

Tomado de: [http://miaprimerseminario20081.blogspot.mx/2008\\_10\\_01\\_archive.html](http://miaprimerseminario20081.blogspot.mx/2008_10_01_archive.html)

# Influencia del origen del inóculo sobre la producción de biohidrógeno

## Influence of the inoculum source on the biohydrogen production

Pedro Vera-Toledo<sup>1\*</sup>  
Iván Moreno-Andrade<sup>2</sup>  
Carlos M. García-Lara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Ambiental, libramiento Norte-Poniente núm. 1150, colonia Caleras Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, C.P. 29000.

<sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México. Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas del Instituto de Ingeniería, Blvd. Juriquilla núm. 3001, Juriquilla, Querétaro, México, C.P. 76230.

\*Autor para correspondencia:  
caachis1@hotmail.com

Fecha de recepción:  
17 de diciembre de 2014

Fecha de aceptación:  
8 de octubre de 2015

### RESUMEN

El biohidrógeno se considera el más prometedor de los biocombustibles por generar solo agua como residuo de su combustión. En este trabajo se compararon dos inóculos para la producción de biohidrógeno; el primero proveniente de la planta de tratamiento de una industria cervecera (Inóculo A) y el segundo de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas (Inóculo B). En ambos casos, para la selección de microorganismos productores de biohidrógeno se empleó un pretratamiento, consistente en choque térmico por 24 h a 104 °C de temperatura, seguido de una trituration hasta alcanzar la consistencia de polvo. La producción de biohidrógeno acumulado se ajustó al modelo de Gompertz, demostrando que a pesar de que se operó con un sustrato consistente de solución de glucosa al 5 %, enriquecido

con medio mineral, agitación 15.71 rad/s y temperatura de 35 °C, el tiempo de latencia y la productividad fueron distintos. Los reactores del Inóculo A generaron un acumulado de 128.27 mL de biohidrógeno, 12 veces mayor que los del Inóculo B (9.11 mL), con productividades de 85.52 mL y 6.07 mL de  $H_2/L_{\text{reactor}}/d$  respectivamente, lo que se atribuye a las cantidades de microorganismos presentes en los inóculos comparados. La concentración del biohidrógeno varió desde 0 % hasta 72.42 % para el Inóculo A y de 0 % a unos 29.49 % para el Inóculo B. El Inóculo A mostró alto potencial para la producción de biohidrógeno.

**PALABRAS CLAVE:** biohidrógeno, inóculo, pretratamiento.

### ABSTRACT

Biohydrogen is considered the most promising biofuel as it ge-

nerates only water as waste combustion. In this work, two inocula for biohydrogen production were compared, one from the treatment plant of a brewery (Inoculum A), and the other from a treatment plant of domestic residual waters (Inoculum B). In both cases, for selecting biohydrogen producing microorganisms, a pretreatment consisting of heat shock for 24 h at 104 ° C temperature, followed by crushing to reach the consistency of powder was used. The accumulated biohydrogen production was adjusted to the Gompertz model, showing that despite operating with a substrate which consisted of a 5 % glucose solution, enriched with mineral medium, stirring 15.71 rad/s at 35 °C, the latency period and productivity differed. The Inoculum A reactors generated a cumulative biohydrogen of 128.27 mL, 12 times higher than the inoculated with Inoculum B (9.11 mL), with productivities of 85.52 mL and 6.07 mL of  $H_2/L_{reactor}/d$  respectively. This is attributed to the quantities of microorganisms present in the inocula compared. Biohydrogen concentration varied from 0 % to 72.42 % for the Inoculum A, and from 0 % to about 29.49 % for Inoculum B. The inoculum A strain showed high potential for biohydrogen production.

**KEYWORDS:** biohydrogen, inocula, pretreatments.

## INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles siguen siendo una importante fuente de energía a escala global, a pesar de que su disponibilidad se encuentra limitada y de los efectos adversos causados al medio ambiente por su explotación y uso excesivo. Actualmente se busca desarrollar fuentes alternativas de energía para resolver estas problemáticas. Una posibilidad alentadora para suplir a los combustibles convencionales son los biocombustibles: biodiésel, bioetanol, biogás y biohidrógeno. Estas fuentes de energía, deben cumplir con tres requisitos: respeto al medio ambiente tanto en su generación como en su uso, no afectar la seguridad alimentaria y que sean económicamente factibles (Hill y col., 2006).

De los cuatro biocombustibles, el biohidrógeno es el único que en su combustión genera como residuos únicamente agua, los restantes aportan ciertas cantidades de gases de efecto invernadero,

por ello no cumplen con el primer requisito, y en algunos casos, dependiendo el sustrato utilizado, tampoco cumplirían el segundo. De acuerdo con Han y Shin (2004), para garantizar los requisitos ideales de un biocombustible, en la generación biológica de hidrógeno, se deben utilizar como sustrato materiales residuales de bajo costo. Entre estos sustratos se pueden mencionar: la fracción orgánica de residuos sólidos, el agua residual u otros residuos orgánicos, como por ejemplo de las agroindustrias e industrias alimenticias como: láctea, almazara, panadera, levadura de cerveza (Karapinar y Kargi, 2006), jugos, néctares, conservas de frutas y verduras, azúcar, entre otros.

En la generación de biohidrógeno, existen una serie de variables que intervienen en el proceso, que aún no se sabe de manera clara cómo afectan en la velocidad y la cantidad de producción, pero que en algunos casos la pueden inhibir totalmente (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Estos parámetros se deben seguir con especial atención a fin de poner en práctica las técnicas de colección y recuperación del biohidrógeno de los procesos aplicados. Las variables que inciden en la generación de biohidrógeno son: la ruta metabólica que se decida utilizar: fermentación oscura, foto fermentación o ambas (Levin y col., 2004), los rangos de las variables termodinámicas: temperatura (Wang y Wan, 2008) y presión (Abreu y col., 2012) a la que es sometido el sistema, el tipo de reactor o equipo utilizado: continuo, semi-continuo, lotes, agitado o no, el tiempo de retención hidráulica, las características y tipo de sustrato: contenido de humedad, sólidos totales, fijos y volátiles, contenido de nutrientes, proteínas, lípidos, carbohidratos, la demanda química de oxígeno, la capacidad de amortiguamiento del sistema, que guarda una relación estrecha con la naturaleza del sustrato, el tamaño medio de la partícula, entre otros (Antonopoulou y col., 2008), el pH al que se decida mantener el proceso (Yogananda y col., 2015) y el uso de inóculo (Ren y col., 2008).

El uso de inóculo en la producción de biohidrógeno es un factor que a su vez representa otra serie de variables, tales como: procedencia u origen, características físicas, químicas y biológicas (comunidades microbianas), el uso de sales minerales o

nutrientes y el pretratamiento que reciba (Chinellato y col., 2013; Gadhe y col., 2013).

El pretratamiento es de importancia en los resultados esperados, ya que reduce los tiempos de aclimatación de las bacterias seleccionadas y aumenta la producción de biohidrógeno por la eliminación de las arqueas (Ren y col., 2008).

Se ha utilizado una gama de diversos inóculos incluyendo: estiércol de diversos animales, como vacas (Fan y col., 2006), pandas (Xing y col., 2010) y búfalos (Nagaiah y col., 2012); o tierra (Logan, 2004), composta (Yokoyama y col., 2007), rumen de bovinos y lodos de plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) (Chenlin y Fang, 2007). Entre ellos, destaca el último por su uso generalizado. En lo que se refiere a los pretratamientos se identifican por lo menos cuatro que se usan solos o combinados: choque térmico, adición de químicos, sonicación y aireación. En el choque térmico, se calienta el inóculo a temperaturas que rondan en los 100 °C (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009), por rangos de tiempos que van desde los 15 min hasta las 24 h.

La adición de químicos ha demostrado no ser una buena opción debido a su costo y a los posibles residuos que pueden permanecer en el medio o sólidos gastados cuando se utiliza biomasa (Oh y col., 2003). Por lo anterior, sustancias químicas como 2-bromoetanosulfonato de sodio (BES), fluoroacetato, cloroformo y ácidos inorgánicos no pueden ser utilizadas a gran escala (Oh y col., 2003), además que se reporta la existencia de metano con la utilización de BES (Zahedi y col., 2011).

La sonicación persigue, como los otros pretratamientos, suprimir el crecimiento de los microorganismos metanogénicos y enriquecer los productores de biohidrógeno. Sin embargo, uno de los principales problemas son los costos de capital y de operación de las unidades de ultrasonido. El costo puede subir o bajar al madurar la tecnología. Del mismo modo, los datos de rendimiento a largo plazo, de los sistemas de ultrasonidos de gran escala, son todavía limitados, lo que desalienta a los ingenieros de diseño a recomendarlos (Elbeshbishy y col., 2011a).

En el caso de la aireación, se ha reportado que al aplicar un tratamiento de aireación constante durante 30 d, puede inhibir la actividad metanogénica (Wei y col., 2011). Sin embargo, su principal desventaja es el tiempo de preparación del inóculo.

El pretratamiento térmico permite recortar el tiempo de preparación, costos de proceso, operaciones tecnológicas y además garantiza no generar organismos metanogénicos. En este caso, una de las metodologías reportadas es realizar un choque térmico a 104 °C por 24 h, de acuerdo con Buitrón y Carvajal (2010).

El objetivo de este trabajo fue establecer si el pretratamiento térmico permite obtener inóculos productores de biohidrógeno a partir de plantas de tratamiento de aguas residuales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de los lodos utilizados como inóculo y su pretratamiento

Se utilizaron dos inóculos de diferentes orígenes, a los que se realizó análisis de humedad, sólidos totales, fijos y volátiles de acuerdo con los Métodos estándar (APHA, 2005). El primer inóculo fue obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de una industria cervecera (Inóculo A). El segundo inóculo (Inóculo B) fue obtenido de una PTAR doméstica. Ambos inóculos fueron pretratados térmicamente en una estufa (Termo Scientific, Waltham, MA USA), durante 24 h, a  $104 \pm 2$  °C (Buitrón y Carbajal, 2010). Posteriormente, se trituraron hasta alcanzar la consistencia de talco.

### Experimento

Se emplearon como reactores botellas serológicas con capacidad de 160 mL, con un volumen útil de 100 mL y un espacio de cabeza de 60 mL, con una repetición para cada inóculo. Como sustrato, se empleó una solución de glucosa al 5 % enriquecida, con medio mineral, adaptado de Mizuno y col. (2000) (cada litro de solución: 0.4 mg  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2 mg  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and 2 mg  $\text{ZnCl}_2$ ) y 0.3 g de inóculo pretratado. Una vez que se adicionó la solución

de glucosa enriquecida e inóculo, se desplazó el aire del espacio de cabeza con nitrógeno, para evitar contaminación por oxígeno, se sellaron y colocaron en una incubadora orbital marca Wisd, Laboratory Instruments Orbital Motion WIS-30 (witeg Labortechnik GmbH, Wertheim Deutschland), en ausencia de luz a 35 °C y agitación de 15.71 rad/s, de acuerdo con Yen-Hui y col. (2011). Diariamente, se midió la presión interna de cada una de las botellas con una sonda marca Sper Scientific Wide Range Pressure Meter, Pressure Transducer Model P 5100-2 bar (Scottsdale, AZ 85260, USA). Se tomaron muestras de los gases generados, sin tratamiento alguno, con una jeringa comercial equipada con una válvula de tres vías (muestra con volumen de 10 mL de gas cada 3 d), analizando los gases producidos con la ayuda de un cromatógrafo de gases marca SRI modelo 8610 C (Menlo Park, California, USA), equipado con un detector de conductividad térmica y dos columnas capilares de metal acero 2 - m embalado con Porapak TDS- 01 (60/80 mesh). La temperatura operativa en el horno de columna y el detector fueron de 150 °C. Se utilizó nitrógeno como gas portador a una velocidad de flujo de 70 mL/min.

El experimento se realizó por 15 d, finalizando cuando la presión de los reactores reportó valores de cero. La producción de biogás en los reactores se midió cada 24 h y se comprobó la presión utilizando la sonda Sper Scientific Wide Range Pressure Meter (Scottsdale, AZ 85260, USA). Estos parámetros establecidos a temperatura constante se emplearon para desarrollar la ecuación de estado más sencilla y manejable: la ecuación general de

los gases ideales, debido a los rangos relativamente bajos de presión obtenidos y a que la energía interna de las moléculas del sistema depende de la temperatura, que se mantuvo constante (35 °C), para calcular los volúmenes (mL) de los gases correspondientes a los días muestreados.

El análisis de los resultados se realizó en dos vertientes, la primera para determinar qué inóculo reportó la mayor producción de biohidrógeno y en una segunda instancia se utilizó un ajuste al modelo de Gompertz (Martínez y col., 2010), que predice el comportamiento de la generación de biohidrógeno, determinando el tiempo de latencia, máxima producción de biohidrógeno y la máxima velocidad de producción de biohidrógeno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las determinaciones de humedad, sólidos totales, fijos y volátiles, antes del pretratamiento para ambos inóculos se muestran en la Tabla 1, donde tanto los sólidos totales, como los fijos, presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), lo que se atribuye a que el Inóculo B se generó en casas habitación con una carga sólida relativamente alta, compuesta de materiales inertes, tales como fibras sintéticas y/o naturales, plásticos, arenas y huesos, entre otros. Mientras que los lodos de la industria cervecera no presentan estos materiales, ya que se generan en un proceso industrial que implica los cuidados necesarios para el envasado de bebidas grado alimenticio. Es importante considerar que la concentración de sólidos, particularmente los sólidos fijos, representa una estimación de la cantidad de materia orgánica, incluyendo la biomasa (McCarty y Parkin, 2001),

■ Tabla 1. Humedad, sólidos totales, fijos y volátiles de Inóculo A e Inóculo B.

Tabla 1. Moisture, total, fixed and volatile solids of Inoculum A and Inoculum B.

Parámetro	Inóculo A			Inóculo B			Unidad
	Promedio	Varianza	D.E.	Promedio	Varianza	D.E.	
humedad	95.0	4.5	2.1	90.7	5.1	2.3	%
sólidos totales	50.0	2.0	1.4	92.7	38.7	6.2	g ST/kg
sólidos fijos	28.2	1.6	1.3	0.4	0.0	0.1	g SF/kg
sólidos volátiles	99.7	67.3	8.2	99.9	52.0	7.2	g SV/kg

<sup>a,b</sup> Letras distintas indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

y determina la densidad de los sólidos residuales (Zhu y Béland, 2006). Los microorganismos presentes en los lodos incluyen a las especies que se especializan en la generación del biohidrógeno y que serán de utilidad después de aplicar el pretratamiento (Elbeshbishy y col., 2011b).

El análisis cromatográfico de los gases producidos mostró que el H<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> estaban presentes al utilizar ambos inóculos. En este trabajo solo se analiza el H<sub>2</sub>. La concentración del H<sub>2</sub> se estableció mediante una curva de calibración, transformando el área bajo la curva en porcentaje (Figura 1).

A partir de la concentración porcentual y la presión medida, se obtuvo el volumen por componente. Con estos valores se calcularon, en volúmenes, el promedio diario de biohidrógeno y su acumulado, incluyendo la productividad; esta última en volumen de biohidrógeno en mL/L de reactor por día (mL H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>/d) alcanzado por cada experimento, así como la varianza y desviación estándar (Tabla 2).

Se observaron máximos de producción en los días 2, 5, 12 y 14 de los reactores inoculados con el Inóculo A (Tabla 2). El primer máximo coincide con Faloye y col. (2014), quienes reportan que el crecimiento y la fermentación progresó hasta alcanzar un máximo después de 2 d, y la concentración de biohidrógeno aumentó gradualmente hasta 56.43 %, cercano a lo encon-

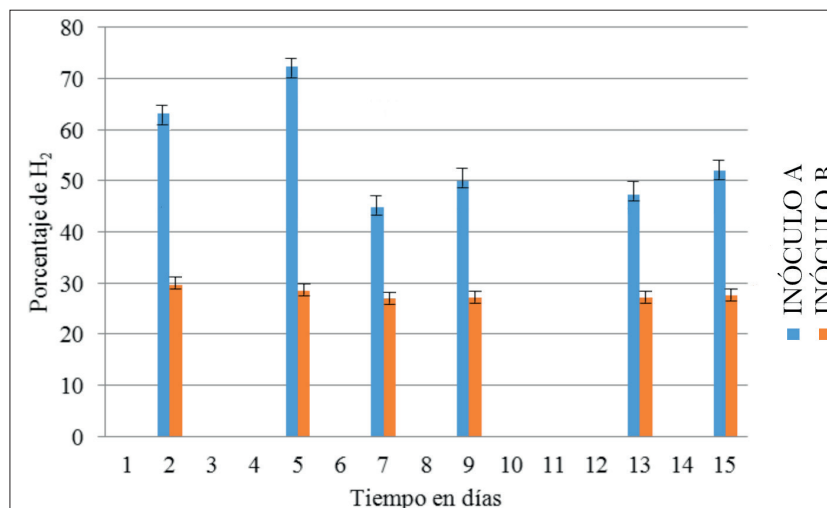
trado en este estudio, sobre todo en el Inóculo A con 63.21 % (Figura 1); sin embargo, en general, el rango abarcó desde 47.30 % hasta 72.43 %, no así en el Inóculo B, en donde se registraron concentraciones porcentuales de biohidrógeno bajas en comparación al Inóculo A, entre los 27.15 % (día 7), hasta 29.49 % (día 2). Los días 2 y 5 coincidieron para ambos experimentos, no así los subsecuentes, que de acuerdo a las eficiencias de conversión reportada para *Clostridium intermedium* varían hasta en un 38 % al usar glucosa como sustrato (Vipin y Hemant, 2008).

La productividad promedio presentó una media diaria de 85.52 mL de H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>/d para el Inóculo A y de 6.07 mL de H<sub>2</sub>/L<sub>reactor</sub>/d para el Inóculo B; sin embargo, debido a las fluctuaciones diarias de productividad se presentaron valores altos de varianza y desviación estándar, particularmente para el Inóculo A (Tabla 2).

Con los datos del promedio del acumulado de producción se analizó el ajuste al modelo matemático con la ecuación de Gompertz, debido a que ofrece detalles que los modelos matemáticos más simples, como la recta o ecuaciones de segundo grado no pueden. El modelo matemático de Gompertz modela el crecimiento bacteriano; relacionado con la generación de biohidrógeno que se presenta a continuación:

$$Y = K e^{-e^{-\lambda(H_{max} - Y)}}$$

■ **Figura 1. Comportamiento de la concentración de H<sub>2</sub>, con desviación estándar.**  
 Figure 1. H<sub>2</sub> concentration Behavior, with standard deviation.



■ Tabla 2. Volúmenes promedios por día, acumulados y productividad de biohidrógeno.  
Table 2. Average volumes of biohydrogen by day, accumulated and productivity.

Tiempo en días	Promedio diario en mL de H <sub>2</sub>		Promedio del acumulado en mL de H <sub>2</sub>		Productividad promedio en mL de H <sub>2</sub> /L <sub>reactor</sub> /d	
	Inóculo A	Inóculo B	Inóculo A	Inóculo B	Inóculo A	Inóculo B
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	.00
2	12.55	2.35	12.55	2.35	125.51	23.48
3	0.73	0.45	13.28	2.80	7.32	4.50
4	0.73	0.23	14.02	3.03	7.32	2.27
5	19.94	3.33	33.96	6.36	199.45	33.28
6	2.43	0.06	36.39	6.42	24.31	0.59
7	9.82	0.25	46.21	6.66	98.16	2.47
8	3.24	0.06	49.45	6.72	32.42	0.55
9	8.25	0.33	57.70	7.05	82.52	3.33
10	0.50	0.04	58.20	7.09	5.04	0.38
11	0.50	0.38	58.71	7.47	5.04	3.79
12	26.83	0.06	85.54	7.52	268.29	0.56
13	5.02	0.19	90.56	7.71	52.82	1.86
14	23.05	1.40	113.60	9.11	230.47	14.00
15	14.67	0.00	128.27	9.11	146.70	0.00
Varianza	80.87	0.97	1437.80	7.05	8087.23	97.35
Desviación estándar	8.99p	0.99	37.92	2.66	89.93	9.87

$$-e\lambda - H \max * R \max Y = K^e$$

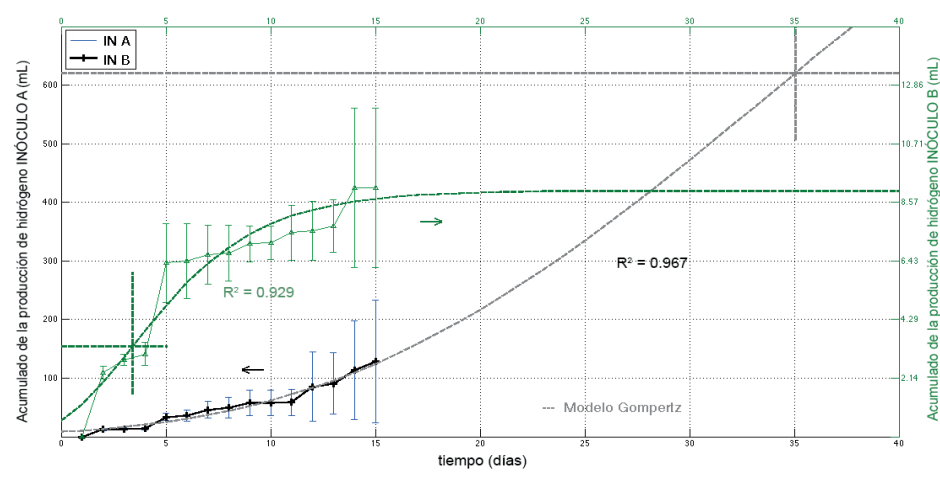
Las constantes expresadas en el modelo son:  $\lambda$  = periodo de latencia, Hmax = valor acumulado máximo, Rmax = la pendiente de la curva.

Los resultados de los ajustes sobre el promedio del acumulado de la producción del biohidrógeno arrojaron que para el Inóculo A el ajuste fue de 0.967, en contra parte, el ajuste para el caso del Inóculo B fue de 0.929 (Figura 2). De acuerdo al modelo, las estimaciones de la generación de biohidrógeno para el Inóculo A, son: máxima producción de biohidrógeno (Hmax) de 1 687 mL, a los 160 d; pendiente (Rmax) de 8.54 y periodo de latencia de los microorganismos de 35 d. Para el Inóculo B la máxima producción de biohidrógeno (Hmax) se registró en 8.94 mL, a 20 d, pendiente

(Rmax) de 10.97 y periodo de latencia de los microorganismos a 3 d.

En la práctica, la producción de biohidrógeno disminuyó sensiblemente a los 15 d. Los resultados experimentales no mostraron una meseta clara. El modelo predice tiempos de máxima producción a 20 d para el Inóculo B, poco atractiva (8.94 mL de biohidrógeno) y de 160 d para el Inóculo A, con 1 687 mL de biohidrógeno, lo que significa una mayor rentabilidad. Sin embargo, es poco factible para ser llevado a un proceso a escala real, porque tiempos tan largos de operación representan reactores con grandes volúmenes, lo que aumenta costos de construcción, pero sobretodo de operación. Ante esto, es necesario el

■ **Figura 2.** Ajuste de los datos experimentales al modelo matemático Gompertz, con desviación estándar.  
Figure 2. Adjusting the experimental data to the Gompertz mathematical model, with standard deviation.



desarrollo de un modelo ajustado que tome en cuenta valores de experimentos que no llegan a una fase asintótica de producción de hidrógeno.

Este proceso fermentativo es complejo, gobernado por diversas variables, aun cuando se utilice el sustrato más sencillo: glucosa, que primero es convertida en piruvato, que puede ser convertido a acetyl-CoA y formiato, que a su vez puede ser fácilmente convertido en hidrógeno y dióxido de carbono. La acetyl-CoA, finalmente se convierte en algunos metabolitos solubles, tales como acetato, butirato y etanol, entre otros (Chenlin y Fang, 2007). En suma, la solventogénesis implica la remodelación global del metabolismo para redirigir recursos (carbono y la reducción de potencia), a partir de la producción de biomasa en la producción disolvente (Alsaker y Papoutsakis, 2005); ello se refleja en diferentes composiciones y volúmenes de biogás. Adicionalmente, otra de las dificultades es conseguir una cantidad de biomasa o la densidad de microorganismos que generen la misma producción de hidrógeno (Zhu y Béland, 2006), sin que el proceso se inhiba. Werner y col. (2011), demostraron que intentar controlar o mantener las poblaciones de fermentación es más difícil, ya que, de acuerdo con Wittebolle y col. (2009), la uniformidad de las comunidades iniciales favorece la funcionalidad bajo estrés selectivo, y cuando las comunidades son desiguales, o hay dominación extrema por una o unas pocas especies, su funcionamiento es menos resistente a la tensión ambiental, lo que es perfectamente entendible, ya que las comunidades microbianas provienen de un pretratamiento con choque térmico.

Las especies microbianas que han sido reportadas con la capacidad de generar biohidrógeno son: *Pseudomonas* (Guo y col., 2008), *Clostridium saccharobutylticum* y *Clostridium pasteurianum* (Chang y col., 2006), *Ruminococcus* ssp., *Selenomonas ruminantium*, *Clostridium cellobioparum*, *Citrobacter freundii*, *Acetobacterium woodii*, *Trichomonas brockii* y *Syntrophomonas wolfei* (Vi-pin y Hemant, 2008), *Clostridium butyricum* y *Citrobacter freundii* (Beckers y col., 2010), cultivos puros de *Clostridium butyricum* CWBI1009, *Clostridium pasteurianum* DSM525, *Clostridium beijerinckii* DSM1820 y *Clostridium felsineum* DSM749 (Masset y col., 2012). De acuerdo con Karapinar y Kargi (2006), las investigaciones de diversidad microbiológica de lodos mesofílicos en la producción de biohidrógeno, indican la presencia de especies de *Clostridia* en un 64.6%.

Específicamente, en estudios utilizando lodos que provenían de una PTAR como inóculos, Ren y col. (2008) reportan en 8 de 15 pruebas de los 4 pretratamientos: ácido, básico, aireación y choque térmico, la presencia de *Clostridium longisporum*, *Clostridium vincentii* y *Clostridium tyrobutyricum*; únicamente en aireación no se encontró presencia de *Clostridium*. Lo mismo reportan Cisneros-Pérez y col. (2015), *Clostridium* y *Enterobacterias* eran dominantes, con una fuerte presencia del género *Lactobacillus*, sin embargo, otro aspecto importante, es la densidad de microorganismos en el inóculo, que mucho depende de las características y de la fuente de origen del mismo (Zhao y col., 2012).

## CONCLUSIONES

El empleo de un sustrato a partir de una solución al 5 % de glucosa, con las mismas condiciones de proceso y pretratamiento permitió establecer que el origen del inóculo tiene una marcada diferencia en la producción de biohidrógeno. En el presente estudio, el inóculo proveniente de una PTAR de la industria cervecera produjo un volumen 12 veces mayor de hidrógeno que el inóculo proveniente de

una PTAR doméstico. Es importante considerar la cantidad de microorganismos presentes en el inóculo inicial y la concentración de sólidos fijos iniciales para incrementar la producción de biohidrógeno contenido en el biogás.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo financiero del proyecto CONACYT 24008.

## REFERENCIAS

- Abreu, A. A., Karakashev, D., Angelidaki, I., Sousa, D. Z., and Alves, M. M. (2012). Biohydrogen production from arabinose and glucose using extreme thermophilic anaerobic mixed cultures. *Biotechnology for Biofuels*. 5(6): 1-12.
- Alsaker, K. V. and Papoutsakis, E. T. (2005). Transcriptional program of early sporulation and stationary-phase events in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*. 187(20): 7103-7118.
- APHA, American Public Health Association (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Twenty edition), APHA. Baltimore: Port city press. 216-220 Pp.
- Antonopoulou, G., Hariklia, N. G., Ioannis, V. S. K., Angelopoulos, G. L., and Lyberatos, G. (2008). Biofuels generation from sweet sorghum: Fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of the remaining biomass. *Bioresource Technology*. 99(1): 110-119.
- Beckers, L., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Masset, J., and Thonart, P. (2010). Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CWBI1009 and *Citrobacter freundii* CWBI952 in pure and mixed cultures. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 14(2): 541-548.
- Buitrón, G. and Carvajal C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*. 23(101): 9071-9077.
- Chang, J. J., Chen, W. E., Shih, S. Y., Yu, S. J., Lay, J. J., Wen, F. S., and Huang, C. C. (2006). Molecular detection of the clostridia in an anaerobic biohydrogen fermentation system by hydrogenase mRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 70(5): 598-604.
- Chinellato, G., Cavinato, C., Bolzonella, D., Heaven, S., and Banks, C. J. (2013). Biohydrogen production from food waste in batch and semi-continuous conditions: Evaluation of a two-phase approach with digestate recirculation for pH control. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38(11): 4351-4360.
- Chenlin, L. and Fang H. H. P. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 37(1): 1-39.
- Cisneros-Pérez, C., Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., Etchebehere, C., and Razo-Flores, E. (2015). Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*. 40(19): 6329-6339.
- Elbeshbishy, E., Hafez, H., and Nakhla, G. (2011a). Viability of ultrasonication of food waste for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37(3) : 2960-2964.
- Elbeshbishy, E., Hafez, H., Ranjan-Dhar, B., and Nakhla, G. (2011b). Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36(17): 11379-11387.
- Faloye, F. D., Gueguim-Kana, E. B., and Schmidt, S. (2014). Optimization of biohydrogen inoculum development via a hybrid pH and microwave treatment technique-Semi pilot scale production assessment. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39(11): 5607-5616.
- Fan, Y. T., Zhang, Y. H., Zhang, S. F., Hou, H. W., and Ren, B. Z. (2006). Efficient Conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost, *Bioresource Technology*. 97(3): 500-505.
- Gadhe, A., Sonawane, S. S., and Varma, M. N. (2013). Optimization of conditions for hydrogen production from complex dairy wastewater by anaerobic sludge using desirability function approach. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38(16): 6607-6617.
- Guo, L., Li, X. M., Bo, X., Yang, Q., Zeng, G. M., Liao, D. X., and Liu, J. J. (2008). Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresource Technology*. 99(9): 3651-3658.



- Han, S. K. and Shin, H. S. (2004). Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *International journal of hydrogen energy*. 29(6): 569–577.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., and Tiffany, D. (2006). Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(30): 11206–11210.
- Karapinar, I. and Karg, F. (2006). Biohydrogen production from waste materials. *Enzyme and microbial technology*. 38(5): 569–582.
- Levin, D. B., Pittb, L., and Loveb, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2(29): 173–185.
- Logan, B. E. (2004). Peer reviewed: extracting hydrogen and electricity from renewable resources. *Environmental Science and Technology*. 38(9): 160A–167A.
- Martínez, C. A., Rodríguez, A. P., Jiménez, A. y Manrique, C. (2010). Descripción matemática de la función Gompertz aplicada al crecimiento de animales. *Reflexión, Revista Médica Veterinaria Zootecnista*. 57: 76–80.
- Masset, J., Calusinska, M., Hamilton, C., Hiligsmann, S., Joris, B., Wilmotte, A., and Thonart, P. (2012). Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp. *Biotechnology for Biofuels*. 5(1): 20–35.
- McCarty, P. L. and Parkin, G. F. (2001). *Química para ingeniería ambiental* (Cuarta edición). Colombia: McGraw-Hill. 713 Pp.
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., and Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*. 73(1): 59–65.
- Nagaiah, D., Srinivasa-Rao, P., Prakasham, R. S., Uma, A., Radhika, K., Yoganand, B., and Umakanth, A. V. (2012). High Biomass Sorghum as a Potential Raw Material for Biohydrogen Production: A Preliminary Evaluation. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 6(2):183–189.
- Ren, N. Q., Guo, W. Q., Wang, X. J., Xiang, W. S., Liu, B. F., Wang, X. Z., ..., and Chen, Z. B. (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 16(33): 4318–4324.
- Oh, S. E., Van, G. S., and Logan, B. E. (2003). The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental Science and Technology*. 37(22): 5168–5190.
- Valdez-Vazquez, I. and Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 13(5): 1000–1013.
- Vipin, C. K. and Hemant, J. P. (2008). Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 5(35): 403–419.
- Wang, J. and Wan, W. (2008). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33(20): 5392–5397.
- Wei, H., Zhanqing, W., Hong, C., Xin, Y., and Yong, F. L. (2011). Simultaneous Biohydrogen and Bioethanol Production from Anaerobic Fermentation with Immobilized Sludge. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011: 1–5.
- Werner, J. J., Knights, D., Garcia, M. L., Scalfone, N. B., Smith, S., Yarasheski, K., ..., and Angenent, L. T. (2011). Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108(10):4158–4163.
- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., ..., and Boon, N. (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature*. 458(7238): 623–626.
- Xing, Y., Fan, Y. T., and Hou, H. W. (2010). Production of Cellulose-Hydrogen from Corn Stalk based on Acid-enzyme Two-Stage Pretreatment by Mixed Culture. The 6th International Symposium on Multiphase Heat Mass Transfer and Energy Conversion. *American Institute of Physics*. 1207(1): 1045–1048.
- Yen-Hui, L., Mu-Ling, J., and Hsin-Jung, H. (2011). Effects of temperature and initial pH on biohydrogen production from food-processing wastewater using anaerobic mixed cultures. *Biodegradation*. 22(3): 551–563.
- Yogananda, M., Yan, Z., Chenghong, G., Keke, X., and Wun, J. N. (2015). The effect of pH on solubilization of organic matter and microbial community structures in sludge fermentation. *Bioresource Technology*. 10(190): 289–298.
- Yokoyama, H., Waki, M., Ogino, A., Ohmori, H., and Tanaka, Y. (2007). Hydrogen Fermentation properties of undiluted cow dung. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 104(1): 82–85.
- Zahedi, S., Sales, D., Solera, R. y Romero, L. I. (2011). Enriquecimiento de inóculo anaerobios en eubacterias productoras de hidrógeno. *Residuos*. (123): 42–47.
- Zhao, M. X., Yan, Q., Ruan, W. Q., Miao, H. F., Ren, H. Y., and Xu, Y. (2012). A Comparative Study of Sequential Hydrogen-methane and Independent Methane Production from Kitchen Wastes. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. 34(11): 1046–1054.
- Zhu, H. and Béland, M. (2006). Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 14(31): 1980–1988.