversos acoples del biorreactor y verificar el funcionamiento de las bombas. El montaje final se aprecia en la Figura 7.

Una vez cargado el biorreactor con el medio de cultivo y el inóculo, se esperó a que la temperatura del sistema se estabilizara en 37°C para dar comienzo a la fermentación. Se removió la mayor cantidad de aire dentro del sistema a través del sistema de colección de gases para eliminar de esta forma todo el gas que no es producto de la fermentación.

Figura 7. Montaje final del biorreactor CSTR.



Al tener el sistema cargado y sin gas interferente, se proceden a tomar 7 ml de muestra del medio fermentativo cada hora para realizar el conteo de bacterias dentro del biorreactor, realizando diluciones según lo propuesto por Montoya (2003) como se muestra en la Tabla 5. A medida que aumenta el tiempo, la población microbiana se incrementa haciendo necesario el incremento en la dilución para facilitar la lectura sobre la cámara de Neubauer.

Tabla 5. Diluciones correspondientes para cada hora (Montoya, 2003).

HORA	DILUCIÓN
0-6	10 ³
7-20	10 ⁶

Del análisis realizado a la cinética microbiana, se determinó que la hora para la primera descarga al biorreactor debería hacerse en la hora 16, pero, al llegar a esta hora, la población microbiana dentro de nuestro biorreactor no alcanzaba la máxima concentración de bacterias

como se esperaba ($1,8 \times 10^9$ bacterias/ml). Debido a esto, se decidió extender el tiempo para que la bacteria llegara a la concentración esperada ($2,4 \times 10^9$ bacterias/ml) y pasadas 2 horas más (hora 18 de la fermentación), finalmente se alcanzó la población deseada ($2,2 \times 10^9$ bacterias/ml). Dos horas después de alcanzada la población requerida (hora 20 de la fermentación), hora en la cual la bacteria ya ha consumido, se procede a realizar la primera descarga de sustrato consumido y la primera carga de alimento fresco (Figura 8).

Pese al incremento en el tiempo necesario para alcanzar la máxima población microbiana, las siguientes cargas y descargas se realizaron según lo planeado: cada 4 horas; la razón para continuar con este tiempo, se debe a que la concentración microbiana de las siguientes cargas, retomaron el comportamiento que se había predicho, llegando a la máxima concentración 4 horas después de realizada la renovación de sustrato y la remoción de biomasa consumida.

Figura 8. Carga de sustrato fresco al biorreactor.

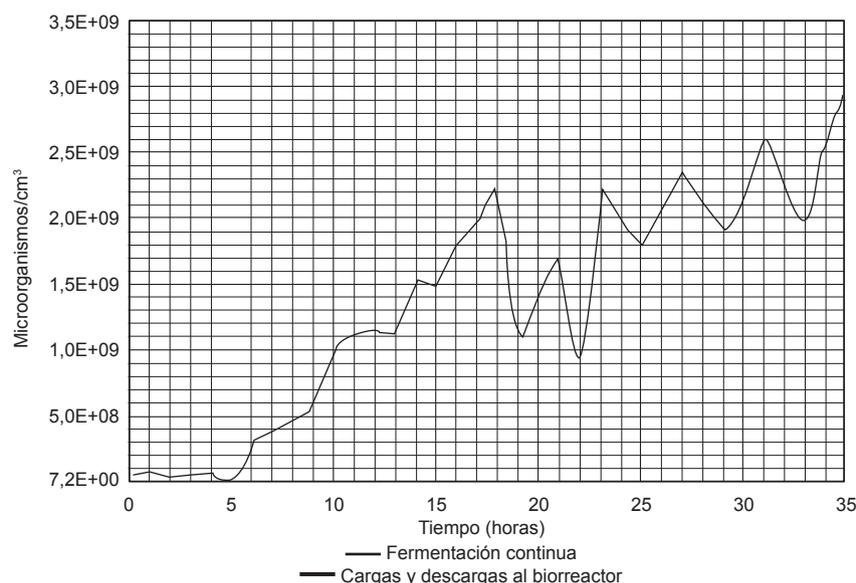


Recuento de microorganismos

Después de efectuada la fermentación, y de realizar el conteo celular por hora, el microorganismo presentó el comportamiento que se muestra en la Figura 9.

Se puede observar que la bacteria *C. butyricum* tuvo el siguiente comportamiento:

Figura 9. Comportamiento del crecimiento microbiano durante la fermentación en el biorreactor CSTR.

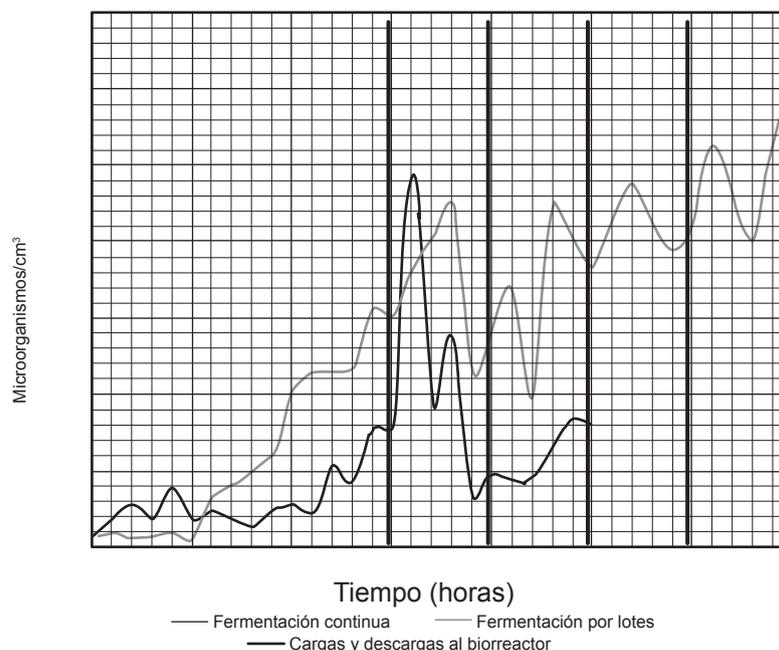


- La fase de adaptación está en el rango entre 0 y 5 horas, periodo en el cual la bacteria prepara las enzimas necesarias para entrar en la fase de crecimiento y comenzar su reproducción.
- Su fase exponencial dio comienzo en la hora 6 prolongándose hasta la hora 18 consumiendo la glucosa suministrada en el medio de cultivo, donde alcanzó su máxima población ($2,2 \times 10^9$ bacterias/ml)
- Entre la hora 18 y 20, la población microbiana comenzó a descender entrando en la fase de muerte debido al consumo de la glucosa dejando como única fuente energética las proteínas contenidas en el medio de cultivo pero debido a que la bacteria no se encontraba preparada para consumirlas disminuyendo su población; en este tiempo se realiza la primera descarga y posterior carga al biorreactor
- Entre las horas 20 y 22, el microorganismo experimenta una fase de inestabilidad atribuido a la renovación del medio de cultivo por un cambio súbito en el pH de 4,6 (pH del reactor internamente) debido a la producción de ácidos butírico y acético provenientes del metabolismo de la glucosa por parte de la bacteria a 7,0 (pH del sustrato renovado), creciendo hasta la hora 21 y cayendo su población entre las horas 21 y 22. Este comportamiento se debe a que el pH intracelular debe permanecer estable para evitar la destrucción de las macromoléculas celulares que son sensibles al álcali. Cuando hay un cambio de pH hacia la neutralidad, la membrana citoplasmática de las bacterias acidófilas (como es el caso de *Clostridium*) se puede disolver causando lisis celular.
- Entre las horas 22 y 23, la bacteria se estabiliza gracias a la capacidad homeostática que le permite regular el pH interno mediante un sistema de transporte de protones que se encuentra en la membrana citoplasmática, que incluye una bomba de protones ATP, retomando su crecimiento hasta una población de $2,2 \times 10^9$ bacterias/ml.
- En la hora 24 se realiza una nueva descarga de microorganismo y sustrato consumido, y se recarga sustrato fresco, evidenciándose un cambio en la población debido a la dilución hecha.
- Entre las horas 25 y 27 el microorganismo nuevamente reactiva su metabolismo aumentando su población, esta vez por encima de la máxima concentración anteriormente obtenida ($2,36 \times 10^9$ bacterias/ml), este aumento de la población se debió a dos causas principales:
 1. La regulación del pH gracias a la hidroxilación de las proteínas (extracto de carne, extracto de levadura y peptona de caseína) del medio de cultivo inducida por el pH ácido en el interior del biorreactor (pH: 5,5) proveniente de los ácidos butírico y acético derivados del metabolismo de la bacteria
 2. El microorganismo se encontraba en fase de crecimiento y al suministrarle más glucosa pudo continuar con su metabolismo.
- En la hora 28 se realizó la tercera descarga y carga al biorreactor, nuevamente se evidencia la disminución en la concentración de microorganismo a causa del consumo de sustrato, esta vez menor a las anteriores descargas, debido a la concentración superior de bacteria.
- De la hora 29 a 31, la bacteria entra de nuevo en fase exponencial alcanzando un máximo de concentración de $2,6 \times 10^9$ bacterias/ml.
- En la hora 32 se realiza la cuarta y última carga evaluada, repitiéndose el patrón visto en las cargas anteriores; disminución en la concentración microbiana producto de la dilución y aumento de la población en las siguientes horas gracias al suministro de sustrato (entre las horas 33 y 35).

Con respecto a la cinética usada como base para el análisis, presentado en la Figura 10 se pueden observar varias diferencias significativas:

- La fase de adaptación de la bacteria en el reactor CSTR fue más corta, debido a que la bacteria fue activada antes de realizar la fermentación y se encontraba en fase vegetativa, este es el período en el que las bacterias individuales están madurando y no tienen aún la posibilidad de dividirse mientras que la cepa usada en el biorreactor BATCH aún se encontraba en forma de endo-espora, indicando que la bacteria se encuentra en estado de hibernación requiriendo más tiempo para su reactivación.
- La primera carga del biorreactor CSTR (hora 20 a 24) tuvo un comportamiento similar al registrado entre las horas 17 y 19 del biorreactor por lotes, las razones de dicho comportamiento son:
 - En el reactor por lotes esa disminución y aumento de la concentración es debido al consumo de la glucosa en la fase exponencial dejando como una fuente energética las proteínas contenidas en el medio de cultivo haciendo que *Clostridium* se alimente de ellas como lo reporta Khelifa (1999) donde se investigan las proteasas y peptidasas activas en el *C. butyricum* y el metabolismo a partir de ellas.
 - En el biorreactor CSTR, como se mencionó anteriormente, el descenso y posterior crecimiento en la población microbiana fue debido al cambio repentino de pH por el ingreso de sustrato fresco al biorreactor, donde ya había producción de ácidos volátiles provenientes del metabolismo bacteriano.
- A partir de la hora 24, en el biorreactor por lotes la *C. butyricum* redujo su metabolismo debido al consumo de glucosa, dejando de reproducirse y por lo tanto reduciendo la producción de gas. Mientras tanto, el biorreactor CSTR, gracias a la renovación del medio continuó con su crecimiento aumentando con cada carga que se realizó al mismo.

Figura 10. Comparación del crecimiento de la bacteria *C. butyricum* en un reactor por lotes y en un CSTR.



Producción de gases durante la fermentación

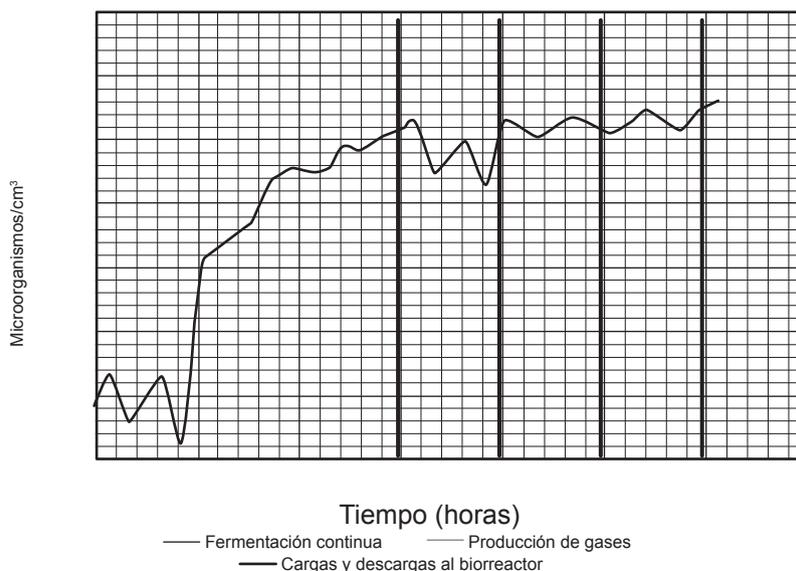
En la Figura 11 se evidencia el comportamiento que tuvo la producción de gases durante la fermentación. Durante el periodo evaluado, se observa el cómo la bacteria inicia la producción de gas en la hora 9 con un volumen de 100 ml. Debido a que es en este periodo donde la bacteria entra en fase de crecimiento y con ella, la producción de gases provenientes. El volumen de gas final producido por el reactor es aceptable en comparación con el obtenido por Zhu *et al.* (2009), cuya experimentación consistió en operar de modo continuo por un lapso de 70 días usando un cultivo mixto de bacterias y aguas residuales de remolacha azucarera, produciendo un volumen de 5.000 ml al segundo

día de evaluación, mientras que nuestro reactor produjo un total de 8.025 ml en el mismo tiempo.

Consumo de glucosa durante la fermentación

Se tomaron varias muestras de las horas más representativas en relación a la Figura 12, en donde se presenta el crecimiento celular de la bacteria durante la fermentación. El consumo de glucosa en la hora 20 (tiempo en el cual alcanza su máxima población y se realiza la primera descarga) fue del 78,4%, en las siguientes cargas y descargas el consumo de glucosa descendió a 53,5% debido al menor tiempo de residencia del sustrato dentro del biorreactor con referencia de la primera carga.

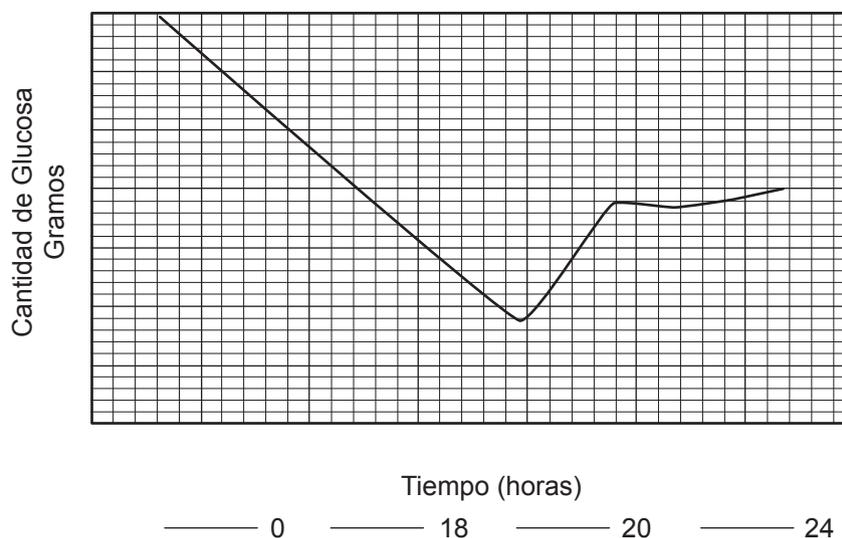
Figura 11. Producción de gases en el periodo de fermentación.



Cuantificación de hidrógeno

Con relación a los resultados obtenidos por cromatografía, se encontraron los siguientes gases: hidrógeno, dióxido de carbono, nitrógeno y oxígeno, estos dos últimos no son producidos por la bacteria, la presencia de ellos en

la muestra cromatográfica indica la contaminación de la misma con aire. Finalmente el porcentaje de hidrógeno contenido en la muestra tomada fue de 50,3% con una producción de CO₂ del 26% y un 23,7% de nitrógeno y oxígeno como gases interferentes.

Figura 12. Consumo de glucosa durante la fermentación

CONCLUSIONES

De acuerdo con las condiciones y al medio en el cual la bacteria se desarrolla, el biorreactor que se seleccionó para construir y operar fue un CSTR, el cual se caracterizó por tener una relación 2:1 en cuanto a la altura y al diámetro, cuyas medidas fueron 20 cm y 10 cm respectivamente con un volumen total de 1 L probado a medida en que se iba construyendo.

Se seleccionó como sustrato glucosa, ya que al ser un monómero, *C. butyricum* fácilmente lo asimila sin necesidad de realizar hidrólisis para romper enlaces glucosídicos.

Las variables críticas de control fueron, la concentración de sustrato (glucosa) 14 g/l, temperatura 37°C, agitación 200 rpm y pH 5-7, ya que de estas dependió la velocidad de crecimiento del microorganismo y por lo tanto la producción de gas de éste.

Para operar en condiciones de inocuidad rigurosas, fue necesario construir el biorreactor

con materiales resistentes a la corrosión, altas presiones y temperaturas, es por esto que se usó vidrio Pyrex para el cuerpo del equipo, tuberías y accesorios de plástico de fácil lavado, inspección y drenaje.

El tiempo del proceso de fermentación fueron 36 horas de las cuales, 5 comprendieron la fase de adaptación y el arranque del biorreactor, 14 horas de crecimiento continuo, realizando 4 cargas y descargas en intervalos de 4 horas a partir de la hora 20.

La producción de gas de la *C. butyricum* en condiciones mencionadas anteriormente fue de un volumen total de 8000 ml en un tiempo de proceso de operación de 36 horas, que según la literatura la producción de hidrógeno es de 163 ml/h.

El oxígeno y nitrógeno presente en el proceso de fermentación, fue causado por un escape accidental en el momento de la descarga de sustrato consumido-bacteria, ya que estos gases no hacen parte del metabolismo de la bacteria.

BIBLIOGRAFÍA

- Arévalo, C., Arrieta, A. & Aguilera, G.. (Octubre, 2002). Caracterización de cepas nativas colombianas de Clostridio solventogénicos por perfiles de plásmidos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 31, pp. 51-60.
- Atkinson, B. (1986). *Reactores Bioquímicos*. Barcelona: Reverté. p. 15.
- Atlas, R.M. & Parks L.C.. (1993). *Handbook of Microbiological Media*, 765.
- Bedoya, A. y Castellón, J.. (2008). Producción biológica de hidrogeno: una aproximación al estado del arte. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. p. 140.
- Block, S.. (1983). *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Third edition; Lea & Febiger. Philadelphia.
- Chen, S., Lee, K., Lo, Y., Chen, W., Wu, J., Lin, C. & Chang, J.. (April, 2008). Batch and continuous biohydrogen production from starch hydrolysate by Clostridium species. *International Journal of Hydrogen Energy* vol. 33 issue 7, pp. 1803-1812.
- Crueger, W..(1993). *Biotechnology Manual de microbiología industrial*. Zaragoza: Acibia S.A. p 413.
- CULTIMED. (2003). *Manual Básico de Microbiología*. Panreac Química S.A. P VI.
- Fierro, J.L.G., La Parola, V., Thomas, S., Guil-López, R. y Navarro, R.M..(2003). Producción de hidrógeno a partir del gas natural sin emitir dióxido de carbono. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC.
- Hallenbeck, P.C. & Benemann, J.R.. (2002). Biological hydrogen production: fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy*. 27, 1185-1193.
- Khelifa, N..(1999). Cleavage of L-Leucine dipeptides by Clostridium butyricum. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 9. pp. 109-112.
- Lin, C.Y. & Lay, C.H..(2004). Carbon/Nitrogen ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int J Hydrogen Energy*. 29, 41-45.
- Mateus, J.A..(1997). Diseño de un fermentador para la producción de bio-plaguicidas. Trabajo de grado de ingeniero químico. Universidad de América. Facultad de ingeniería. Departamento de ingeniería química. Bogotá D.C. p. 189.
- Montoya, D..(2003). Anaerobic, solvent-producing bacteria: Molecular characterisation, polysaccharolytic activity and agroindustrial waste degradation. p. 41.
- Moreno, G.A.. (2010). Propuesta de diseño de un biorreactor a escala de laboratorio para la producción de hidrógeno. Proyecto de grado. Fundación Universidad de América Bogotá. p. 16.
- Nakada, E., Nishikata, S., Asada, Y. & Miyake, J..(1998). Light penetration and wavelength effect on photosynthetic bacteria culture for hydrogen production. Zaborsky OR, editor. *Biohydrogen*. London: Plenum Press. pp. 345-398.
- Otsuki, T., Uchiyama, S., Fujiki, K. & Fukunaga, S..(1998). Hydrogen production by a floating-type photobioreactor. Zaborsky OR, editor. *Biohydrogen*. London: Plenum Press. pp. 369-442.
- Patra, S., & Sangyoka, S..(2008). Biohydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by Clostridium Butyricum. *International journal Hydrogen Energy* 33, 5256-5265.
- Sánchez, I.N.. (2007). Producción de Hidrógeno a Partir de Residuos Agrícolas por vía Fermentativa. Tesis. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. p. 3.
- Sasaki, K..(1998). Hydrogen and 5-aminolevulinic acid production by photosynthetic bacteria. Zaborsky OR, editor. *Biohydrogen*. London: Plenum Press. Pp. 133-175.

Shigeharu, T. (2005). Hydrogen production by facultative anaerobe *Enterobacter aerogenes*. Yokohama National University, Japan. pp. 273.

Valdez, I., Acevedo, A., Poguui, M.. (2010). Generación de hidrógeno por microorganismos: ¿realidad o mito? CINVESTAC-México, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. p.2.

Valero, M., Egizabal, A., Arrillaga, I. & Belsue, M..(2004). Producción biológica de hidrógeno a partir de residuos. Departamento de Tecnología Química y Medio Ambiente, Fundación INASMET.

Van Ginkel, S. & Sung, S. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci Technol.* 35, 4726-4730.

Wang, M..(2008). Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous *Clostridium Butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. *International Journal of Hydrogen Energy.* 33, 18, 4730-4738.

Wang, X., Jin, B. & Mulcahy, D..(2008). Impact of carbon and nitrogen sources on hydrogen production by a newly isolated *Clostridium Butyricum* W5. *En: International journal of Hydrogen Energy.* Octubre, 33, 19, pp. 4998-5005.

Wu, S., Lin, C., Lin, P., Hung, C., Chang, J, Lee, K. & Chang, F..(2008). Dark fermentative hydrogen production from xylose in different bioreactors using sewage sludge microflora, *Energy & Fuels*, 22,1, 113-119.

Yaws, C. L. (2000). *Yaws' Handbook of Thermodynamic and Physical Properties of Chemical Compounds.* Knovel.

Zhang, Y. & Shen, J..(2006). Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *Int J Hydrogen Energy.* 31, 441-446.

Zhu, G., Liu, C., Xu, G., Li, J., Gao, Y., Chen, L. & Liu, H..(2009). Simultaneous biohydrogen production and wastewater treatment in continuous stirred tank reactor (CSTR) using beet sugar wastewater. *International Conference on Energy and Environment Technology.* pp. 738.

Zürer, H. & Bachofen, R. (1979). Hydrogen production by the photo synthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Environ Microbiol*; 37,5, 789-881.