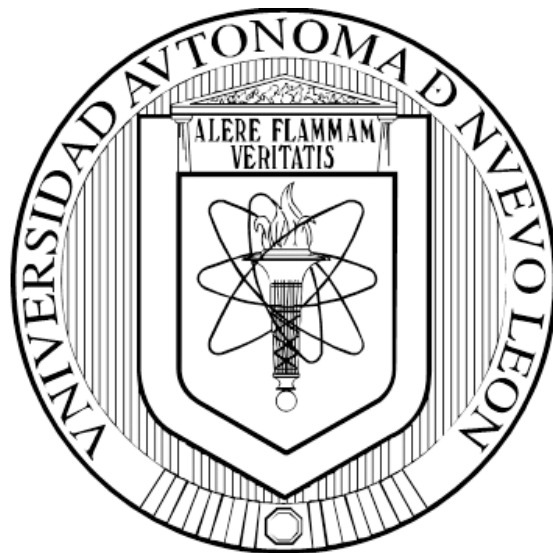


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS

**APLICACIÓN DE MEDIADORES REDOX SOLUBLES E INMOVILIZADOS
PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR
Clostridium beijerinckii.**

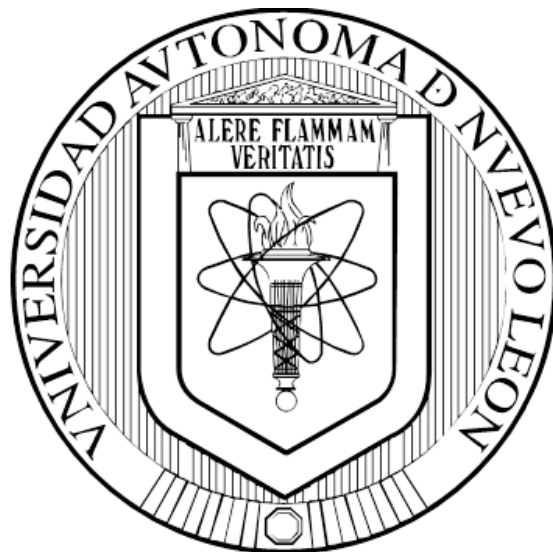
PRESENTA

CECILIA GUADALUPE MARTÍNEZ COBOS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

DICIEMBRE, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

**APLICACIÓN DE MEDIADORES REDOX SOLUBLES E INMOVILIZADOS
PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR
Clostridium beijerinckii.**

PRESENTA

CECILIA GUADALUPE MARTÍNEZ COBOS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN

DICIEMBRE, 2016

**APLICACIÓN DE MEDIADORES REDOX SOLUBLES E INMOVILIZADOS
PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR
Clostridium beijerinckii.**



Comité de Tesis

Dr. Luis Humberto Alvarez Valencia

Director

Dra. María Teresa Garza González

Tutor

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Tutor

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio

Tutor

Diciembre del 2016.

LUGAR DE TRABAJO

Una parte del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Luis Humberto Alvarez Valencia, y el soporte económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT No. 36129) y del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (N-PTC 2015).

Otra parte de este trabajo se realizó en 168 Rich Laboratory, 312 Biosystems Research Complex en Clemson University, bajo la supervisión del Dr. Kevin T. Finneran.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia.

A mi esposo Rodolfo Catellanos González y mi hija Andrea Castellanos.

A mis padres Armando Martínez Perales y Eloisa Cobos Martínez

A mis hermanas Dariela y Clara Martínez Cobos

A mis abuelos Dolores Martínez Licerio y Jose Cobos Mireles

Con paciencia, determinación y felicidad se puede lograr todo lo que sueñas,
aprende a llegar a tu meta partiendo de lo más sencillo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi familia, quienes siempre me han apoyado en todas mis decisiones sean buenas o malas.

A mi esposo, que nunca me ha dejado renunciar a nada, me ayuda y me comprende.

A mis padres, que sin su comprensión, guía y apoyo jamás hubiera logrado todo lo que soy hasta ahorita.

A mis hermanas, que son mis cómplices en todo, que siempre han estado para acompañarme en todo momento.

A mi asesor, quien ha tenido paciencia y ha tenido que hacer su mayor esfuerzo por sacar este proyecto adelante.

A la Familia Unda, quienes me abrieron las puertas de su casa aun siendo yo una desconocida y me proporcionaron una casa, transporte y comida en un lugar desconocido para mí.

A la comunidad de la Universidad de Clemson, quienes fueron muy amables y pacientes conmigo.

RESUMEN

Cecilia Guadalupe Martínez Cobos
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título de tesis: APLICACIÓN DE MEDIADORES REDOX SOLUBLES E INMOVILIZADOS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCION DE HIDRÓGENO POR *Clostridium beijerinckii*.

Número de páginas: 42

Candidato de la Maestría en Ciencias
con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y métodos de estudio. Para contrarrestar el efecto del uso de combustibles fósiles se han ido buscando soluciones y alternativas para satisfacer las necesidades energéticas, se busca una energía que sea amigable con el medio ambiente. El hidrógeno es una de las opciones viables que tiene un potencial energético parecido al de los combustibles fósiles y no generar contaminación al medio ambiente. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de distintos mediadores redox reducidos, en forma inmovilizada y soluble, durante la producción de hidrógeno por *C. beijerinckii*. Las pruebas se realizaron en botellas serológicas con un volumen de trabajo de 100 mL de medio. Se adicionó xilosa (2 g/L), 6 mL de inóculo de *C. beijerinckii* (DO de 0.81), concentraciones (100, 250 y 500 μ M) de riboflavina, antraquinona-2,6-disulfonato, antraquinona-2-sulfinato y lawsona, previamente reducidas con un sistema $H_2/Pd-Al_2O_3$. Las condiciones anaerobias fueron establecidas con N_2/CO_2 (80%/20%). Se incluyeron controles sin mediador redox y con mediador redox oxidado. Incubadas a 37 °C, se midió la producción de hidrógeno durante 60 h utilizando un cromatógrafo de gases. Se sometió a isotermas de adsorción a los mediadores redox se emplearon diferentes de tamaños de carbón activado (0.5, 1.0 y 2.0 mm). El carbón activado se modificó previamente con una solución de HCl y $ZnCl_2$, se hicieron soluciones de los cuatro mediadores redox a diferentes concentraciones (50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L), se utilizaron 30 mL y 30 mg de carbón activado.

Conclusiones. Las cinéticas de producción de hidrógeno realizadas a la fecha demuestran que existe un aumento en la concentración de hidrógeno cuando *C. beijerinckii* es expuesta a MR reducidos, siendo más efectiva la RF. Las isotermas de adsorción son mejores en carbón activado granular con tamaño de 0.5 mm. Estos resultados indican que el uso de MR como donadores de electrones es eficaz en el proceso de producción de hidrógeno por métodos microbiológicos. Estos resultados permitirán modificar electrodos a base de carbón para mejorar la capacidad de transferencia de electrones en celdas bioelectroquímicas durante la producción de hidrógeno.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIDRÓGENO COMO ALTERNATIVA ENERGÉTICA, LIMITACIONES Y MEJORAS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN	3
2.1. FUENTES DE ENERGÍA RENOVABLES	4
2.2. HIDRÓGENO COMO COMBUSTIBLE RENOVABLE	4
2.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL HIDRÓGENO COMO COMBUSTIBLE	6
2.4. MÉTODOS PARA PRODUCIR HIDRÓGENO	6
2.4.1. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA PRODUCIR HIDRÓGENO	7
2.4.2. MÉTODOS BIOLÓGICOS PARA PRODUCIR HIDRÓGENO	9
2.5. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR <i>CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII</i>	11
2.6. MEDIADORES REDOX	13
2.6.1. REDUCCIÓN DE MEDIADORES REDOX	13
2.6.2. MEDIADORES REDOX COMO DONADORES DE ELECTRONES EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	14
2.7. INMOVILIZACIÓN DE MEDIADORES REDOX	15
2.8. CARBÓN ACTIVADO	16
2.9. MEDIADORES REDOX INMOVILIZADOS COMO DONADORES DE ELECTRONES	16
3. JUSTIFICACION	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1. OBJETIVO GENERAL.	21
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	21
6. MATERIALES Y METODOS	22
6.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE MEDIADORES REDOX SOLUBLES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO.	22

6.1.1.	REACTIVOS E INÓCULO	22
6.1.2.	MEDIO CULTIVO	23
6.1.3.	REDUCCIÓN QUÍMICA DE MOLÉCULAS REDOX	24
6.1.4.	CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO CON MEDIADORES REDOX SOLUBLES EN SU FORMA REDUCIDA	25
6.2.	INMOVILIZACIÓN DE MEDIADORES REDOX EN CARBÓN ACTIVADO Y SU CONTRIBUCIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	25
6.2.1.	ISOTERMAS DE ADSORCIÓN	26
6.2.2.	INMOVILIZACIÓN DE MEDIADORES REDOX	27
6.2.3.	REDUCCIÓN DE MOLÉCULAS REDOX INMOVILIZADOS	27
6.2.4.	CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO CON EL MEDIADOR REDOX INMOVILIZADO EN SU FORMA REDUCIDA	28
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1.	EFFECTO DE LOS MEDIADORES REDOX REDUCIDOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN FORMA SOLUBLE	29
7.2.	ISOTERMAS DE ADSORCIÓN	33
7.3.	INMOVILIZACIÓN DE LOS MEDIADORES REDOX	37
7.4.	EFFECTO DE LOS MEDIADORES REDOX REDUCIDOS INMOVILIZADOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	40
8.	CONCLUSIONES	44
9.	BIBLIOGRAFÍA	45

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pagina
Tabla 1. Comparación de las propiedades físicas y químicas de combustibles	5
Tabla 2. Métodos para producir hidrógeno (Singh et al. 2015)(Singh et al. 2015)(Singh et al. 2015)(Singh et al. 2015)(Singh et al. 2015)(Singh et al. 2015)(Singh et al. 2015)(Singh et al. 2015)(Singh et al. 2015)(Singh et al. 2015)	8
Tabla 3. Producción de hidrógeno por diferentes microorganismos	10
Tabla 4. Fuentes de carbono para <i>Clostridium beijerinckii</i> Fanp3	11
Tabla 5. Condiciones de cinética con los mediadores inmovilizados	28

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
Figura 1. Mediadores redox reducidas en contacto con bacterias	15
Figura 2. Mecanismo propuesto para la inmovilización	18
Figura 3. Mecanismo de reducción de mediadores redox	24
Figura 4. Producción de hidrógeno con <i>C. beijerinckii</i> en presencia de riboflavina	30
Figura 5. Producción de hidrógeno por <i>C. beijerinckii</i> en presencia de A ₂ HQDS	31
Figura 6. Producción de hidrógeno por <i>C. beijerinckii</i> en presencia de AHQS	32
Figura 7. Capacidad de adsorción en carbón activado de diferentes tamaños	35
Figura 8. Capacidad de adsorción en carbón activado tamaño 0.5 mm	36
Figura 9. Capacidad de desorción después de ciclos de lavado para AQS	37
Figura 10. Capacidad de desorción después de ciclos de lavado para A ₂ QDS	38
Figura 11. Producción de hidrógeno por <i>C. beijerinckii</i> en presencia de AHQS inmovilizado	39
Figura 12. Producción de hidrógeno por <i>C. beijerinckii</i> en presencia de A ₂ HQDS inmovilizado	41

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el crecimiento de la población mundial ha traído consigo el aumento del uso de combustibles fósiles para satisfacer las necesidades industriales, de transporte y domésticas. Con este constante crecimiento también se ha incrementado la liberación de gases nocivos para el medio ambiente.

Para contrarrestar el efecto del uso de combustibles fósiles se han ido buscando soluciones y alternativas para satisfacer las necesidades energéticas, al mismo tiempo que se busca una energía que sea amigable con el medio ambiente. Actualmente se cuenta con varias energías alternas, entre las que se puede mencionar: la energía solar, la cual puede ser tanto térmica como luminosa, la eólica, la hidráulica, mareomotriz, geotérmica, entre otras. La ventaja de estas fuentes de energía es su compatibilidad con el medio ambiente. Sin embargo, requieren de trabajar en conjunto con otra para cubrir los requerimientos energéticos, además de instalaciones y equipos para su almacenamiento, ya que estas tienen la desventaja de no ser producidas de manera continua a comparación de la energía no renovable.

El hidrógeno es una de las opciones viables que tiene un potencial energético parecido al de los combustibles fósiles, además de no generar contaminación al medio ambiente. Sin embargo, esta opción aún tiene limitantes, es decir las investigaciones hechas en este campo aún son relativamente nuevas. Una de las limitantes más importantes es que la producción no tiene buenos rendimientos, aunado a las bajas tasas de producción. Los métodos por los cuales se produce

pueden llegar a ser bajo condiciones extremas. Otra de sus limitaciones es que requiere de tecnologías aún en desarrollo para su almacenamiento, transporte y uso.

Es por eso que este proyecto se enfoca a tratar de solucionar uno de estos problemas, se busca aumentar el rendimiento y la tasa de producción de hidrógeno por medio de técnicas que son amigables con el medio ambiente.

2. HIDRÓGENO COMO ALTERNATIVA ENERGÉTICA, LIMITACIONES Y MEJORAS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN

En la actualidad el uso global de energía depende casi enteramente de los combustibles fósiles, lo cual contribuye a un aumento en la contaminación global y esto a su vez ocasiona cambios climáticos, así como también pone en peligro la salud de los seres vivos. El hidrógeno es una limpia y eficiente fuente de energía y se ha considerado como portador de energía potencial del futuro. (Pan et al. 2008).

El hidrógeno es el elemento químico más abundante, sin embargo, la forma elemental (H) es muy rara en nuestro planeta. La mayor parte del hidrógeno se produce in situ, es decir, en el lugar y en el momento en que se necesita. Este elemento es altamente inflamable lo que le da algunas propiedades para poder ser usado como combustible. Tiene un rendimiento energético de 122 kJ/g, que es una energía 2.75 veces más alta que los combustibles basados en hidrocarburos. Cuando se usa como combustible el principal producto de su combustión es agua, la cual puede ser reciclada para producir más hidrógeno (Singh & Wahid 2015).

A pesar de ser considerada la energía del futuro, la producción del hidrógeno aun no es viable debido a diversos factores. Como todos los nuevos desarrollos de tecnología y energética se requiere de experimentación y solución de varias problemáticas. Los bajos rendimientos en la producción de hidrógeno son uno de estos problemas, además los procesos suelen ser poco costables.

Los métodos físico-químicos requieren altos consumos de energía y son costosos. (Pan et al. 2008). Por otro lado, los procesos biológicos prometen ser una

alternativa más viable, sin embargo, los principales retos a vencer de estas técnicas son los bajos rendimientos, las bajas tasas de producción y la inestabilidad de un reactor para la producción continua (Singh & Wahid 2015).

2.1. Fuentes de energía renovables

Las fuentes de energía renovables son aquellas que pueden ser reutilizadas y que además de esto son sustentables. En su mayoría son amigables con el medio ambiente, por lo cual no se consideran en esta clasificación a los combustibles fósiles. Algunas de estas fuentes son energía eólica, solar, poder hidráulico, biomasa, geotérmica y energía oceánica. Estas energías tienen algunas ventajas como lo son que no producen gases de tipo invernadero y no representan un riesgo nuclear, pero tienen el problema de que no están concentradas en yacimientos como los combustibles fósiles y están dispersas en la naturaleza en pocas cantidades. A pesar de las cantidades dispersas de estas opciones energéticas en algunos países se investiga, implementan tecnologías y el uso de éstas (Zhu 2011).

2.2. Hidrógeno como combustible renovable

El hidrógeno es el tipo de comburente por el que más se ha optado ya que otras fuentes como la solar o la eólica necesitan de coadyuvantes para lograr la eficiencia de combustibles fósiles. La creciente demanda en el mercado de la producción de hidrógeno para el uso en automóviles y motores que antes requerían de

combustibles fósiles, es una de las razones por las cuales el hidrógeno es una de las opciones energéticas más efectivas para sustituirlos.

Al comparar las propiedades químicas y físicas del hidrógeno con las del metano y la gasolina, existe una gran diferencia en el rango de flamabilidad. Además, se difunde cuatro veces más que el gas natural y 12 veces más que la gasolina, ya que es muy ligero y su densidad es 6.9% de la del aire. Por lo tanto, el riesgo de explosión es mucho menor ya que en una fuga de hidrógeno éste se disipa rápidamente (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de las propiedades físicas y químicas de combustibles.

Propiedad	Hidrógeno	Metano	Gasolina
Peso molecular (g/m)	2.016	16.04	~100
Densidad de masa (kg/N m³) en P=1 atm=0.101 MPa, T=0 °C	0.09	0.72	720-780 (líquido)
Densidad de líquido H₂ a 20 k (kg/Nm³)	70.9	-	-
Punto de ebullición (K)	20.2	111.6	310-478
Valor superior calorífico (MJ/kg) (asumiendo que se produce agua)	142.0	55.5	47.3
Valor inferior calorífico (MJ/kg) (asumiendo que se produce vapor)	120.0	50.0	44.0
Límite de flamabilidad (volumen %)	4.0-75.0	5.3-15.0	1.0-7.6
Límite de detonabilidad (volumen %)	18.3-59.0	6.3-13.5	1.1-3.3
Velocidad de difusión en el aire (m/s)	2.0	0.51	0.17
Energía de ignición (mJ)		0.29	
- a mezcla estequiometrica	0.02	20	0.24
- A limite bajo de flamabilidad	10		n/a
Velocidad de flama en el aire (cm/s)	265-325	37-45	37-43
Toxicidad	No toxico	No toxico	Toxico arriba de 50 ppm

2.3. Ventajas y desventajas del hidrógeno como combustible

El uso de hidrógeno como combustible en un futuro tiene varios retos por delante. Las tecnologías desarrolladas para transporte, suministro y uso aún tienen dificultades. Para solucionar estas desventajas se han propuesto varios contenedores, materiales, temperaturas e incluso el uso de metales para formar hidruros y así hacer más fácil el desempeño del hidrógeno (Singh et al. 2015)

Por otro lado, las ventajas que presenta el hidrógeno como combustible parecen ser numerosas, no emite gases tóxicos, es un elemento abundante en la naturaleza y tiene la potencia de un combustible fósil. A esto también se puede sumar las múltiples formas de obtención del hidrógeno.

2.4. Métodos para producir hidrógeno

La producción de hidrógeno puede dividirse en dos, los métodos físico-químicos y los métodos biológicos.

Los métodos físico-químicos (por ejemplo, reformación de hidrocarburos, la electrólisis del agua) requieren de grandes cantidades de energía, por lo que son métodos costosos. Por el contrario, los métodos biológicos utilizando recursos renovables son ambientalmente favorables y consumen menos energía en condiciones de funcionamiento suaves, como puede ser temperatura y presión ambiente (Pan et al. 2008).

2.4.1. Métodos físico-químicos para producir hidrógeno

Debido a que el hidrógeno no está disponible en estado libre en el planeta, se trabaja en su producción por varios métodos químicos. Todos los esfuerzos por mejorar los métodos para producir hidrógeno se hacen para intentar cubrir principalmente las necesidades energéticas para el transporte de la sociedad.

Las técnicas físico-químicas requieren de altos consumos de energía, ya sea energía eléctrica o calorífica, altas temperaturas de operación o altas presiones atmosféricas. Así como también de compuestos químicos contaminantes al medio ambiente y que ponen en peligro la salud de los individuos que operan estas técnicas. Algunas de las técnicas que se pueden mencionar son: metano reformado con vapor, reformado auto térmico de petróleo, gasificación de carbón y otros hidrocarburos, electrólisis del agua, hidrógeno de biomasa por medio de tecnologías termoquímicas y energía nuclear.

Para mayor claridad, el método más utilizado dentro de esta gama es el metano reformado con vapor el cual es un proceso altamente endotérmico. Para que sea posible este tratamiento se trabaja con temperaturas entre 800–1000 °C y presiones en un rango de 5–25 atm (Fan et al. 2016). El método de oxidación parcial catalítica (CPOX por sus siglas en inglés) requiere temperaturas entre 1300–1500 °C, la gasificación de carbón y otros hidrocarburos en la cual las temperaturas necesarias son entre 1200–1350 °C, debido a las altas temperaturas que se emplean en estos procesos se requiere de alimentación energética, instalaciones, material y personal capacitado para operar estos procedimientos en las condiciones ya mencionadas,

también se debe tomar en cuenta que no todos los métodos son igual de eficientes para la producción de hidrógeno(Singh et al. 2015) (Tabla 2).

Tabla 2. Métodos para producir hidrógeno (Singh et al. 2015).

Proceso de producción de hidrógeno	Emisiones de CO ₂ (kgCO ₂ /kg/H ₂)	Costos de operación y mantenimiento (US\$/kgH ₂ /día)	Costo capital (US\$/kgH ₂ /día)	Costo de la materia prima (US\$/kgH ₂ /día)	Costo de producción de H ₂ (US\$/kgH ₂)
Sistema energía hidroeléctrica – electrolisis	0	30.51	4927.05	0	1.4
Sistema turbina de viento – electrolisis	0	15.71	3170.86	0	36.75
Sistema fotovoltaico – electrolisis	0	15.71	10448.56	0	17.36
Gasificación de biomasa	5.89	52.56	104.82	194.88	23.78
Gasificación de carbón	29.33	54.9	1637.19	120.15	22.37
Oxidación parcial	12.35	35.84	1058.17	136.61	16.07
Metano reformado con vapor	7.33	14.51	284.77	154.32	32.75

2.4.2. Métodos biológicos para producir hidrógeno

La obtención de hidrógeno por métodos biológicos es atractiva porque no son agresivos para el medio ambiente. Además es posible utilizar aguas residuales o residuos sólidos como sustrato para obtener hidrógeno, lo que representa un beneficio importante no solo para obtención de energía sino también para el tratamiento de la contaminación (Liu et al. 2015).

Los microorganismos utilizados para la producción biológica de hidrógeno se dividen comúnmente en dos categorías principales: las bacterias fotosintéticas y bacterias de fermentación no lumínica (Singh & Wahid 2015). La fermentación anaerobia es más viable para el tratamiento de aguas residuales y la que más se ha estudiado debido a que el hidrógeno se produce como un subproducto durante la fase acidogénica de la digestión de la materia orgánica. Entre las bacterias estudiadas para esta tarea se puede mencionar *Rhodobacter capsulatus* KU002, (Merugu et al. 2010) *Enterobacter sp.*, (Fabiano & Perego 2001) *Bacillus sp.*, (Liu et al. 2015) *Escherichia*, *Citrobacter*, *Alcaligenes* y *Clostridium sp.*(Pan et al. 2008) Las bacterias con mayor capacidad para producir hidrógeno son las de fermentación oscura, como *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*, debido a los altos rendimientos de producción reportados (Liu et al. 2015) (Tabla 3).

Clostridium sp. la cual es reconocida como una productora efectiva de hidrógeno, es la bacteria dominante después de los tratamientos de lodo anaerobio con calor utilizados para hacer más eficientes los procesos de producción (Pan et al. 2008). En un estudio hecho en 2007 se reporta la producción de hidrógeno con cuatro

especies de *Clostridium* como *acetobutylicum*, *butiricum*, *tirobutiricum* y *beijerinckii* demostrándose que esta última especie tiene los rendimientos más altos de producción (Lin et al. 2007).

Tabla 3. Producción de hidrógeno por diferentes microorganismos (Pan et al. 2008).

Microorganismo	Condiciones de cultivo	Fuente de carbón (g/L)	Rendimiento máximo de H₂ (mol/mol de sustrato)	Máxima producción de H₂ (mL/h/L)
<i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Fanp3</i>	Batch	Glucosa	2.52	390
<i>Clostridium butiricum</i> <i>CGSS</i>	Batch	Sacarosa	2.78	209
<i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>ATCC824</i>	En continuo	Glucosa	0.9	220
<i>Clostridium paraputrificum</i> <i>M-21</i>	Batch	GlcNAc	1.9	780
<i>Citrobacter sp.</i> <i>Y19</i>	Batch	Glucosa	2.49	Nd
<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Estresada HO-39</i>	Batch	Glucosa	1.0	380
<i>Bacillus coagulans</i> <i>estresada IIT-BT S1</i>	Batch	Glucosa	2.28	260
<i>Klebsiella oxitoca</i> <i>HP1</i>	Batch	Glucosa	1.0	87.5
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>WP3-5</i>	Batch	Acetato y butirato	Nd	41.1
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> <i>P4</i>	Batch	Glucosa	2.76	Nd
<i>Clostridium butiricum</i> <i>+ Rhodobacter M-19</i>	Fed batch	Almidón	6.6	Nd

2.5. Producción de hidrógeno por *Clostridium beijerinckii*

C. beijerinckii es un bacilo gram positivo, anaerobio estricto, que exhibe flagelos. El género *Clostridium* es capaz de usar un amplio espectro de fuentes de carbono, que se transportan en la célula por varios mecanismos. Un estudio con *Clostridium beijerinckii* Fanp3 comprobó que esta especie es capaz de asimilar varias fuentes de carbono lo que le da la posibilidad de ser utilizada para un proceso de tratamiento de aguas residuales y producción de hidrógeno (Tabla 4). En 2014 se evaluó el efecto de diferentes fuentes de carbono durante la producción de hidrogeno con *Clostridium beijerinckii* YA001, dando como resultado un aumento en el rendimiento de producción utilizando dextrina (An et al. 2014).

La fermentación de *Clostridium* presenta dos fases: fase acidogénica, en la que los productos principales son el acetato y butirato (junto con hidrógeno y CO₂) que es seguido por una fase solvetogénica, en la que algunos de los ácidos son reinsertados con la formación de butanol y acetona o isopropanol.

Tabla 4. Fuentes de carbono para *Clostridium beijerinckii* Fanp3 (Pan et al. 2008) .

Fuente de carbono	Producción potencial de Hidrógeno (mL/g-sustrato)	Producción máxima de Hidrógeno (mL/g-sustrato h⁻¹)
Glucosa	231.6	30.3
Fructosa	213.0	30.6
Sacarosa	274.7	24.8
Lactosa	133.6	11.4
Manosa	193.1	24.6
Galactosa	157.5	7.2
Dextrina	222.6	38.4
Celobiosa	256.5	30.8
Maltosa	243.1	24.6
Xilosa	188.5	13.8

Esta bacteria es reconocida en varios estudios por ser un microorganismo eficiente para la producción de hidrógeno. Su capacidad para asimilar una amplia gama de fuentes de carbono le da las características para poder desarrollar en un futuro celdas bioelectroquímicas, donde su principal objetivo sea aprovechar los recursos renovables disponibles mediante el cual se pueda dar un tratamiento de aguas residuales al mismo tiempo que se genera una fuente de energía.

2.6. Mediadores redox

Los mediadores redox son moléculas orgánicas que pueden ser reversiblemente oxidadas y reducidas, confiriéndoles la capacidad de servir como un transportador de electrones en múltiples reacciones redox. Algunas de las características de los mediadores redox son como aceptor final de electrones para la respiración microbiana; como acarreador de electrones entre un donador de electrones y un compuesto aceptor de electrones, ya sea en procesos químicos y/o microbiológicos; y como donador de electrones para la reducción microbiológica de aceptores de electrones más oxidados, impactando significativamente en la conversión redox y destino de distintos contaminantes orgánicos e inorgánicos (Alvarez et al. 2013).

2.6.1. Reducción de mediadores redox

Los mediadores redox tienen la característica principal de donar o recibir electrones según sea, cuando una molécula redox gana electrones esta a su vez puede transferirlos a otras moléculas e incluso ser utilizado como fuente de energía por ciertos microorganismos. Esto último permite llevar a cabo reacciones de manera más eficiente, tal como se describe en la siguiente sección (2.6.2). La forma de reducir estas moléculas puede ser química o biológica.

Para la reducción química se utiliza paladio soportado en alumina y gas hidrógeno el proceso tiene una duración de una hora, en la que se pone en contacto a la molécula redox con el hidrógeno y el paladio es el catalizador de la reacción (Ye et al. 2012).

La reducción biológica puede ser llevada a cabo por microorganismos anaerobios que son capaces de utilizar los mediadores redox como aceptores de electrones (Alvarez et al. 2013).

2.6.2. Mediadores redox como donadores de electrones en la producción de hidrógeno

La capacidad de los mediadores redox de actuar como fuente de energía para distintos microorganismos ha sido probada bajo distintos procesos ambientales. Entre estos, se destaca la reducción de perclorato (ClO_4^-), nitrato (NO_3^-), Nitrito (NO_2^-) y arsénico (As V) (Figura 1). Sin embargo, es escasa la información sobre el papel de los mediadores redox reducidos sobre microorganismos fermentadores. A la fecha, todos los reportes han sido elaborados por el Dr. Kevin T. Finneran et al. en el 2012. En uno de sus estudios se indica un aumento en los rendimientos de hidrógeno producidos por la bacteria *C. beijerinckii* usando antraquinona-2,6-disulfonato (A₂QDS) reducida como donador de electrones. Se utilizaron diferentes fuentes de carbono como, glucosa, xilosa y celobiosa y distintas concentraciones (100, 250 y 500 μ M) de AQDS reducida (AH₂QDS) para estudiar su efecto sobre el crecimiento de *C. beijerinckii* y la producción de hidrógeno. Los resultados obtenidos indican que a mayor concentración de AH₂QDS es mayor la producción de hidrógeno. Se menciona que no se pueden usar concentraciones muy elevadas de A₂QDS ya que podrían tener algún efecto toxico sobre el microorganismo, en este estudio se utilizó una concentración de hasta 2mM sin efecto en la población celular (Ye et al. 2013).

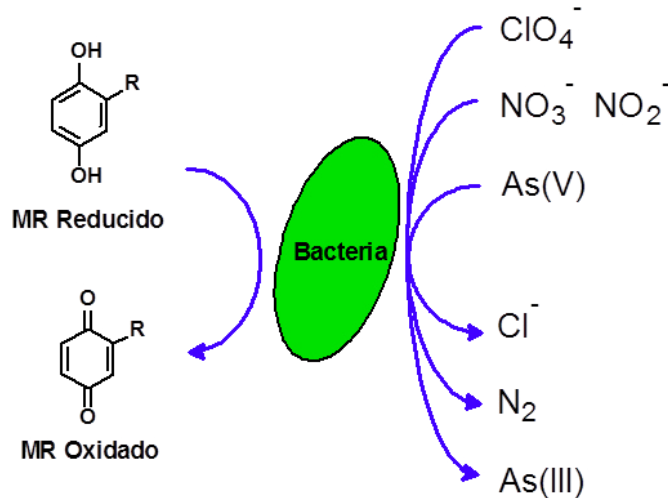


Figura 1. Mediadores redox reducidos en contacto con bacterias

2.7. Inmovilización de mediadores redox

El uso de mediadores redox como coadyuvantes para mejorar algunos procesos como son la reducción de contaminantes en efluentes de aguas residuales tiene la desventaja de una alta solubilidad por lo que no permite la reutilización. La inmovilización de mediadores redox ofrece para estos procesos la posibilidad de reutilizar estas moléculas y con esto hacer procesos más económicos, pero igual de eficientes.

La inmovilización de mediadores redox representa una tarea sumamente importante que debe realizarse antes de intentar aplicarlas a escala real (Alvarez et al. 2013). Para lograr la inmovilización se han hecho algunas investigaciones sobre los materiales disponibles para esta tarea, así como también la viabilidad de utilizarlo a gran escala. Estos materiales varían en costo y eficiencia, realizándose trabajos con

resinas de intercambio iónico, hidróxido de aluminio, espuma de poliuretano, alginato de calcio, polipirrol, fibras de carbón, grafito, carbón activado, entre otras.

2.8. Carbón activado

El carbón activado es un material que posee una estructura cristalina reticular similar a la del grafito sólo que el orden en la estructura del carbón activado es menos perfecto y poroso (Anón 2007).

Posee la capacidad de adsorber componentes que se encuentran disueltos en el líquido que está en contacto con el carbón. Las propiedades de cada carbón activado dependen mucho de la materia prima de la que provengan y de los procesos a los cuales se sometió para ser activado. Por lo cual lo hacen un material factible para su uso en los procesos de adsorción de un mediador redox.

En la literatura se reporta que el uso de carbón activado con mediadores redox mejora los procesos de tratamiento de contaminantes, sin embargo, estos procesos siempre han sido con el uso de mediadores como receptores de electrones, no como donadores (Alvarez et al. 2013).

2.9. Mediadores redox inmovilizados como donadores de electrones

El buen funcionamiento de los mediadores redox inmovilizados en carbón activado como receptores de electrones en los procesos reductivos, sugiere que el material en el que están adsorbidos no cambia las propiedades de la molécula para ser

oxidada y reducida con facilidad. Estos antecedentes, junto con los avances reportados por el Dr. Finneran indican que es hipotéticamente posible utilizar mediadores redox inmovilizados en carbón activado y previamente reducidos como donadores de electrones para mejorar el proceso de producción de hidrógeno.

Este campo de investigación en el que los mediadores redox están soportadas en un material y que su función sea la donación de electrones, ha sido estudiada para otros procesos de biorremediación. Sin embargo, para los procesos de producción de hidrógeno aún no existen reportes previos.

Por tal motivo se propone que el carbón activado contenga un mediador redox, que a su vez esté en su forma reducida, y en ese estado sea capaz de donar electrones al organismo productor de hidrogeno, en este caso *C. beijerinckii*, al tener los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo con la ayuda del electrón donado por las moléculas redox será capaz de aumentar la velocidad y cantidad de hidrógeno producido en su metabolismo (Figura 2).

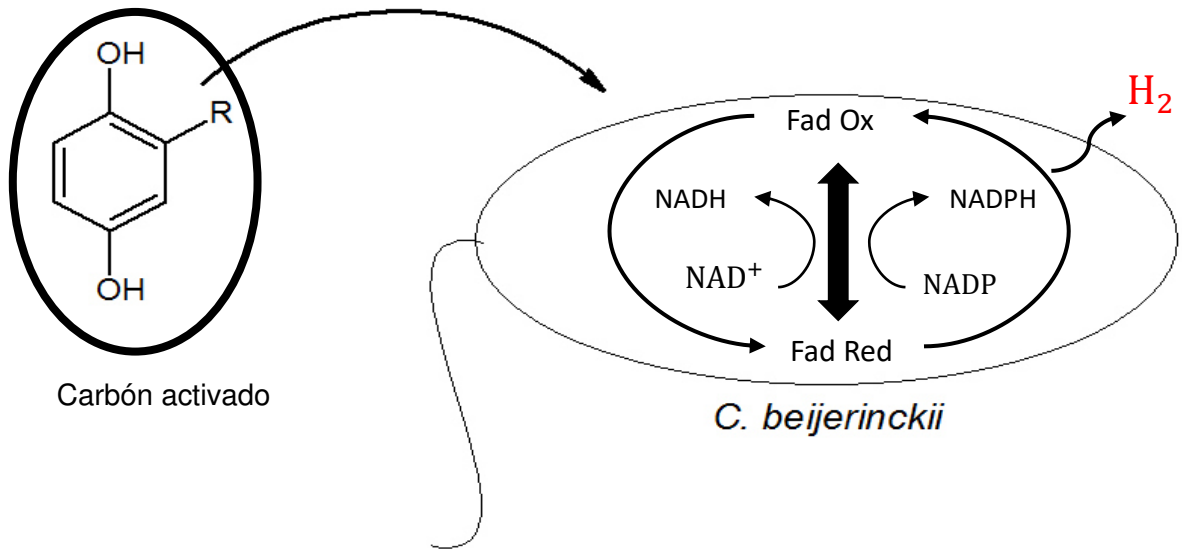


Figura 2. Mecanismo propuesto para la inmovilización

3. JUSTIFICACION

La fuerte demanda energética, principalmente combustibles fósiles, ha ocasionado un aumento en los niveles de contaminación, esto propicia la, investigación, búsqueda y desarrollo de nuevas formas para obtener energías menos agresivas para el medio ambiente.

Es por eso que el hidrógeno es una de las opciones más viables, ya que como combustible puede cubrir las demandas energéticas y también es un producto amigable con el medio ambiente.

La producción biológica de hidrógeno permite obtener una energía renovable y sustentable. Por lo cual es necesario el desarrollo e investigación para mejorar estos procesos.

4. HIPÓTESIS

La aplicación de mediadores redox (solubles e inmovilizados) como donadores de electrones aumenta la tasa de producción de hidrógeno por medio del metabolismo de *Clostridium beijerinckii*, en comparación con los cultivos microbianos sin mediador redox.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General.

Evaluar el efecto de diferentes mediadores redox como donadores de electrones solubles e inmovilizados en carbón activado sobre la producción de hidrógeno por *C. beijerinckii*.

5.2. Objetivos Específicos.

- Identificar cuál mediador redox (antraquinona-2,6-disulfonato (A₂QDS), antraquinona-2-sulfonato (AQS), riboflavina y lawsona) en forma soluble, es el más apropiado para mejorar la producción de hidrógeno.
- Determinar la capacidad de adsorción de los mediadores redox en carbón activado granular.
- Inmovilizar el mediador redox en carbón activado mediante adsorción.
- Evaluar la capacidad del mediador redox inmovilizado para actuar como un donador de electrones durante la producción de hidrógeno por *Clostridium beijerinckii*.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Evaluación del efecto de mediadores redox solubles sobre la producción de hidrógeno.

Esta etapa se llevó a cabo en 168 Rich Laboratory, 312 Biosystems Research Complex en Clemson University, bajo la dirección del Dr. Kevin T. Finneran.

6.1.1. Reactivos e inóculo

Los compuestos químicos utilizados en este experimento fueron de grado reactivo, los cuales fueron adquiridos en CTR y Sigma Aldrich y fueron usados para preparar el medio de cultivo y los mediadores redox.

Se utilizó como microorganismo productor de hidrógeno a *C. beijerinckii* que fue donada por el Dr. Kevin T. Finneran de la Universidad de Clemson, Carolina del Sur, el cual es almacenado en forma de esporas que fueron revitalizadas en medio TYG (por sus componentes en inglés triptona 3 g/L, extracto de levadura 2 g/L y glucosa 1 g/L).

El carbón activado usado para la inmovilización de los mediadores redox fue de origen mineral, con un diámetro de 0.5–2 mm y se obtuvo de CLARIMEX.

6.1.2. Medio cultivo

El medio de cultivo utilizado para llevar a cabo las cinéticas de producción de hidrógeno así como de la conservación del cultivo fue el medio utilizado por Ye et al. (2012), el cual está constituido de tres soluciones. Solución 1 (g/L); fosfato monobásico de potasio (0.5), fosfato di básico de potasio (0.5) y sulfato de amonio (2.0). Solución 2 (g/L); Sulfato de magnesio (20), sulfato de manganeso (1) y sulfato férrico (1). Solución 3 (g/L); ácido para-aminobenzóico (1), biotina (0.1) y tiamina (1). Estas soluciones se mezclan en una proporción 100:1:1 respectivamente.

Posterior a la preparación del medio, se inicia con el proceso de someter a condiciones anaerobias. Por lo que se usaron botellas serológicas de 160 mL las cuales se llenaron a un volumen para completar a 100 mL, ya con todos los componentes. El líquido se burbujó con gas de N_2 puro por 5 minutos. Después de este tiempo se desplazó el oxígeno del espacio de cabeza con el mismo gas por 1 minuto.

Cuando las botellas han sido selladas para conservar las condiciones anaerobias se procede a esterilizar la solución 1, esta solución se esterilizó en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Después de enfriar las botellas se procedió a añadir 1 mL de las soluciones 2 y 3, estas soluciones fueron esterilizadas al momento de ser agregadas a la botella serológica por medio de filtración, los filtros fueron previamente esterilizados en autoclave. Posteriormente y de la misma manera que con las soluciones 2 y 3 se agregó la fuente de carbono que en este caso fue la xilosa en una concentración de 2 g/L para cada uno de los cultivos.

6.1.3. Reducción química de moléculas redox

La reducción de mediadores redox se llevó a cabo siguiendo los procedimientos efectuados por Ye et al. 2013, la cual es una reducción química de los compuestos. Primeramente, se preparó una solución madre con una concentración de 5 mM de cada uno de los mediadores redox (A₂QDS, AQS, riboflavina y lawsona).

Se depositó en botellas serológicas y se procedió a llevar a cabo la reducción utilizando paladio soportado en alúmina y una mezcla de H₂:CO₂ gaseoso en una proporción 80:20. (Figura 3) Al terminar este proceso se dejó incubando toda la noche a 37 °C. Posteriormente se esterilizaron por medio de filtración antes de ponerse en contacto con el medio de cultivo.

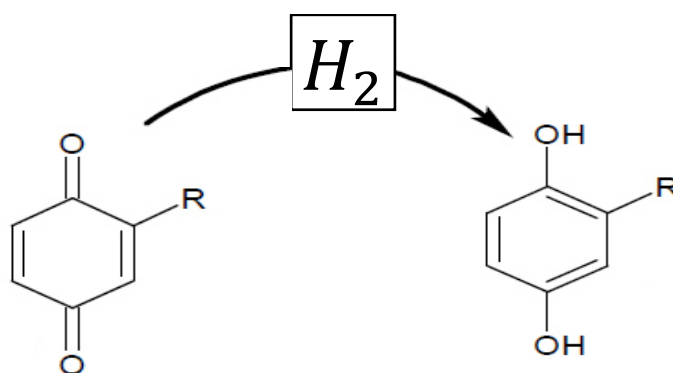


Figura 3. Mecanismo de reducción de mediadores redox

6.1.4. Cinéticas de producción de hidrógeno con mediadores redox solubles en su forma reducida

Las cinéticas se llevaron a cabo en un volumen total de 100 mL, utilizando un inóculo de *C. beijerinckii* al 6% (v/v) con una densidad óptica de 0,810, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de mediador 100, 250 y 500 μM . Todas las pruebas se llevaron por duplicado.

Además, se prepararon los controles sin mediador redox, con el mediador oxidado y estéril. Se midió la producción de hidrógeno durante 60 h, en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-8A, con una columna de acero inoxidable, con Detector Térmico de Conductividad, la temperatura del detector y el horno fue de 150°C y 60 °C, respectivamente, se utilizó como gas acarreador nitrógeno de alta pureza.

6.2. Inmovilización de mediadores redox en carbón activado y su contribución en la producción de hidrógeno

Esta parte del proyecto se realizó en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia.

6.2.1. Isotermas de adsorción

Para adsorber los mediadores redox se utilizó carbón activado granular de origen mineral. Para llevar a cabo las isotermas se emplearon diferentes tamaños de gránulo del carbón 0.5, 1.0 y 2.0 mm. Para adsorber AQS, A₂QDS y riboflavina se modificó previamente el carbón con una solución de HCl y ZnCl₂.

Se prepararon soluciones de los mediadores redox oxidados a diferentes concentraciones (50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L) de A₂QDS, AQS, lawsona y riboflavina. Las isotermas de adsorción se realizaron con 30 mg de carbón y 30 ml de la solución de mediador. Los tubos se mantuvieron en agitación y temperatura constantes (150 rpm y 37°C) durante 24 h. Se midió la concentración de la solución al inicio y al final del tratamiento por medio de densidad óptica en un espectrómetro UV-VIS Spectronic Genesys 5 a las longitudes de onda correspondientes a cada compuesto (A₂QDS 325 nm, AQS 330 nm, riboflavina 450 nm, lawsona 340 nm). Las concentraciones iniciales y finales permitieron calcular la capacidad de adsorción de cada mediador sobre el carbón activado mediante un balance de masa (Ecuación 1).

$$Q = \frac{(C_i - C_e)V}{m}$$

Donde

Q = Capacidad de adsorción

C_i = Concentración inicial de la solución

C_e = Concentración en el equilibrio de la solución

V = Volumen de la solución

m = masa

6.2.2. Inmovilización de mediadores redox

Para llevar a cabo la inmovilización de los mediadores redox, primeramente, se hizo un cálculo basándose en los resultados obtenidos de las isothermas de adsorción, en las que se determinó la concentración máxima de adsorción. En base a esto se colocaron 3 g de carbón de cada tamaño para ponerlo en contacto con una solución concentrada del mediador redox, esta concentración dependió totalmente de la concentración a la que se haya obtenido el valor máximo de adsorción.

6.2.3. Reducción de moléculas redox inmovilizados

La reducción de los mediadores redox inmovilizados se llevó a cabo de manera similar al procedimiento descrito en la sección 6.1.3, la diferencia es que esta vez se colocó en botellas serológicas un buffer de fosfatos y paladio soportado en alumina posteriormente se adicionó el carbón activado con el mediador inmovilizado. Se burbujeó con hidrógeno puro durante una hora y se desplazó el oxígeno presente en las botellas con este mismo gas. Se mantuvo en agitación a 150 rpm y temperatura de 37 °C por 48 horas, esto para asegurar la reducción total del mediador inmovilizado.

6.2.4. Cinéticas de producción de hidrógeno con el mediador redox inmovilizado en su forma reducida

Las cinéticas con el mediador inmovilizado en su forma reducida se llevaron a cabo con medio P2 a un volumen total de 75 mL, se usó un inóculo de *Clostridium beijerinckii* al 6% (v/v) y se añadió los gramos de carbón de activado correspondiente a una concentración 1 mM del mediador, por lo que cada prueba tenía diferente cantidad de carbón en las Tablas 5 se encuentran los pesos correspondientes a cada tratamiento y los controles que se llevaron a cabo, todo el procedimiento se realizó en condiciones anaerobias para evitar la oxidación del mediador y la muerte de los cultivos bacterianos.

Se usaron tres tamaños diferentes de carbón activado (0.5, 1.0 y 2.0 mm) con dos repeticiones de cada prueba, se probaron dos diferentes mediadores inmovilizados en el carbón AQS y AQDS.

Tabla 5. Condiciones de cinética con los mediadores inmovilizados

Mediador redox reducido inmovilizado	Carbón activado (g)	Tamaño de gránulo (mm)
AQS (1 mM)	0.094	0.5
	0.123	1.0
	0.231	2.0
AQDS (1 mM)	0.150	0.5
	0.226	1.0
	0.300	2.0
Carbón activado reducido	0.150	0.5
	0.226	1.0
	0.300	2.0
Carbón activado oxidado	0.150	0.5
Sin carbón activado	0	

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Efecto de los mediadores redox reducidos sobre la producción de hidrógeno en forma soluble

Los mediadores redox utilizados en su forma reducida para evaluar su capacidad como donadores de electrones fueron AQDS, AQS, riboflavina y lawsona. Los controles pertinentes se llevaron en su forma oxidada.

Los cultivos en donde se observaron resultados más altos de producción de hidrógeno fueron adicionados con riboflavina. En la Figura 4 se puede observar que la producción de hidrógeno aumenta conforme el cultivo llega a las primeras 48 h. También se puede notar que a mayor concentración del mediador redox en su forma reducida mayor es la cantidad de gas producida.

La capacidad de la riboflavina como molécula redox ha sido estudiada por varios autores, ya que presenta gran capacidad de transferencia de electrones (Van der Zee & Cervantes 2009). Sin embargo, estos reportes de uso de la riboflavina como mediador redox ha sido solo en su forma oxidada, es decir en los procesos en los que se ha usado solo es empleada como aceptor de electrones, no como donador. Algunos autores la comparan con la eficiencia que tiene el A₂QDS, el cual es muy usado en los procesos de reducción de contaminantes.

En cuanto a producción de hidrógeno, los cultivos en presencia de riboflavina alcanzaron resultados altos. En este estudio se obtuvieron cantidades de hasta 5636.86 μMol por botella de 100 mL de cultivo celular a una densidad óptica de 0.81

y en comparación con los cultivos celulares sin riboflavina fue 11.5 veces más eficiente la producción de hidrógeno.

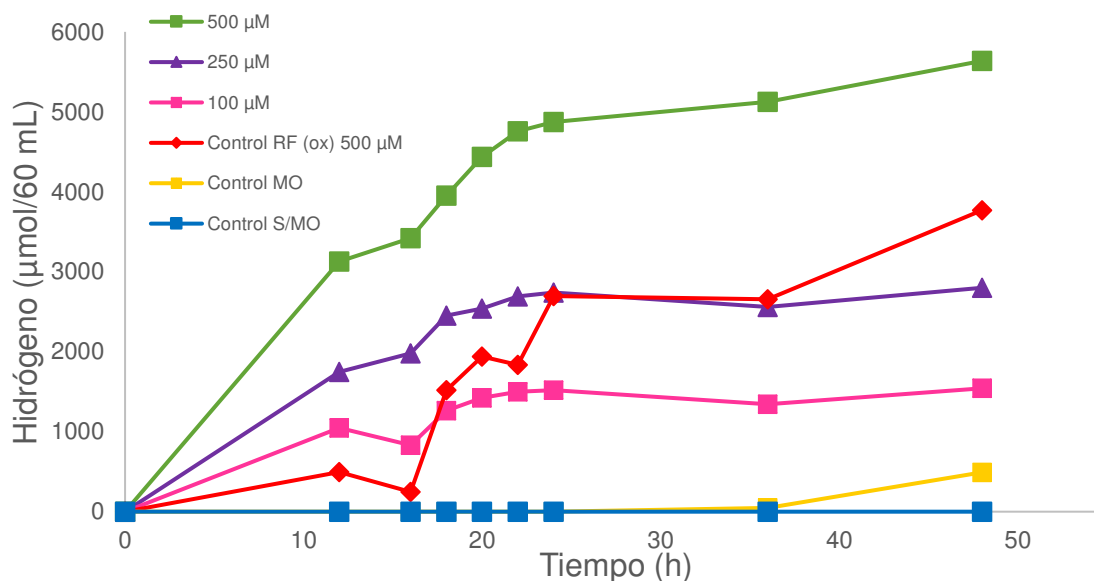


Figura 4. Producción de hidrógeno con *C. beijerinckii* en presencia de riboflavina

Otro mediador utilizado fue el AH₂QDS (figura 5), con el cual se obtuvieron resultados de hasta 2235.9 µmol, lo que es 2.5 veces menos que los resultados obtenidos con la riboflavina. Se observó el mismo efecto que se presentó en los resultados de los cultivos con riboflavina a mayor concentración mayor producción de hidrógeno. La producción de hidrógeno en los cultivos con AH₂QDS (500 µM) fue hasta 4.5 veces mayor en comparación de los cultivos en ausencia de molécula.

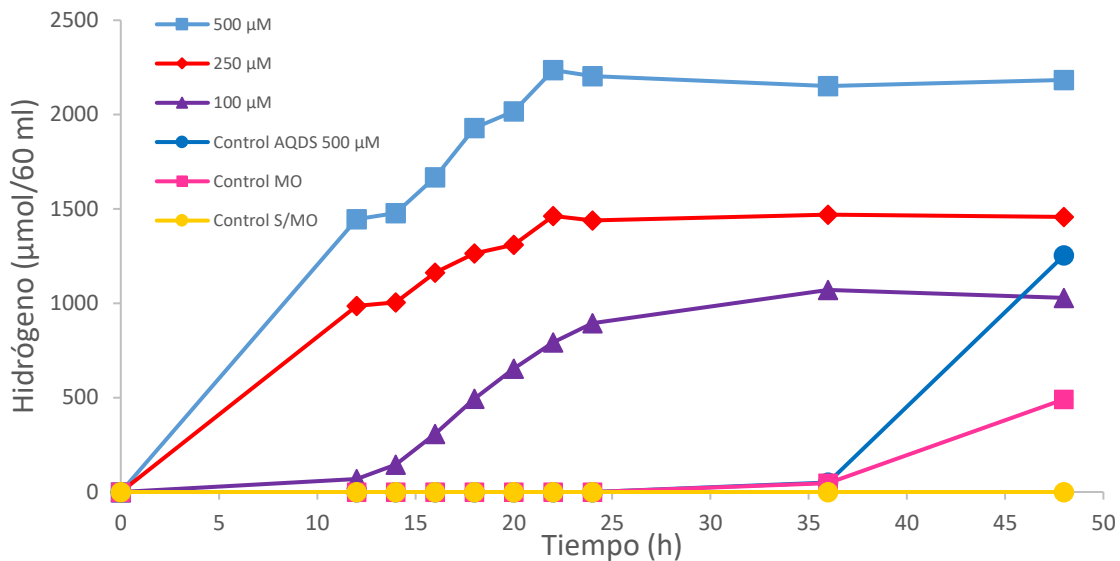


Figura 5. Producción de hidrógeno por *C. beijerinckii* en presencia de AH₂QDS

En los cultivos en los que se puso en contacto al microorganismo con AH₂QDS (Figura 6), tuvo un efecto menor en la producción de hidrógeno en relación con la riboflavina y el AH₂QDS. Se observa un periodo de adaptación más largo en comparación a riboflavina y AH₂QDS. En este caso se llegó a un punto máximo de acumulación de hidrógeno en casi las 50 h de incubación con una cantidad de 265.38 µmol, estos resultados son bajos comparados con los obtenidos por riboflavina y por AH₂QDS ya que son 21.4 veces y 8.4 veces menores respectivamente.

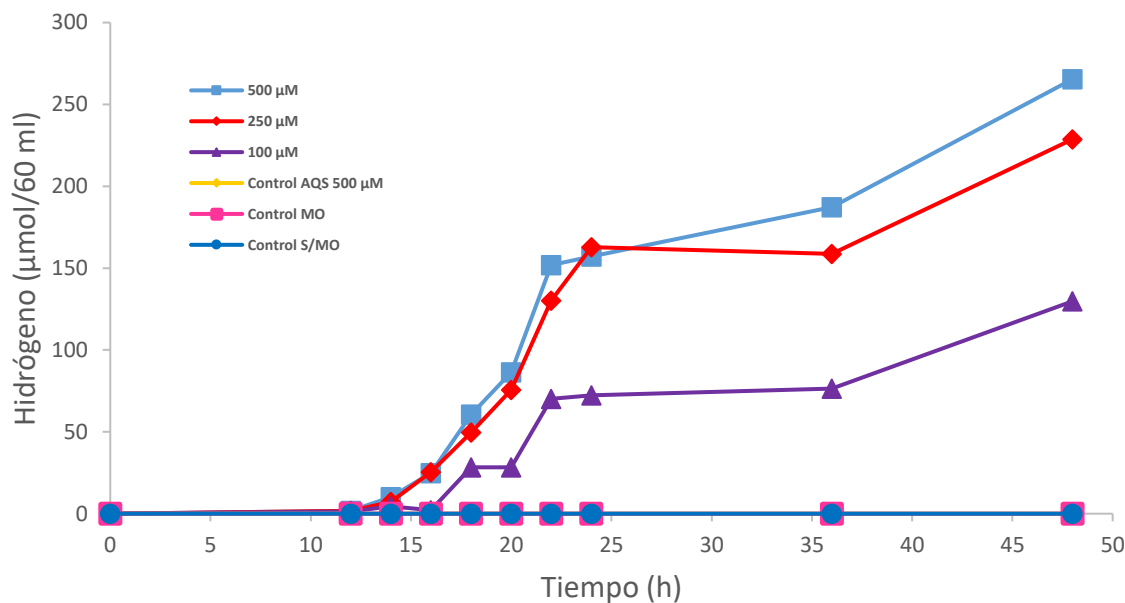


Figura 6. Producción de hidrógeno por *C. beijerinckii* en presencia de AHQS

Los resultados encontrados en este estudio se asemejan a los encontrados por Ye et al. en 2012 en donde se probaron diferentes fuentes de carbono y AH₂QDS como mediador redox en distintas concentraciones.

Las condiciones que se manejaron en el presente estudio y en el de Ye et al. 2012 únicamente difieren en el tamaño de las incubaciones, en ese estudio usaron un volumen total de 10 mL, extrapolando los datos obtenidos en ese estudio con los obtenidos en el presente proyecto se muestra un incremento de 1.9 veces en el caso de la riboflavina.

En los resultados obtenidos para AH₂QDS en los que la diferencia entre ambos casos solo es de volumen de las incubaciones, se obtuvo un aumento de 0.7 veces, lo que en realidad podría deberse solamente al aumento de volumen utilizado en el presente estudio.

En cuanto a los resultados con AQS en comparación con el estudio del 2012 al igual que con los otros dos mediadores ya mencionados se obtuvieron resultados casi idénticos. Ya que la diferencia entre el presente estudio y el de Ye et al. es de 20 μmol .

7.2. Isotermas de adsorción

La capacidad de adsorción más alta de riboflavina se obtuvo con el carbón granular de 0.5 mm, con un valor de 94.62 mg/g, que en comparación con los otros tamaños de carbón granular activado fue 1.5 veces más que la capacidad de adsorción presentada por el tamaño de carbón de 1 mm y en el caso del carbón activado de 2 mm fue de 1.64 veces.

En lo que respecta a las isotermas de adsorción hechas para el A₂QDS se puede observar que los mejores resultados, al igual que en la riboflavina se presentaron en el tamaño más pequeño de carbón activado granular, sin embargo, la capacidad máxima de adsorción del A₂QDS fue mayor que la de riboflavina, con un valor de 208.46 mg/g para el granulo de tamaño de 0.5 mm. En cuanto a los otros dos tamaños, 1 y 2 mm se obtuvieron resultados menores, teniendo valores de 161.90 mg/g y 103.17 mg/g respectivamente. La capacidad máxima de adsorción para este compuesto fue mejor que la del compuesto anterior ya que duplicó su capacidad adsorbente, esto se debe a la afinidad del compuesto A₂QDS con los grupos funcionales disponibles en carbón activado granular. Además, el tamaño de la molécula influye en su paso a través del gránulo y poder alcanzar capas más profundas para una mayor adsorción.

Las isothermas de adsorción realizadas para la solución con AQS fueron aún más eficientes que en los dos casos anteriores, ya que se alcanzó una capacidad máxima de adsorción de hasta 246.76 mg/g, al igual que en los casos anteriores se presentan mejores resultados en el tamaño de carbón granular más pequeño.

Los resultados obtenidos para los otros dos tamaños 1 y 2 mm alcanzan valores de hasta 188.42 mg/g y 100.71 mg/g respectivamente, valores que se asemejan mucho a los obtenidos en el caso de A₂QDS en estos mismos tamaños de gránulo. Esta similitud en los resultados se debe a que estas dos moléculas son parecidas, difieren en su tamaño, pero sus grupos funcionales son los mismos sólo que en diferentes proporciones.

En el caso de la lawsona los resultados que se obtuvieron de las isothermas de adsorción fueron bajos comparados con A₂QDS y AQS, ya que solo se llegó a una capacidad máxima de adsorción de 87.57 mg/g y al igual que en los casos anteriores los resultados más altos pertenecen al tamaño de carbón más pequeño.

En la figura 7 se puede observar que los mejores resultados se obtuvieron en el tamaño de gránulo de 0.5 mm en todos los casos, razón por la cual las inmobilizaciones se hicieron en este tamaño de carbón.

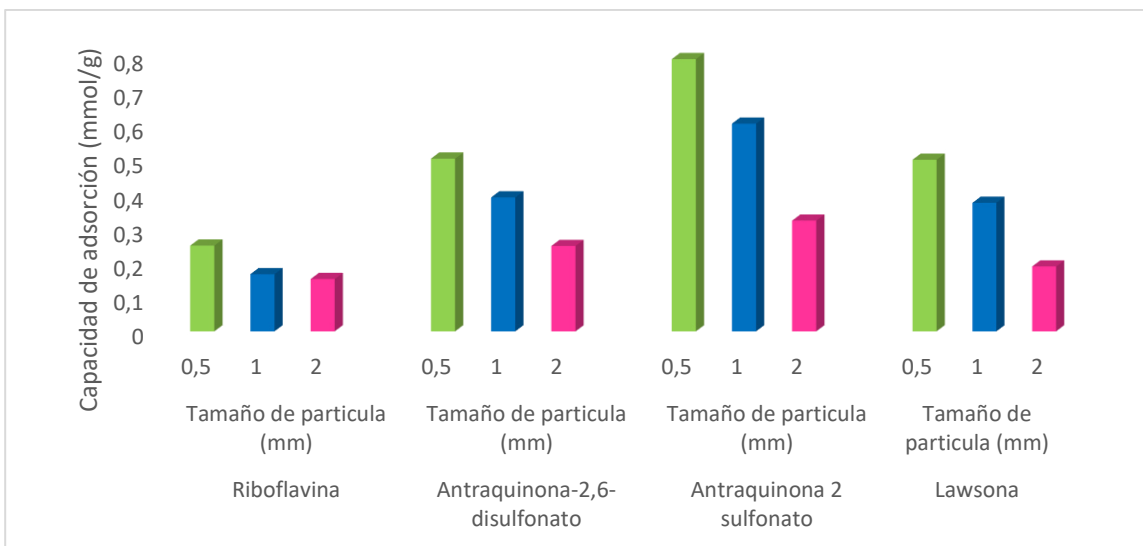


Figura 7. Capacidad de adsorción en carbón activado de diferentes tamaños

A continuación, se muestran los resultados de las capacidades de adsorción a detalle de cada uno de los mediadores en el tamaño de 0.5 (figura 8), como se observa los resultados para AQS y A₂QDS son los que se adsorben mejor en comparación con riboflavina y lawsona. Las isothermas se ajustaron al modelo Langmuir.

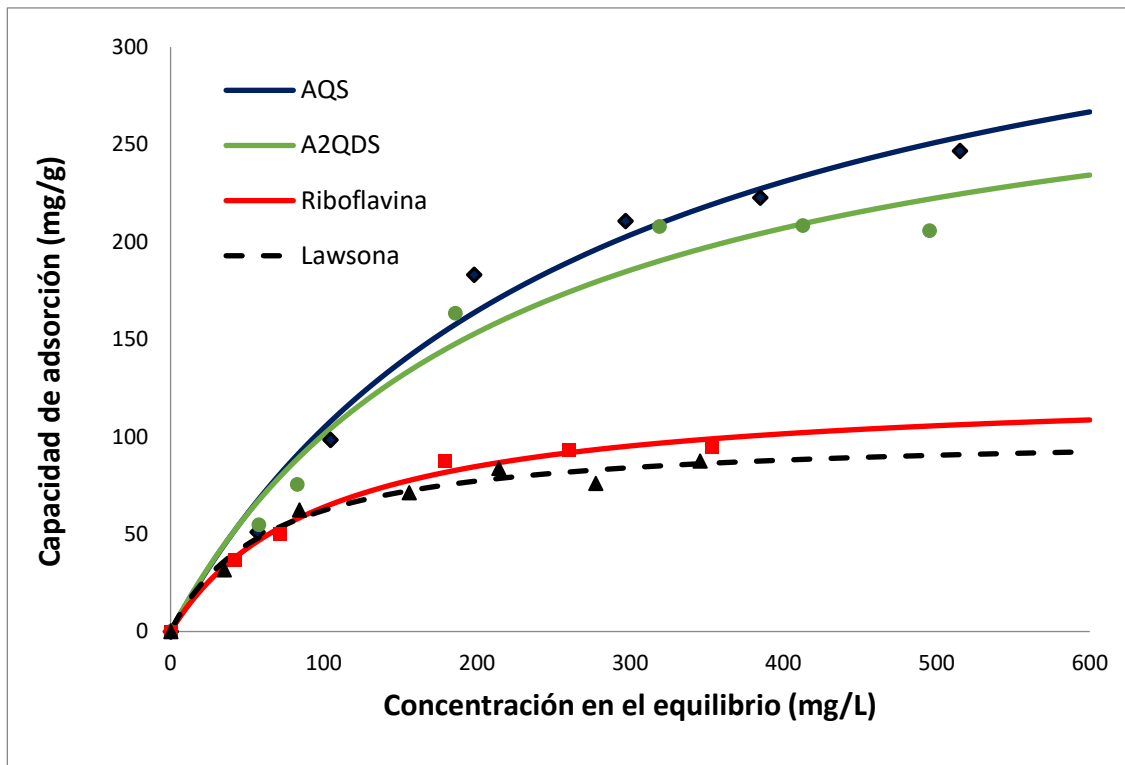


Figura 8. Capacidad de adsorción en carbón activado tamaño 0.5 mm. Los símbolos indican los datos experimentales y las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Langmuir

En un estudio previo en el que se hicieron isotermas de adsorción para A₂QDS se encontró una capacidad máxima de adsorción menor a la obtenida en el presente estudio ya que solo se obtuvieron valores alrededor de los 80 mg/g de adsorción (Olivo; García 2015) lo que es un poco más bajo que lo encontrado en el presente estudio.

7.3. Inmovilización de los mediadores redox

En base a la capacidad de adsorción que presentó cada uno de los mediadores redox, así como en el tamaño de carbón, las inmovilizaciones se hicieron en el tamaño de carbón de 0.5 mm para AQS y A₂QDS, ya que fueron los mediadores con mejores resultados en las isothermas de adsorción.

Posterior a someter los mediadores a la inmovilización se procedió a hacer ciclos de lavado para ver la cantidad de mediador que se desorbe en cada uno de los casos y la efectividad con la que fue inmovilizado.

En la figura 9 se observa que la cantidad de desorción de AQS inmovilizado es de 0.001 μ M por cada lavado, lo que indica que la inmovilización se llevó a cabo con éxito. Las cantidades desorbidas en cada ciclo de lavado no influyen en los procedimientos de producción de hidrógeno ya que la porción de mediador redox que se solubiliza no es suficiente para afectar el metabolismo de *C. beijerinckii*.

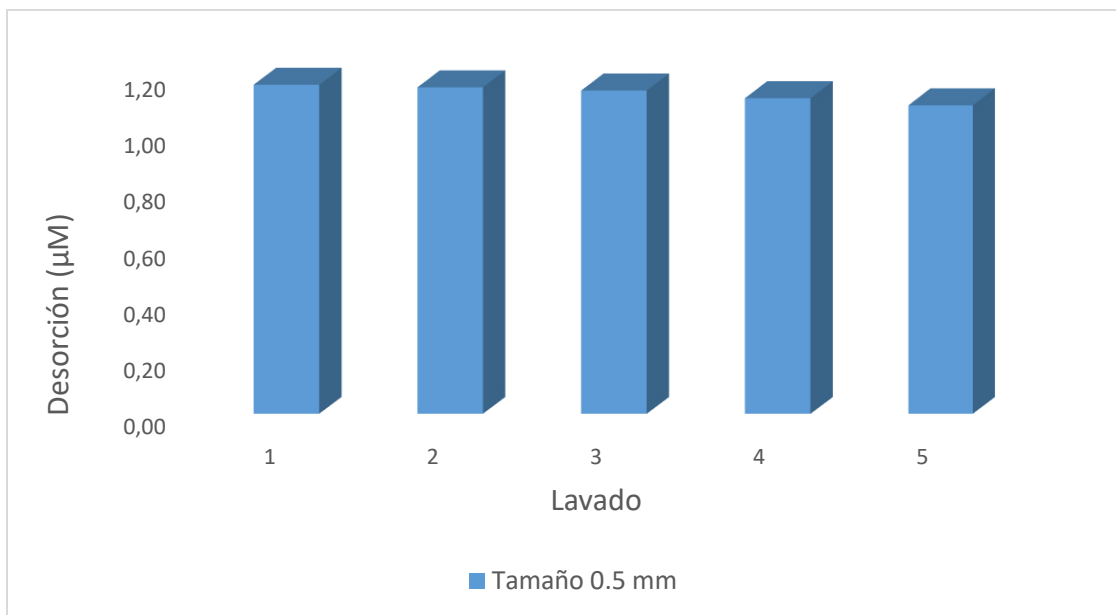


Figura 9. Capacidad de desorción después de ciclos de lavado para AQS

Para el caso de AQDS se puede observar (Figura 10) que la desorción es igual que en el caso anterior, por lo que los dos mediadores se inmovilizaron con efectividad. Estos resultados de desorción de los mediadores inmovilizados indican que cualquiera de los dos mediadores inmovilizados puede ser usado en las pruebas de producción de hidrógeno con mediadores redox inmovilizados.

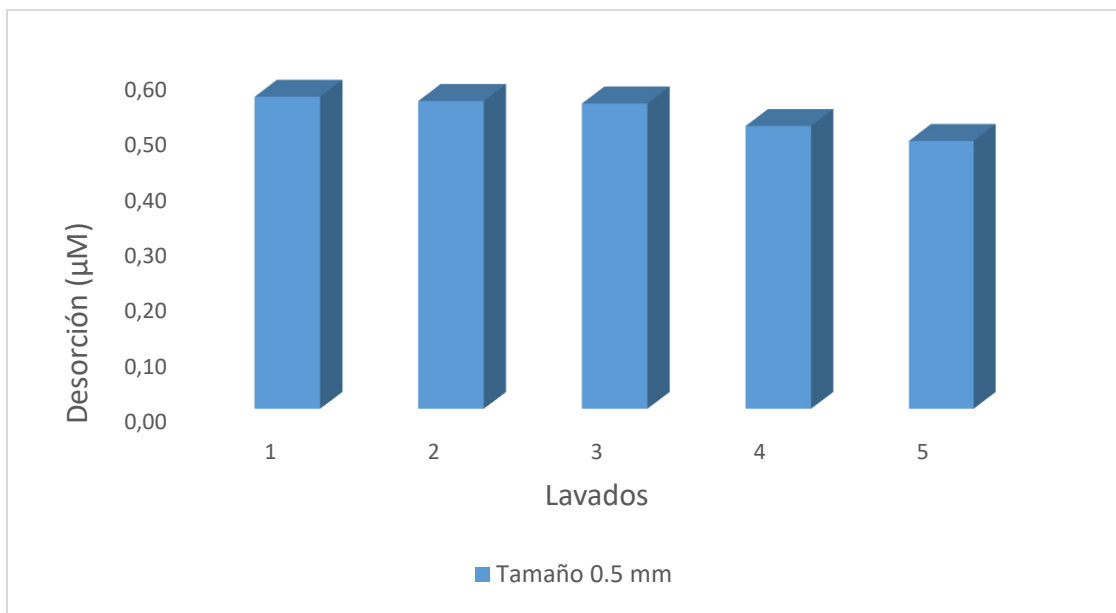


Figura 10. Capacidad de desorción después de ciclos de lavado para A₂QDS

En el presente estudio como ya se mencionó, la desorción entre ambas quinonas fue la misma por cada lavado y comparando este resultado con los obtenidos por Del Ángel & Alvarez 2015, en donde encontró una desorción de 0.2 µM por cada lavado en el presente trabajo solo se encontró una desorción de 0.1 µM por cada lavado, por lo que la inmovilización en este caso fue más efectiva.

7.4. Efecto de los mediadores redox reducidos inmovilizados sobre la producción de hidrógeno

Los mediadores redox inmovilizados que se utilizaron para las pruebas del efecto sobre producción de hidrógeno fueron dos, AQS y A₂QDS ya que riboflavina y lawsona fueron descartados por su baja capacidad de adsorción en el carbón activado.

El efecto que tuvo AQS inmovilizado en su forma reducida sobre la producción de hidrógeno con *C. beijerinckii* se muestran en la Figura 11, en la cual se puede observar que el carbón que soporta el mediador redox produce un aumento de 1.3 veces en la producción de hidrógeno en comparación con los cultivos que sólo estuvieron en contacto con el carbón activado tanto reducido como oxidado. Los resultados indican que existe un aumento de 1.6 veces con el carbón activado con mediador, en comparación a los cultivos sin carbón y sin mediador.

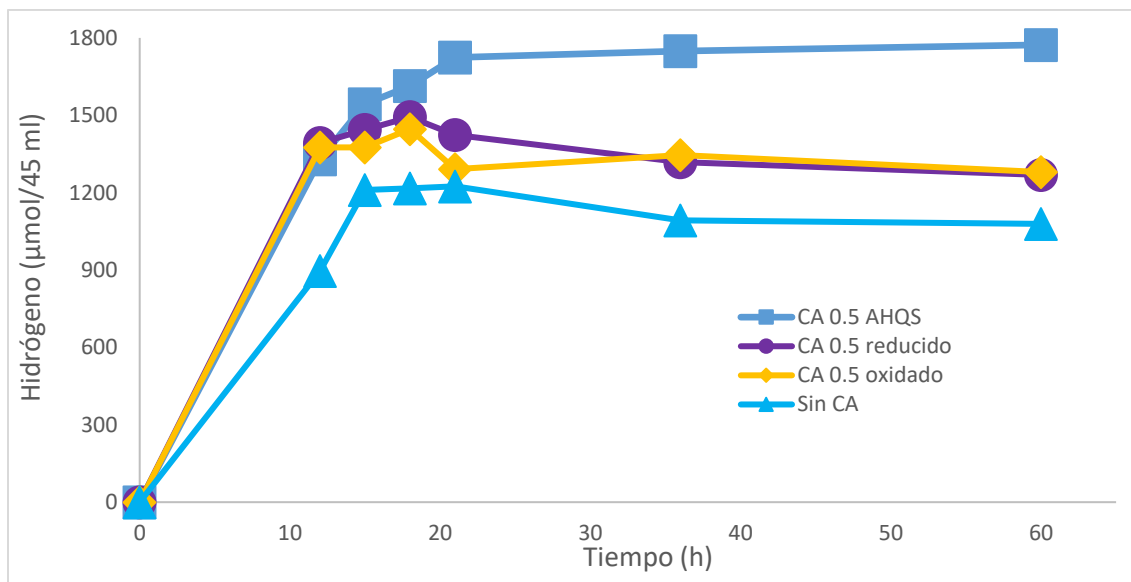


Figura 11. Producción de hidrógeno por *C. beijerinckii* en presencia de AHQS inmovilizado

El efecto de los cultivos en contacto con AH₂QDS inmovilizado se pueden observar en la figura 12, en donde se puede notar que al igual que en el caso de AQS hay un incremento en comparación con los cultivos que solo tienen carbón reducido, pero sin mediador y carbón oxidado sin mediador.

En el aumento en comparación con los cultivos puros, que no fueron sometidos a un contacto con carbón activado en cualquiera de sus formas (oxidado o reducido) se puede observar que el aumento que se presentó fue de 1.6 veces igual que en el caso de AQS. En ambos casos se observa el mismo incremento ya que la concentración de mediador fue la misma por lo que ambos mediadores tienen efectos muy similares sobre la producción de hidrógeno en su forma inmovilizada.

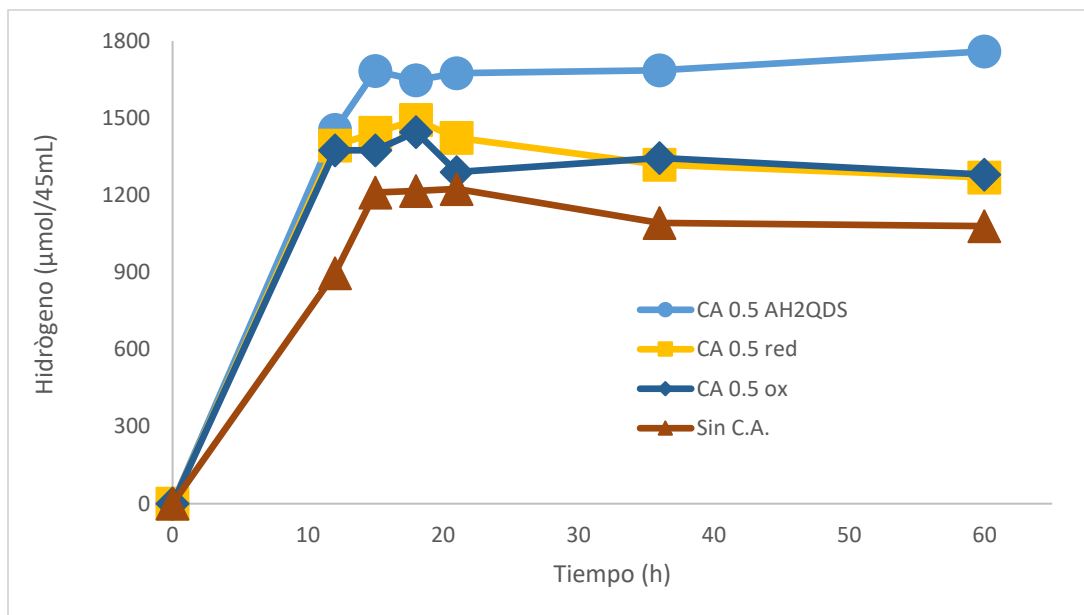


Figura 12. Producción de hidrógeno por *C. beijerinckii* en presencia de AH₂QDS inmovilizado

La inmovilización de los mediadores redox confiere ventajas a los procesos que han mejorado con la influencia de estas moléculas, ya que al estar soportados en una matriz solida hace los procesos más eficientes y económicos (Alvarez et al. 2013).

En este trabajo se propuso la inmovilización para un proceso en el cual el mediador redox soportado en una matriz sólida como donador de electrones al microorganismo para aumentar su metabolismo. La funcionalidad de este proceso se menciona en el libro *Microbial Electrochemical and Fuel Cells* (Scott, K. & Hao Yu, E. 2016) donde se hace un análisis de las funciones que puede tener un donador/aceptor de electrones como lo son los mediadores redox soportados en un material sólido, así como de los microorganismos que son capaces de llevar a cabo estos procesos. En este libro hace referencia de las posibles aplicaciones de tener un material que ayude en el intercambio electrónico en los procesos de celdas

bioelectroquímicas para la producción tanto de hidrógeno como de metano. Sin embargo, en esta publicación mencionan el proceso de donar electrones a un microorganismo para un proceso de producción energética como una teoría para el cual falta investigación. Es por eso que la importancia de que en estos resultados haya un efecto positivo en los resultados marca la pauta para profundizar en la investigación y experimentación en este proceso de donadores/aceptores de electrones soportados en una matriz sólida.

8. Conclusiones

Las cinéticas de producción de hidrógeno demuestran claramente que existe un aumento en la concentración de hidrógeno cuando *C. beijerinckii* es expuesta a distintos mediadores redox reducidos.

El mediador redox más efectivo fue la riboflavina con resultados hasta de 11.47 veces más que en comparación con el cultivo sin mediadores.

En los resultados con AHQS y AH₂QDS se observó un aumento de hasta 0.5 y 4.44 veces más que en los cultivos sin mediador

El carbón activado tiene una capacidad máxima de adsorción de hasta 250 mg/g en el caso del AQS, con resultados similares para A₂QDS. Sin embargo, se obtuvieron valores menores para riboflavina y lawsona menores a 100 mg/g

La capacidad máxima de adsorción se presentó en el gránulo de carbón activado con tamaño de 0,5 mm en todos los casos.

Las cinéticas de producción de hidrógeno con AH₂QDS y AHQS inmovilizados en carbón activado granular muestra un aumento en comparación con las incubaciones sin el mediador cuando el tamaño de carbón es de 0.5 mm

9. Bibliografía

Alvarez, L.H. et al., 2013. Avances en la Aplicación de Mediadores Redox Durante la (Bio) Transformación de Contaminantes Recalcitrantes Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias , Instituto Tecnológico de División de Ciencias Ambientales , Instituto Potosino de Invest. , 17(3), pp.43–65.

An, D. et al., 2014. Characterization on hydrogen production performance of a newly isolated *Clostridium beijerinckii* YA001 using xylose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(35), pp.19928–19936. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.014>.

Del Ángel, Y. & Alvarez, L., 2015. BIOTRANSFORMACIÓN REDUCTIVA DE COLORANTES AZO UTILIZANDO UN CONSORCIO ANAEROBIO ENRIQUECIDO Y MEDIADORES REDOX INMOVILIZADOS EN CARBÓN ACTIVADO.

Anón, 2007. Claudia Guerrero-Barajas. UPIBI. Nota: El proyecto fue registrado en CIEMAD pero cambié de adscripción a UPIBI en Octubre de 2007. Informe del proyecto 20070880 “Compuestos con actividad redox en la biodegradación anaeróbica de compuestos clorados”. , pp.1–30.

Fabiano, B. & Perego, P., 2001. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energy*, 27(2), pp.149–156.

Fan, J. et al., 2016. Comparative exergy analysis of chemical looping combustion

thermally coupled and conventional steam methane reforming for hydrogen production. *Journal of Cleaner Production*, 131, pp.247–258. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.05.040>.

Lin, P.Y. et al., 2007. Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(12), pp.1728–1735.

Liu, H., Chen, G. & Wang, G., 2015. Characteristics for production of hydrogen and bioflocculant by *Bacillus* sp. XF-56 from marine intertidal sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(3), pp.1414–1419. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.11.110>.

Merugu, R., Girisham, S. & Reddy, S.M., 2010. Bioproduction of hydrogen by *Rhodobacter capsulatus* KU002 isolated from leather industry effluents. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(18), pp.9591–9597. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.057>.

Olivo, D. & García, B., 2015. IMMOBILIZATION OF REDOX MEDIATOR FOR ANAEROBIC BIOTRANSFORMATION OF CONGO RED DYE.

Pan, C.M. et al., 2008. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(20), pp.5383–5391. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.037>.

Singh, L. & Wahid, Z.A., 2015. Methods for enhancing bio-hydrogen production from

biological process: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, pp.70–80. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.035>.

Singh, S. et al., 2015. Hydrogen: A sustainable fuel for future of the transport sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, pp.623–633. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.040>.

Ye, X. et al., 2012. Anthrahydroquinone-2,6-disulfonate increases the rate of hydrogen production during *Clostridium beijerinckii* fermentation with glucose, xylose, and cellobiose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(16), pp.11701–11709. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.05.018>.

Ye, X. et al., 2013. Exogenous anthrahydroquinone-2,6-disulfonate specifically increases xylose utilization during mixed sugar fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(6), pp.2719–2727. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.149>.

Van der Zee, F.P. & Cervantes, F.J., 2009. Impact and application of electron shuttles on the redox (bio)transformation of contaminants: A review. *Biotechnology Advances*, 27(3), pp.256–277.

Zhu, B., 2011. Further discussion on exploitation of renewable energy sources and its legal regulations. *Energy Procedia*, 5, pp.2114–2119. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2011.03.365>.

Scott, K. & Hao Yu, E. 2016. Microbial electrochemical and fuel cells. Fundamentals and applications. Elsevier, pp. 67-113.