

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 539**

51 Int. Cl.:

C12M 1/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2008 E 08807022 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2195412**

54 Título: **Biorreactor para fermentación mesófila y/o termófila**

30 Prioridad:

15.09.2007 ZA 200702170

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.06.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF THE WITWATERSRAND,
JOHANNESBURG (100.0%)
1 JAN SMUTS AVENUE
2050 JOHANNESBURG, ZA**

72 Inventor/es:

GRAY, VINCENT MYLES

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro

ES 2 407 539 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biorreactor para fermentación mesófila y/o termófila.

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a un biorreactor para la producción de altas tasas de hidrógeno a partir de biomasa vegetal y para el rápido cribado, selección y aislamiento de bacterias o consorcios de bacterias mesófilas y/o termófilas formadoras de biopelícula que generan altos niveles de hidrógeno a partir de biomasa vegetal o a partir de hidrolizados solubles derivados de la hidrólisis de materias celulósicas incluyendo hemicelulosa.

Antecedentes de la invención

El aumento de precio de los combustibles fósiles y los productos de petróleo ha dado como resultado, en gran medida, que la producción de hidrógeno y etanol, así como otros productos de fermentación, a partir de biomasa vegetal se ha convertido una opción cada vez más atractiva para la producción de un combustible alternativo. La producción de dichos combustibles alternativos también es importante para países que carecen de petróleo o carbón.

Además, el hidrógeno está reconocido como un portador de energía limpio y reciclable. Por consiguiente, se considera que es una de las principales fuentes de energía del futuro y se ha empleado mucho esfuerzo en explorar métodos para suministrar de forma suficiente y eficaz hidrógeno. Además, la producción biológica de hidrógeno a partir de residuos orgánicos, así como a partir de otros recursos reciclables se considera preferible a la producción de hidrógeno a partir de cultivos alimentarios pues, aunque el rendimiento de hidrógeno de cultivos alimentarios tales como maíz y trigo es relativamente alto, existe una escasez global de alimentos que corre el riesgo de resultar exacerbada por el uso de cultivos alimentarios en reactores productores de hidrógeno biológico.

Actualmente ningún aparato ni metodología de biorreactor adecuadas son conocidos por el inventor para el rápido cribado, selección y aislamiento de bacterias o consorcios de bacterias termófilas que forman biopelículas, flóculos y gránulos que generan altos niveles de hidrógeno a partir de biomasa vegetal incluyendo los hidrolizados solubles derivados de la hidrólisis de materias celulósicas y, particularmente, de materias celulósicas tales como residuo y efluente de caña de azúcar que ha sido sometido solamente a un tratamiento mínimo tal como molienda y calentamiento en húmedo.

Las termófilas, incluyendo las termófilas extremas, tienen muchas ventajas como agentes para la generación de biohidrógeno a partir de celulosa y a partir de hidrolizado soluble derivado de la hidrólisis de celulosa. Quizás su principal ventaja es que las altas temperaturas excluyen la contaminación microbiana de un sistema biorreactor. La alta temperatura también desplaza la constante de equilibrio para las reacciones que generan hidrógeno en la dirección directa aumentando de este modo el rendimiento de hidrógeno. La mayoría de las termófilas y termófilas extremas son, sin embargo, difíciles de cultivar y mantener como cultivos puros aunque se ha descubierto que la hidrólisis de materias celulósicas y la generación de hidrógeno a partir de los productos de esta hidrólisis se vuelve cada vez más favorable bajo la acción de un consorcio mixto de bacterias que incluye especies bacterianas celulolíticas anaerobias.

El documento WO 2007/090138 desvela un aparato y un método para la producción de hidrógeno en base a la captura de subproductos metabólicos de microbacterias productoras de hidrógeno, en el que un biorreactor se mantiene en un entorno que conduce al crecimiento de microbacterias productoras de hidrógeno y la producción de hidrógeno y al mismo tiempo es restrictivo para el crecimiento de microorganismos indeseables, tales como metanógenos y la producción de metano.

Objeto de la invención

Es un objeto de esta invención proporcionar un biorreactor para la producción de altas tasas de hidrógeno a partir de biomasa vegetal y para el rápido cribado, selección y aislamiento de bacterias o consorcios de bacterias termófilas que forman biopelícula, que generan altos niveles de hidrógeno a partir de biomasa vegetal o a partir de hidrolizados solubles derivados de la hidrólisis de materias celulósicas, incluyendo hemicelulosa.

Resumen de la invención

De acuerdo con esta invención, se proporciona un biorreactor para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal, comprendiendo el reactor una vasija primaria del reactor que tiene un lecho de bacterias productoras de hidrógeno hacia su base, un flujo de entrada de biomasa vegetal, un flujo de salida de efluente de biomasa vegetal tratada hacia su extremo operativamente superior, y una entrada de reciclaje de efluente de biomasa vegetal saturado en gas en el lecho, y una vasija secundaria del reactor que tiene una entrada de efluente de biomasa vegetal tratada desde la vasija primaria del reactor, una salida de gas y una salida de reciclaje de efluente de biomasa vegetal saturado en gas, conduciendo la salida de reciclaje de efluente de biomasa vegetal saturado en gas a una bomba de

recirculación que, durante el uso, recicla efluente de biomasa vegetal saturado en gas de la vasija secundaria del reactor a la vasija primaria del reactor.

5 Se dispone, además, que el lecho sea un lecho fluidizado, como alternativa un lecho sedimentado, como alternativa adicional, un lecho expandido y, en el caso de un lecho fluidizado, para gas reciclado de la vasija secundaria del reactor a la vasija primaria del reactor para fluidizar el lecho de bacterias productoras de hidrógeno en la vasija primaria del reactor.

10 Se dispone, además, que las bacterias sean bacterias mesófilas y/o termófilas.

También se dispone que el efluente de biomasa vegetal reciclado esté saturado con hidrógeno gaseoso producido en la vasija primaria del reactor.

15 Se dispone, además, que el lecho de bacterias productoras de hidrógeno tenga al menos una entrada de alimentación de nutrientes inorgánicos.

20 También se dispone que la vasija primaria del reactor esté ubicada dentro de la vasija secundaria del reactor, que la vasija secundaria del reactor tenga una salida de efluente de biomasa vegetal no reciclado, en exceso y que la vasija secundaria del reactor funcione, durante el uso, como clarificador y/o separador de gas para efluente de biomasa vegetal tratada recibido de la vasija primaria del reactor.

25 También se dispone que las bacterias productoras de hidrógeno sean un consorcio mixto de bacterias mesófilas que incluye bacterias celulolíticas anaerobias; que las bacterias que componen el consorcio mixto se seleccionen entre uno o más de una gama de hábitats mesófilos incluyendo aguas residuales primarias, suelos, compost y estiércol ruminal; y que las bacterias productoras de hidrógeno estén adaptadas a temperaturas que varían entre 20°C y 80°C y preferentemente entre 25°C y 75°C.

30 Se dispone, además, que la biomasa vegetal tratada sea insoluble, preferentemente materia vegetal celulósica que se ha sometido solamente a un pre-tratamiento mínimo que es molienda y/o calentamiento en húmedo, como alternativa que la biomasa vegetal tratada sea un hidrolizado soluble derivado de la hidrólisis de materia celulósica, como alternativa adicional una mezcla de materia celulósica insoluble y un hidrolizado derivado de la hidrólisis de materia celulósica.

35 También se dispone que la vasija primaria del reactor tenga una base a partir de la cual se forma el lecho durante el uso, que el lecho se forme mediante un lecho de materia particulada recubierto por partículas de carbón activado, que la materia particulada del lecho esté formada por uno o más de bolas de acero, grava, perlas de vidrio, partículas de ceniza de carbón y similares, y que la materia particulada del lecho esté recubierta con una biopelícula formada a partir de un consorcio mixto de bacterias termófilas y/o mesófilas.

40 Características adicionales de la invención permiten que la vasija primaria del reactor tenga un medio de circulación para hacer circular biomasa vegetal parcialmente tratada dentro de la vasija del reactor, comprendiendo el medio de circulación un tubo de aspiración a través del cual materia saturada en gas es dirigida desde la base del reactor hacia arriba y un tubo descendente a través del cual biomasa parcialmente tratada que fluye desde una salida al tubo de aspiración es devuelta a la base del reactor.

45 La invención se extiende a un método para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal que comprende las siguientes etapas:

50 a) introducir una biomasa vegetal en una vasija primaria del reactor de un biorreactor tal como se ha descrito anteriormente que tiene un lecho de bacterias productoras de hidrógeno hacia su base:

b) tratar la biomasa vegetal introducida con un consorcio mixto de bacterias productoras de hidrógeno que incluye bacterias celulolíticas anaerobias para producir hidrógeno;

55 c) transferir la biomasa vegetal tratada a una vasija secundaria del reactor que tiene una entrada de efluente de biomasa vegetal tratada desde la vasija primaria del reactor;

d) recoger hidrógeno gaseoso de la segunda vasija del reactor y clarificar el efluente de biomasa vegetal tratada;

60 e) recoger un sobrenadante de la biomasa vegetal tratada clarificada; y

f) recircular biomasa vegetal tratada clarificada no recogida a la vasija primaria del reactor.

También se dispone que el efluente de biomasa vegetal reciclado esté saturado con hidrógeno gaseoso producido en la vasija primaria del reactor.

Se dispone, además, que el lecho sea un lecho fluidizado, como alternativa un lecho sedimentado, como alternativa adicional un lecho expandido y, en el caso de un lecho fluidizado, que el gas reciclado de la vasija secundaria del reactor a la vasija primaria del reactor fluidice el lecho de bacterias productoras de hidrógeno en la vasija primaria del reactor.

5 Se dispone, además, que las bacterias sean bacterias mesófilas y/o termófilas.

Se dispone, además, introducir al menos una alimentación de nutrientes inorgánicos en el lecho de bacterias productoras de hidrógeno.

10 Características adicionales de la invención posibilitan hacer circular biomasa vegetal parcialmente tratada dentro de la vasija primaria del reactor y que se haga circular a la biomasa vegetal parcialmente tratada dentro de la vasija del reactor a través de un tubo de aspiración a través del cual materia saturada en gas es dirigida desde la base del reactor hacia arriba y un tubo descendente a través del cual biomasa parcialmente tratada que fluye desde una salida al tubo de aspiración es devuelta a la base del reactor.

15 La invención también se extiende a un método para cribar, seleccionar y aislar bacterias o consorcios de bacterias formadoras de biopelícula que generan niveles altos de hidrógeno a partir de biomasa vegetal o a partir de hidrolizados solubles derivados de la hidrólisis de materia celulósica que incluye hemicelulosa, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- 20 a) crear un lecho de bacterias, en una vasija primaria del reactor de un biorreactor de lecho fluidizado tal como se ha descrito anteriormente para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal, a partir de un lecho de materia particulada recubierto con partículas de carbón activado;
- 25 b) introducir un consorcio mixto de bacterias en la vasija primaria del reactor;
- c) introducir una biomasa vegetal tratada en la vasija de reacción primaria del reactor; y
- 30 d) aislar bacterias o consorcios de bacterias termófilas formadoras de biopelícula de la materia particulada del lecho.

Se dispone, además, que el lecho sea un lecho fluidizado, como alternativa un lecho sedimentado, como alternativa adicional, un lecho expandido y, en el caso de un lecho fluidizado, que el gas reciclado de la vasija secundaria del reactor a la vasija primaria del reactor fluidice el lecho de bacterias productoras de hidrógeno termófilas en la vasija primaria del reactor.

35 Se dispone, además, que las bacterias sean bacterias mesófilas y/o termófilas.

40 También se dispone que el consorcio mixto de bacterias incluya bacterias celulolíticas anaerobias; que las bacterias que componen el consorcio mixto se seleccionen entre una o más de una gama de hábitats mesófilos incluyendo aguas residuales primarias, suelos, compost y estiércol ruminal; y que las bacterias productoras de hidrógeno termófilas estén adaptadas a temperaturas que varían entre 20°C y 80°C y preferentemente entre 25°C y 75°C.

45 Se dispone, además, que la biomasa vegetal tratada sea insoluble, preferentemente materia vegetal celulósica que se ha sometido solamente a un pre-tratamiento mínimo que es molienda y/o calentamiento en húmedo, como alternativa que la biomasa vegetal tratada sea un hidrolizado soluble derivado de la hidrólisis de materia celulósica, como alternativa adicional una mezcla de materia celulósica insoluble y un hidrolizado derivado de la hidrólisis de materia celulósica.

50 También se dispone que el lecho fluidizado esté formado por un lecho de materia particulada recubierto con partículas de carbón activado y que la materia particulada del lecho esté formada por una o más de bolas de acero, grava, perlas de vidrio, partículas de ceniza de carbón y similares.

55 **Breve descripción de realizaciones específicas de la invención**

A continuación se describirán realizaciones de la invención en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una vista de sección esquemática de una realización de un biorreactor de lecho fluidizado de acuerdo con la invención para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal; y

60 La figura 2 es una vista lateral esquemática detallada de la base del reactor primario del reactor de lecho fluidizado de la figura 1.

Descripción detallada de realizaciones específicas de la invención

En referencia a las figuras, un biorreactor de lecho fluidizado (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal comprende una vasija primaria del reactor cilíndrica circular (2) que tiene un lecho fluidizado (3) de bacterias productoras de hidrógeno hacia su base (4). La vasija primaria del reactor (2) tiene un conducto de flujo de entrada de biomasa vegetal (5) y un par de conductos de flujo de salida de efluente de biomasa vegetal tratada (6) hacia un extremo operativamente superior (7) de la vasija (2). La vasija primaria del reactor (2) en la realización ilustrada está ubicada dentro de una vasija secundaria del reactor cilíndrica circular (8) y los conductos de flujo de salida de efluente de biomasa vegetal tratada (6) descargan en la vasija secundaria del reactor (8).

La vasija secundaria del reactor (8) tiene una parte superior cónica (9) que sirve como colector de hidrógeno gaseoso producido en la vasija primaria del reactor. El hidrógeno gaseoso recogido es conducido desde el reactor (1) mediante un conducto de descarga de gas (10). La vasija secundaria del reactor (8) tiene también una base cónica (11) y, durante el uso, la biomasa vegetal tratada es extraída de la base de la vasija secundaria del reactor (8) y es reciclada a través de un conducto de reciclado (11) mediante una bomba de reciclado (12) a una entrada (13) en la base (14) de la vasija primaria del reactor (2).

En la vasija secundaria del reactor (8) biomasa vegetal tratada procedente de la vasija primaria del reactor se clarifica en una primera fracción que es extraída de la vasija del reactor (8) a través de un conducto (15) para procesamiento adicional, si se requiere y una segunda fracción que contiene gran parte de cualquier materia particulada en el efluente tratado y que se sedimenta hacia la parte inferior de la segunda vasija del reactor (8). La segunda fracción es reciclada tal como se ha descrito anteriormente. También en la vasija secundaria del reactor (8) el hidrógeno gaseoso es liberado y es recogido tal como se ha descrito anteriormente, sin embargo, la concentración de hidrógeno gaseoso en solución en el efluente tratado es suficiente para saturar el efluente lo que, está previsto, mejora la formación de hidrógeno gaseoso en la vasija primaria del reactor (2) tal como se describe a continuación.

La vasija primaria del reactor (2) tiene también un par de conductos de alimentación de nutrientes inorgánicos (16) que introducen nutrientes inorgánicos en la base de la vasija (2) para promover y, cuando sea necesario, mantener el crecimiento de bacterias en la vasija primaria del reactor (2).

La vasija primaria del reactor tiene también un medio de circulación (17) para hacer circular biomasa vegetal parcialmente tratada dentro de la vasija del reactor (2). El medio de circulación (17) está en forma de un tubo de aspiración (18) a través del cual materia saturada en gas es dirigida desde la base del reactor hacia arriba y un tubo descendente (19) a través del cual biomasa parcialmente tratada que fluye desde una salida (20) al tubo de aspiración es devuelta a la base del reactor. En esta realización, el tubo de aspiración (18) y el tubo descendente (19) son concéntricos y están formados mediante un tabique cilíndrico circular (21) en la vasija del reactor (2).

Las bacterias productoras de hidrógeno termófilas son un consorcio mixto de bacterias mesófilas que incluye bacterias celulolíticas anaerobias. Durante el uso, las bacterias que componen el consorcio mixto se seleccionan entre uno o más de una gama de hábitats mesófilos que incluyen aguas residuales primarias, suelos, compost y estiércol ruminal y están adaptadas a temperaturas que varían entre 25°C y 75°C.

El consorcio de bacterias productoras de hidrógeno termófilas forma una biopelícula en el lecho que está formado por un lecho de materia particulada (22) recubierto con partículas de carbón activado (23). La materia particulada del lecho (22) está formada por uno o más de bolas de acero, grava, perlas de vidrio, partículas de ceniza de carbón y similares.

También está previsto que la biomasa vegetal tratada sea una materia vegetal celulósica insoluble que se ha sometido solamente a un pre-tratamiento mínimo que es molienda y/o calentamiento en húmedo. Como alternativa, la biomasa vegetal tratada puede ser un hidrolizado soluble derivado de hidrólisis de materia celulósica o puede ser una mezcla de materia celulósica insoluble y un hidrolizado derivado de hidrólisis de materia celulósica.

La realización de la invención descrita anteriormente se describirá a continuación.

Se ha descubierto que la hidrólisis de materias celulósicas y la generación de hidrógeno a partir de los productos de esta hidrólisis se vuelven cada vez más favorable bajo la acción de un consorcio mixto de bacterias que incluye especies de bacterias celulolíticas anaerobias. Por lo tanto, este sistema biorreactor incluye en su funcionamiento general procesos que inducen la adaptación, aislamiento, selección y mantenimiento de consorcios productores de hidrógeno celulolíticos anaerobios mixtos. Las especies que componen este consorcio mixto se derivaban de hábitats mesófilos que incluyen aguas residuales primarias, suelos, compost y estiércol ruminal. Aplicando una elevada tasa de dilución con reciclado de efluente parcial dentro del biorreactor descrito anteriormente, consorcios productores de hidrógeno celulolíticos anaerobios derivados de una mezcla de inóculos que se han obtenido de diversos hábitats mesófilos pueden seleccionarse rápidamente y aclimatarse o adaptarse a temperaturas que varían entre 25°C y 75°C.

Además, el diseño del biorreactor permite que el biorreactor funcione de manera que promueva la rápida inducción, crecimiento y desarrollo de diversas formas de asociaciones de bacterias de especies mixtas. Por ejemplo el diseño y funcionamiento del biorreactor facilita rápidamente, en de cuatro a diez días, que se produzcan una o más formas de bacterias adheridas al sustrato y/o auto-adheridas de asociaciones de bacterias multiespecíficas. Estas dos formas de adhesión bacteriana dan como resultado la formación de:

- a) biopelículas bacterianas de especies mixtas en partículas portadoras que pueden ser inorgánicas u orgánicas;
- b) auto-adhesión de bacterias que da como resultado la formación de gránulos bacterianos que soportan disgregación en agitación o flóculos bacterianos que se disgregan fácilmente en agitación.

El biorreactor puede funcionar de modo que, dependiendo de la naturaleza del sustrato para la generación de hidrógeno, las bacterias pueden estar organizadas en cualquiera, una de o una combinación de varios de los siguientes tipos de asociaciones multiespecíficas:

- a) gránulos;
- b) flóculos;
- c) o biopelícula adherida a un portador; o
- d) o una combinación heterogénea de gránulos, flóculos, biopelícula y formas planctónicas de asociaciones bacterianas.

Incluidos en este sistema biorreactor heterogéneo hay dos tipos de sistemas de enzimas que degradan celulosa:

- a) celulasas externas que han sido excretadas por las bacterias; y
- b) celulasas no excretadas que están adheridas al complejo del celulosoma del grupo clostridial de bacterias y sus familiares.

Bajo la acción de estos dos sistemas celulolíticos tiene lugar la hidrólisis rápida de materias celulósicas. Se observó que una muestra de efluente de 25 a 50 ml recogida del biorreactor en un frasco Schott dirigió completamente un disco de filtro Whatman No 1 de 5,0 cm en 24 h a temperaturas que varían entre 50°C y 70°C. El desarrollo del lecho fluidizado heterogéneo con esta capacidad podría inducirse y desarrollarse en 5 días usando una mezcla de suelo, compost, estiércol ruminal y aguas residuales como fuente de inóculo.

El diseño y funcionamiento de este sistema biorreactor facilita altas tasas volumétricas de producción de biohidrógeno, que dependiendo de los materiales del sustrato, varían entre > 100 mmol H₂/(l.h) para materias celulósicas insolubles y entre 150 y 290 mmol H₂/(l.h) para sustratos solubles que son los productos de descomposición de hidrólisis de celulosa (hidrolizados derivados de celulosa). Las altas tasas volumétricas de producción de biohidrógeno son facilitadas por las siguientes condiciones que se hacen posible gracias al diseño y funcionamiento del sistema biorreactor: a) mantenimiento de alta densidad de biomasa bacteriana que, dependiendo del sustrato, puede variar entre 20 y 40 g/l; b) elevada recuperación de H₂ a través de extracción por arrastre con gas reciclando efluente saturado en H₂ de vuelta a través del biorreactor a través de un lecho de materias que facilitan la formación de burbujas de gas a través de cavilación y nucleación por gas; c) expansión y fluidización del lecho del biorreactor a través de las fuerzas de elevación generadas como consecuencia de la producción de burbujas de hidrógeno y dióxido de carbono gaseosos en la parte inferior del biorreactor; d) rápidos procesos de mezclado de materia y transferencia de masa facilitados por la elevación de las burbujas de gas y el reciclado interno que tiene lugar dentro del biorreactor mediante la columna de burbujas central o tubo de aspiración y el tubo descendente externo que rodea al tubo de aspiración central. Este mezclado del contenido del biorreactor tiene lugar independientemente del consumo de energía externa o la aplicación de agitación mecánica. Hidrógeno disuelto de forma muy eficaz e hidrógeno atrapado líquido es facilitado mediante separación de hidrógeno gaseoso mediante la formación de burbujas de hidrógeno gaseoso y expansión del tamaño de las burbujas en el biorreactor. Aunque el hidrógeno es altamente insoluble en agua, una gran cantidad de hidrógeno permanece atrapada en el líquido en forma de burbujas microscópicas. El desprendimiento gas-líquido altamente eficaz es promovido por la formación de grandes burbujas que estallan en la superficie del líquido en la parte superior del biorreactor y estallan a medida que el efluente fluye sobre los lados del biorreactor al interior del decantador que rodea al biorreactor o está conectado al biorreactor. El flujo del efluente hacia abajo por los lados de la vasija del biorreactor al interior del decantador también induce mezclado de materia y desprendimiento gas-líquido dentro del decantador.

En la mayoría de los sistemas biorreactores bajos HRT [Tiempos de Retención Hidráulica] (o tasas de dilución) y altas velocidades de flujo ascendente de influente que son necesarias para altas tasas de producción de biohidrógeno son incompatibles con el mantenimiento de altas densidades de biomasa microbiana dentro del biorreactor. Habitualmente, bajo HRT y altas tasas de flujo ascendente de influente dan como resultado un

agotamiento de la biomasa bacteriana a través del lavado celular. Con este sistema biorreactor, se ha observado que altas tasas de carga orgánica asociadas con bajo HRT o altas tasas de dilución dieron tasas volumétricas de producción de hidrógeno más altas si la velocidad del flujo ascendente con el biorreactor aumenta. La velocidad del flujo ascendente es directamente proporcional a la tasa de reciclado del efluente desde el depósito del decantador de vuelta en el biorreactor. A medida que la velocidad del flujo ascendente o el caudal de reciclado aumenta, hay un aumento dramático de:

- a) la tasa de producción de burbujas en la parte inferior del tubo de aspiración dentro del biorreactor; y
- b) la tasa volumétrica de producción de hidrógeno.

Esta alta producción volumétrica de hidrógeno asociada con altas tasas a bajo contenido orgánico (bajo HRT) y altas tasas de reciclado era posible sin un declive correspondiente en la densidad de biomasa bacteriana del biorreactor como consecuencia del excesivo lavado celular o granular. El flujo interno entre el tubo de aspiración y el descendente dentro del biorreactor junto con el diámetro expandido del tubo del biorreactor en la parte superior del biorreactor redujeron la pérdida de biomasa bacteriana debida al lavado. Además, el reciclado de efluente desde el decantador de vuelta al biorreactor da como resultado la reinoculación del biorreactor con gránulos de siembra. La pérdida de gránulos del biorreactor se produce mediante dos procesos: a) los gránulos pequeños (< 1,0 mm) tienen bajas velocidades de sedimentación y son lavados a medida que los HRT disminuyen y las tasas de reciclado aumentan; y b) a medida que el crecimiento y desarrollo de los gránulos tiene lugar dentro del biorreactor, el aumento del tamaño del lecho da como resultado el lavado de gránulos en el decantador. Estos dos procesos dan como resultado la recogida de materia granular en el decantador del biorreactor. Esta materia experimenta un crecimiento y desarrollo adicionales que dan como resultado la producción de gránulos adicionales. Estos gránulos dentro del decantador también generan hidrógeno gaseoso y, de este modo, mantienen niveles saturados de hidrógeno disuelto y burbujas de hidrógeno microscópicas atrapadas dentro del efluente que es reciclado de vuelta al biorreactor. Cuando el efluente es reciclado de vuelta al biorreactor a tasas de reciclado altas, se produce la formación de grandes burbujas (> 1,0 mm) debido a la cavilación dentro de/lecho de partículas que cubre la entrada de reciclado inferior del biorreactor. Las cavilaciones se transforman en burbujas llenas de gas estables a medida que el hidrógeno disuelto se difunde dentro de la cavilación, además, las burbujas microscópicas coalescen con las cavilaciones. Las burbujas aumentan de tamaño y número y reducen la densidad del líquido en el tubo de aspiración. Como consecuencia de la formación de burbujas, se realiza un trabajo sobre el líquido y los gránulos en el tubo de aspiración que da como resultado la fluidización del lecho granular y el reciclado de materia dentro del biorreactor mediante los tubos de aspiración y descendente. Este proceso mejora el mezclado y la transferencia de masa dentro del biorreactor, aumentando de este modo la reactividad volumétrica del biorreactor con respecto a la transformación del sustrato en biohidrógeno y nueva biomasa microbiana.

También está previsto que, en condiciones en las que la concentración del suministro de sustrato orgánico es baja, el diseño del biorreactor permita las altas tasas de influente de nutriente y altas tasas de reciclado de efluente. Esto facilitará un alto rendimiento en volumen de suministros de nutrientes que tienen bajas concentraciones orgánicas.

El biorreactor descrito anteriormente también da como resultado una rápida inducción de biopelícula, gránulos bacterianos y flóculo bacteriano. Se han propuesto muchas teorías para explicar el proceso de granulación o floculación bacteriana. Parece que los factores que conducen al inicio de la granulación bacteriana en el sistema biorreactor descrito en esta patente implican pH y formación de biopelícula. El crecimiento y desarrollo de la biopelícula da como resultado la formación de núcleos de granulación en la superficie de la biopelícula. A medida que el pH dentro del biorreactor cae por debajo de 6,0, la formación visible de biopelícula se vuelve evidente en la superficie de la materia particulada en la base del biorreactor. Esta materia particulada (> 4,0 mm) puede ser vidrio, plástico, acero inoxidable, ceniza de carbón o grava. También en la superficie de la capa de partículas de carbón activado (3 mm de diámetro, de 6 a 10 mm de largo) la formación de biopelícula se vuelve evidente. El sometimiento a esfuerzo cortante de los núcleos de granulación de la capa de biopelícula suministra al biorreactor masas de bacterias auto-adheridas que actúan como materia de siembra para el crecimiento y desarrollo de gránulos. A bajas tasas de reciclado y HRT decrecientes (tasas de carga orgánica en aumento) el crecimiento y desarrollo de gránulos avanza desde la superficie del lecho expandido de carbón activado. Los gránulos pequeños que son lavados del colector son atrapados en el decantador donde siguen experimentando crecimiento y desarrollo adicional antes de ser reciclados de vuelta al biorreactor. En esta invención, la granulación completa del lecho del biorreactor se produce en de 3 a 10 días. Otros factores que promueven la granulación rápida incluyen:

- a) inyección directa de nutrientes en el lecho de materia particulada mediante los orificios de entrada de nutrientes de múltiples horizontes; y
- b) expansión inducida por burbujas de gas de la capa de carbón activado que recubre a la materia particulada.

Durante el uso, el fluido que pasa a través del biorreactor fluidizado (2) se decanta sobre los lados de este biorreactor y es recogido en el clarificador en la vasija más grande externa (8). El efluente que fluye hacia abajo o los lados en la vasija del biorreactor (2) adquiere energía cinética que causa el mezclado de la materia y la formación de

burbujas en la superficie superior del fluido contenido en la vasija del decantador más grande (8), cuya mitad superior se usa para la recogida de gas y cuya mitad inferior funciona como clarificador.

5 Todo el sistema es hermético a los gases de modo que el gas solamente puede escapar del sistema a través del respiradero de gases (10) para la recogida de hidrógeno gaseoso. Por consiguiente, toda la fase líquida o acuosa en masa del biorreactor, las tuberías y el decantador se mantiene en un estado saturado en dióxido de carbono e hidrógeno gaseosos. El componente gaseoso en la fase líquida se produce en dos formas:

- 10 a) gas disuelto, y
b) burbujas de gas microscópicas atrapadas dentro de la fase líquida.

15 El efluente saturado en gas (que contiene gas disuelto y burbujas microscópicas atrapadas) es reciclado desde el decantador a la base del biorreactor a través de un lecho de materia particulada recubierto con partículas de carbón activado. La materia particulada puede estar constituida por materia tal como bolas de acero, grava, perlas de vidrio, cenizas de carbón y demás. La materia particulada promueve la cavilación de la fase líquida a medida que el fluido es bombeado en una dirección hacia arriba a través del lecho de materia particulada. El colapso de la cavilación se previene mediante:

- 20 a) la difusión de gas disuelto en la cavidad; y
b) la coalescencia de burbujas microscópicas con la cavidad.

25 Estos dos procesos dan como resultado la formación de burbujas. Las burbujas que se mueven hacia arriba expanden su tamaño y realizan un trabajo de elevación sobre:

- 30 a) la capa de partículas de carbón activado que recubre el lecho de materia particulada, dando como resultado la expansión del lecho;
b) el fluido en el tubo de aspiración; y
c) los gránulos bacterianos en el tubo de aspiración.

35 La expansión del lecho de partículas de carbón activado aumenta la porosidad del lecho, lo que a su vez promueve, como consecuencia de un flujo de nutrientes mejorado a través del lecho, el crecimiento de la biopelícula y el desarrollo de núcleos de gránulos.

40 Además, a medida que la retención de gas en la fase líquida aumenta en el tubo de aspiración debido a la formación de burbujas, el fluido menos denso lleno de gas se eleva hacia arriba en el tubo de aspiración del biorreactor. Este flujo ascendente de fluido en el tubo de aspiración fluidiza el lecho del biorreactor que puede estar constituido por gránulos o flocos de materias celulósicas particuladas insolubles. El lecho del biorreactor fluidizado también puede ser heterogéneo constituido por una mezcla de gránulos bacterianos, flocos bacterianos y partículas de materias celulósicas recubiertas de biopelícula. En el lecho fluidizado heterogéneo, la materia se clasifica de acuerdo con la densidad dentro del tubo de aspiración. La velocidad de ascenso de las partículas de baja densidad declina rápidamente en el diámetro expandido de la parte superior del tubo de aspiración. Esto impide el escape de una gran fracción de materia menos densa del biorreactor al decantador. La materia menos densa es transportada hacia abajo en el fluido denso que se hunde dentro del tubo descendente. Las partículas granulares bacterianas o flocos bacterianos más ligeros y más pequeños que son lavados al decantador experimentan un aumento de tamaño debido a un crecimiento y desarrollo adicionales en el decantador. A continuación son reciclados como partículas de tamaño aumentado de vuelta al biorreactor.

50 Además, el desprendimiento líquido - gas en la parte superior del biorreactor es promovido con la rotura de grandes burbujas de gas en la superficie del líquido en la parte superior del biorreactor. Se produce un desprendimiento líquido - gas adicional con la liberación de gas de burbujas más pequeñas y burbujas microscópicas a medida que el fluido se decanta sobre el lado del biorreactor al decantador. Con la transferencia de energía cinética mediante el fluido que fluye hacia abajo por los lados del biorreactor a la superficie superior del fluido en el decantador da como resultado la creación adicional de burbujas, promoviendo de este modo el desprendimiento líquido - gas adicional dentro de la vasija del decantador.

60 Está previsto que esta invención implique la aplicación de un conjunto de biorreactor - decantador - clarificador - separador/colector de gas (BDCG) y cada uno de estos conceptos, junto con su modo de funcionamiento, se describe de la siguiente manera:

65 1. Un quimiostato que facilita la rápida selección, crecimiento y desarrollo de consorcios de bacterias multispecíficas celulolíticas termófilas anaerobias productoras de hidrógeno. En esta solicitud, el concepto de un quimiostato se define como cualquier biorreactor que siempre funciona a tasas de dilución mayores que la tasa máxima de crecimiento específico de las especies bacterianas en el biorreactor. Solamente células bacterianas que

están organizadas en conjuntos multiespecíficos adheridos que existen como estructuras particuladas con buenas propiedades de sedimentación se mantendrán en el biorreactor. Estas estructuras particuladas pueden existir en forma de biopelícula adherida a cierto sustrato portador o como conjuntos auto-adheridos en forma de gránulo o floculos bacterianos. Pueden usarse diversos sustratos portadores de biopelícula potenciales o adecuados tales como biolita, incluso como una mezcla con materia particulada celulósica insoluble. El funcionamiento continuo del biorreactor como quimiostato facilita, por lo tanto, no solamente la rápida selección de bacterias celulolíticas anaerobias productoras de hidrógeno entre diversos hábitats mesófilos tales como aguas residuales, suelo, compost o estiércol ruminal, sino que también selecciona entre estas bacterias, especies que pueden llegar a adaptarse o aclimatarse a temperaturas cada vez más altas, es decir, temperaturas en el intervalo de 50°C a 75°C.

2. Un sistema que promueve la rápida formación y el mantenimiento a largo plazo de estructuras particuladas bacterianas con buenas propiedades de sedimentación. Dependiendo de si la carga de alimentación son materias celulósicas insolubles o hidrolizados derivados de celulosa solubles, el consorcio bacteriano puede estar inmovilizado como biopelículas adheridas o inmovilizado como asociaciones auto-adheridas en forma de gránulos o floculos. O, como alternativa, las tres formas de estructuras de consorcio bacteriano inmovilizado pueden coexistir de forma estable dentro del mismo biorreactor. Estas 3 formas de asociación de consorcio bacteriano inmovilizado dan como resultado la formación de estructuras particuladas que tienen buenas propiedades de sedimentación. La inmovilización bacteriana da como resultado la formación de una estructura particulada constituida por cualquiera de los siguientes: a) un complejo bacteriano multicelular que está adherido como una biopelícula a un sustrato portador particulado, o b), un complejo bacteriano multicelular auto-adherido que existe en forma de gránulo o floculo. Esta realización del conjunto BDCG facilita la rápida inducción, crecimiento, desarrollo y mantenimiento a largo plazo de estructuras particuladas bacterianas con buenas propiedades de sedimentación. El inicio rápido de la formación de grupos de bacterias auto-adheridos multicelulares microscópicos en núcleos pre-granulares o pre-floculares es facilitado por la siguiente combinación de factores. La rápida producción de estos grupos de bacterias auto-adheridos multicelulares microscópicos requiere la formación de biopelícula de bacterias sobre portadores en presencia de un fuerte campo de esfuerzo cortante en condiciones en las que tanto la tasa de suministro de nutrientes como la transferencia de masa de nutrientes no es limitante. Estas condiciones se consiguen en el biorreactor mediante:

- a) inyección directa de nutrientes en el lecho de materia particulada inerte (> 4 mm en sección transversal) recubierto por un lecho expandido de partículas de carbón activado, y
- b) reciclado de efluente del decantador a través de este lecho de materia.

Los nutrientes son inyectados en el lecho mediante un sistema de múltiples orificios de entrada que están orientados perpendiculares al eje vertical del biorreactor.

Después de la inoculación inicial del biorreactor con el inóculo bacteriano, el biorreactor funciona en primer lugar en un modo de reciclado de lotes durante entre 24 y 48 h, antes de cambiarlo a modo de reciclado continuo. Después de cambiarlo al modo de reciclado continuo, el caudal de nutrientes y la velocidad de flujo ascendente aumentan de manera gradual durante de 4 a 10 días. Durante este periodo, un lecho expandido de gránulos se forma por encima del lecho de partículas de carbón activado. El rápido crecimiento y desarrollo del lecho granular bacteriano fluidizado es promovido por la siguiente secuencia de eventos: a) Inicio y crecimiento de biopelícula adherida en un campo de altas fuerzas de esfuerzo cortante. b) Desprendimiento de núcleos multicelulares pre-granulares de la biopelícula mediante la acción de las fuerzas de esfuerzo cortante que da como resultado la formación de precursores de gránulos bacterianos multicelulares auto-adheridos microscópicos suspendidos. c) Crecimiento y desarrollo de grupos bacterianos microscópicos multicelulares suspendidos (< 1 mm) a gránulos bacterianos macroscópicos (> 1 mm) dentro del biorreactor y el decantador. d) Gránulos bacterianos microscópicos que son lavados del biorreactor al clarificador experimentan crecimiento y desarrollo adicionales en el clarificador. Estos son reciclados a continuación de vuelta al biorreactor a través del lecho particulado en la parte inferior del biorreactor. Su paso a través del lecho particulado a altas velocidades de fluido en presencia de producción masiva de burbujas les expone a la acción de altas fuerzas de esfuerzo cortante. En estas condiciones, los gránulos se fragmentan en partículas de tamaño más pequeño. Esto da como resultado que el biorreactor está siendo re-sembrado continuamente con un suministro de precursores de gránulos bacterianos. Bajos HRT, altas tasas de carga orgánica y altas velocidades de reciclado de efluente, facilitan el rápido crecimiento y desarrollo de un denso lecho granular fluidizado en condiciones que son esencialmente quimiostáticas.

3. El sistema biorreactor contiene dos sistemas de reciclado de materia:

- a) El propio y auténtico biorreactor contiene un sistema de reciclado de materia interno constituido por un tubo de flujo ascendente o de aspiración rodeado por un tubo de flujo descendente o descendente, y
- b) el biorreactor. a su vez, está asociado con un segundo sistema de reciclado de materia externo que es el clarificador.

El biorreactor puede estar contenido dentro de una vasija más grande que funciona como clarificador o el biorreactor puede estar conectado con una vasija diferente que funciona como clarificador. El clarificador es una vasija multifuncional que tiene las siguientes funciones:

- 5 a) funciona como una trampa para materia granular bacteriana microscópica lavada del biorreactor;
- b) funciona como un recipiente de cultivo para el crecimiento y desarrollo de gránulos microscópicos a gránulos macroscópicos; y
- 10 c) funciona como un recipiente para la generación de efluente que está saturado con hidrógeno gaseoso disuelto y burbujas de gas microscópicas atrapadas.

La vasija del biorreactor también funciona como un decantador que descarga efluente sobre sus lados al interior del clarificador circundante o mediante una tubería de conexión a un clarificador externo. En ambos casos, el efluente descargado desde la abertura superior del biorreactor adquiere energía cinética a medida que fluye al interior del clarificador. Esto da como resultado una transferencia de energía cinética a las capas superiores del decantador que promueve el mezclado y la suspensión de partículas granulares bacterianas de tamaño microscópico. Además, la transferencia de energía cinética a las capas superiores del clarificador causa la formación de macro-burbujas y escapes de hidrógeno gaseoso de la superficie del fluido de clarificador. A medida que los gránulos crecen en el clarificador, sedimentan hacia la parte inferior del clarificador y son bombeados de vuelta al biorreactor.

4. La configuración del biorreactor está constituida por un biorreactor de lecho fluidizado contenido en una vasija más grande que funciona tanto como separador de gas, como clarificador y es más eficaz con respecto a la recuperación de hidrógeno y reciclado de sustrato. En dicha disposición, el fluido que pasa a través del biorreactor se decantaría sobre los lados del biorreactor y sería recogido en el clarificador que rodea al biorreactor. Esta disposición de un biorreactor que está diseñado para permitir que el efluente se decante sobre los lados aumentará la separación gas - líquido. La mitad superior de la vasija que contiene el biorreactor será de forma cónica para la recogida de gas y la mitad inferior será de forma cónica para funcionar como clarificador. Dicho sistema combinaría el biorreactor - decantador - clarificador - separador de gas en una única unidad operativa del proceso. Esto reduciría la complejidad de las tuberías y aumentaría la facilidad de las operaciones de los procesos del biorreactor. Esto aumentará también la recuperación de hidrógeno gaseoso.

5. Extracción de hidrógeno gaseoso del biorreactor por medio de hidrógeno gaseoso generado a partir de la producción de hidrógeno gaseoso endógeno dentro del clarificador. Altas velocidades del fluido en flujo ascendente a través del lecho particulado como base del biorreactor usando efluente derivado del clarificador da como resultado la generación de burbujas de hidrógeno gaseoso dentro del lecho particulado que, a su vez, realizan dos funciones dentro del biorreactor:

- 40 a) la generación burbujas de hidrógeno gaseoso en la base del tubo de aspiración impulsa el flujo de fluido y de materia hacia arriba en el tubo de aspiración, y con el escape de burbujas de la superficie superior de la vasija del biorreactor, el fluido más denso se hunde a la parte inferior del biorreactor mediante el tubo descendente externo; y
- 45 c) el hidrógeno gaseoso es extraído de la fase acuosa del biorreactor mediante difusión de gas en burbujas y mediante coalescencia de las burbujas.

6. Está previsto que el conjunto de biorreactor-decantador-clarificador-separador/colector de gas (BDCG) pueda usarse para la producción anaerobia de hidrógeno a partir de sustratos ligno-celulósicos insolubles y a partir de hidrolizados solubles (disacáridos, hexosas y pentosas) derivados de la hidrólisis de materias celulósicas. En el caso de materias ligno-celulósicas insolubles el conjunto BDCG funciona de la siguiente manera. El biorreactor contendrá un lecho fluidizado heterogéneo constituido por los siguientes componentes: un lecho de pasta de materias celulósicas; consorcio bacteriano mixto adherido como biopelícula a partículas celulósicas; gránulos bacterianos y flóculos bacterianos. El biorreactor contendrá bacterias que tienen adheridas celulasas en forma de celulosomas. Las bacterias estarán adheridas a partículas celulósicas. Además de las bacterias celulolíticas anteriores, el biorreactor también contendrá otros microorganismos celulolíticos que excretan celulasas en la fase en masas del fluido circundante. Por lo tanto, el biorreactor contendrá dos sistemas celulolíticos. Además del reciclado de efluente procedente del clarificador al biorreactor, el efluente procedente del clarificador también se mezclará con la materia lignocelulósica antes de entrar en el biorreactor. Antes de cargarla en el biorreactor, la materia lignocelulósica o biomasa vegetal se molerá en seco y se enriquecerá con salvado de trigo. La materia se mezclará a continuación con el efluente procedente del clarificador y a continuación se molerá en húmedo para reducir adicionalmente el tamaño de partícula de la materia y convertirla en una lechada de pasta. La lechada de pasta se almacenará en un tanque de alimentación desde el cual la lechada de pasta será bombeada al biorreactor del conjunto BDCG. Antes de ser bombeada al biorreactor, la lechada de pasta se habrá sometido al siguiente pre-tratamiento: a) Hidrólisis como consecuencia de de la exposición a celulasas en el efluente procedente del clarificador; b) inoculación con bacterias celulolíticas. El resto del efluente procedente del clarificador que contendrá hidrolizados solubles se usará

como la carga de alimentación para la producción de hidrógeno en un segundo conjunto de biorreactor - decantador - clarificador - separador/colector de gas (BDCG).

7. Generación de metano con el conjunto de biorreactor-decantador-clarificador-separador/colector de gas (BDCG). El efluente procedente del sistema BDCG al que se le han suministrado sustratos solubles en forma de hexosas y pentosas generará acetato como uno de los productos finales. El resto del efluente procedente del clarificador que contiene altas concentraciones de acetato se usará como carga de alimentación para la producción de metano en un conjunto BDCG de producción de metano. El metano producido puede reformarse para dar hidrógeno o someterse a combustión para la producción de vapor.

Metodología

Esta invención implica la aplicación de la metodología del quimiostato a la selección de consorcios de bacterias termófilas que forman biopelícula, flóculos bacterianos y gránulos bacterianos que pueden generar hidrógeno a partir de hidrolizados derivados de biomasa y a partir de materias celulósicas insolubles. El biorreactor con quimiostato está constituido por un lecho fluidizado que contiene partículas adecuadas tales como carbón activado/carbón vegetal (GAC) granulado sobre el cual las bacterias pueden adherirse y crecer para formar una biopelícula. Las partículas de carbón activado recubren partículas inertes más grandes que están implicadas en la formación de burbujas mediante el proceso de cavitación. Este aparato biorreactor puede usarse como quimiostato para la selección de consorcios de bacterias termófilas que generan hidrógeno que forman biopelícula o que forman gránulos. Éste también puede aumentarse a escala fácilmente en una planta de procesamiento para la producción comercial de hidrógeno a partir de biomasa vegetal. La metodología también puede adaptarse y aplicarse a nivel de la escala de toda la planta de procesamiento.

Esta metodología y biorreactor pueden usarse para facilitar el rápido cribado y selección de bacterias o consorcios de bacterias termófilas adecuadas para la producción de hidrógeno a partir de biomasa vegetal. La implementación de la metodología del quimiostato permite el cribado, selección y aislamiento para el cultivo de consorcios formadores de hidrógeno de bacterias termófilas que generan hidrógeno directamente en o procedentes del biorreactor según pueda ser el caso. En esta estrategia, se usa un biorreactor - decantador - clarificador - separador/colector de gas como quimiostato para cribar y seleccionar bacterias termófilas que fácilmente forman biopelículas sobre partículas de GAC. El diseño y funcionamiento del biorreactor da como resultado la extracción de hidrógeno mediante el purgado del biorreactor con burbujas de hidrógeno gaseoso producidas de forma endógena. Dado que la fase líquida del biorreactor está siempre saturada con hidrógeno disuelto, siempre habrá movimiento neto de hidrógeno desde la fase líquida a la fase gaseosa con burbujas. Esta división altamente eficaz y rápida de hidrógeno en la fase gaseosa a partir de la fase soluble disuelta en el líquido desplaza el equilibrio para la generación de hidrógeno a nivel molecular - celular en la dirección directa.

En la metodología, muestras muy grandes que contienen posibles inóculos termófilos pueden aplicarse fácilmente directamente al biorreactor. Las muestras pueden recogerse de una serie de diferentes nichos ecológicos que tienen una alta probabilidad de estar enriquecidos con comunidades de bacterias termófilas anaerobias celulolíticas. Se prepararán grandes muestras que varían entre 100 g y 1 kg de materia de muestra, de modo que puedan ser inoculadas directamente en el biorreactor. Después de la inoculación los biorreactores funcionarán en modo reciclado por lotes usando un medio seleccionado que facilitará el crecimiento de consorcios de bacterias que pueden utilizar solamente hidrolizados de biomasa (azúcares de C₅ y C₆) o sustratos celulósicos. Un día después de la inoculación del biorreactor, la temperatura se aumentará gradualmente durante los siguientes 2 días de 37°C a 70°C para seleccionar termófilas extremas. Después de este periodo, el biorreactor se cambia a modo continuo y la tasa de dilución se aumentará gradualmente hasta que en combinación con la velocidad de flujo de reciclado, la tasa de flujo ascendente total a través del lecho de materia particulada del biorreactor estará entre 5,2 y 10 m/h. A medida que la tasa de dilución aumenta, todas las variables clave del biorreactor son monitorizadas tales como: concentración del sustrato influente, concentración del sustrato efluente, ácidos orgánicos en el efluente, pH, ORP, temperatura, conductividad, turbidez, CO₂, H₂, y DO de bacterias planctónicas. Esto se realiza para evaluar rápidamente el potencial de producción de hidrógeno de la biopelícula bacteriana, gránulo bacteriano y flóculo bacteriano que se ha generado en el lecho del biorreactor a partir de la muestra que contiene el inóculo original. El crecimiento de la biopelícula, el gránulo o el flóculo puede monitorizarse registrando la altura del lecho sedimentado. Se espera que la tasa de producción de hidrógeno aumente a medida que la tasa de dilución aumenta o el HRT declina. Si este escenario prevalece para ambos tipos de sustratos, es decir, hidrolizados de biomasa o sustratos celulósicos, entonces en de 4 a 10 días un consorcio de termófilas de biopelícula o gránulos bacterianos que generan hidrógeno se habrá establecido en el biorreactor. Para cada tasa de dilución constante, se alcanzará un estado de equilibrio con respecto a las variables del biorreactor y la composición de las especies del consorcio de bacterias de biopelícula. Para cada estado de equilibrio, muestras de biopelícula o gránulos bacterianos se extraerán del lecho del biorreactor para cultivar e identificar bacterias.

Aplicación adicional del conjunto de biorreactor - decantador - clarificador - separador/colector de gas (BDCG).

Además de la producción de hidrógeno, la invención anterior también puede usarse como aplicación para la producción de disolventes tales como etanol, butanol, propanol, acetona a partir de diversos sustratos orgánicos tales como, por ejemplo, glicerol y celulosa.

5 1. Acetona, butanol y etanol son disolventes que son co-generados con hidrógeno en el sistema BDCG. La producción y recuperación continua de acetona-butanol-etanol (ABE) mediante extracción por arrastre con gas en un conjunto BDCG. La invención se amplió en esta solicitud a producción continua de ABE. En general, el BDCG que implica un lecho fluidizado de biopelícula bacteriana adherida a un portador o un lecho fluidizado de gránulos bacterianos puede usarse para generar disolventes ABE y para recuperar los disolventes mediante extracción por arrastre con gas. En una aplicación particular de ABE, se ensayó la capacidad de generar disolventes ABE y recuperar estos disolventes a través de extracción por arrastre y condensación con gas del conjunto BDCG. La aplicación de ensayo implicaba un lecho granular fluidizado en un biorreactor con un bucle ascendente de gas reciclado, gases constituidos por H₂ y CO₂ que se produjeron de forma endógena reciclando efluentes saturados en gas a altos caudales a través del lecho particulado situado en la parte inferior del biorreactor. En la aplicación de ensayo, se evaluaron dos medios nutrientes: Medio Endo con 20 g de sacarosa/l como fuente de nutrientes y medio Endo con 20 g/l de salvado de trigo finamente homogeneizado en húmedo. Se observó que a medida que los HRT se redujeron a 0,5 h y las tasas de reciclado de efluente aumentaron a 5,5 m/h para un conjunto BDCG con un volumen total de 7,5 l (biorreactor más clarificador), el flujo de gas a través del tubo de aspiración aumentaba a 90 U/h. El gas que escapaba del biorreactor se hizo pasar a través de un condensador. Se detectaron acetona, etanol, butanol, propanol en el condensado. Esto se consiguió para ambos tipos de medio Endo. La consecución de las altas tasas de producción de gas endógeno necesario para la extracción por arrastre con gas de disolventes ABE, hace necesario tener densidades bacterianas en el biorreactor mayores de 30 g/l. Estas densidades de masa bacteriana con biorreactores solamente son posibles en caso de biorreactores de lecho granular bacteriano fluidizado. El mantenimiento de las densidades de masa bacteriana que superen los 40 g/l en forma de un lecho granular de bacterias fluidizado dentro del BDCG podía conseguirse fácilmente en el conjunto BDCG. Usando inóculo derivado de una mezcla de estiércol ruminal y aguas residuales, gránulos constituidos por un consorcio bacteriano mixto que incluía especies de clostridios se indujeron en el biorreactor. Usando PCR de ADN_r 16S y electroforesis en gel con gradiente de densidad (DGGE) se confirmó la presencia de las siguientes especies en los gránulos bacterianos: *C. cellobioparum*, *C. butyricum*, *C. acetylbutylicum*, *C. pasteurianum* y *C. perfringens*.

2. Producción continua de etanol a partir de glicerol a través de extracción por arrastre con gas en un conjunto BDCG. En esta aplicación, a un lecho granular fluidizado constituido por un consorcio mixto de bacterias anaerobias facultativas mesófilas se le suministró medio Endo suplementado con 20 g/l de glicerol. El HRT se redujo a 0,5 h y las tasas de reciclado de efluente aumentaron a 5,2 m/h para un conjunto BDCG con un volumen total de 7,5 l el caudal de gas a través del tubo de aspiración aumentó a 74 l/h. El gas que escapaba del biorreactor se hizo pasar a través de un condensador. Se detectó etanol en el condensado.

Estudios de laboratorio realizados por el inventor usando un prototipo a escala de laboratorio con un volumen operativo total de 7,5 l, el conjunto de biorreactor - decantador - clarificador - separador/colector de gas (BDCG) se hizo funcionar a los siguientes tiempos HRT: 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h y 0,5 h produjeron los siguientes resultados:

1. Con medio Endo suplementado con 17,5 g/l de sacarosa, el biorreactor dio una tasa volumétrica de producción de biohidrógeno de entre 200 y 290 mmol H₂/(h.l) a una temperatura mesófila de 40°C a medida que el HRT se reducía a 0,5 h para un conjunto BDCG con un volumen de trabajo total de 7,5 l. La relación de H₂ con respecto a CO₂ varía entre el 42,6% y el 51%. La densidad de biomasa bacteriana a medida que el HRT se reducía a 0,5 h aumentó a 40,0 g/l. El caudal de gas en el tubo de aspiración aumentaba a 94 U/h. La aplicación de PCR de ADN_r 16S y electroforesis en gel con gradiente de densidad (DGGE) confirmó la presencia de las siguientes especies en los gránulos bacterianos: *C. butyricum*, *C. acetylbutylicum*, *C. pasteurianum* y *C. perfringens*. El inóculo bacteriano se derivó de una mezcla de suelo, estiércol ruminal y aguas residuales

2. Con medio Endo suplementado con 17,5 g/l de sacarosa, el biorreactor dio una tasa volumétrica de producción de biohidrógeno de entre 100 y 200 mmol H₂/(h.l) a una temperatura termófila de 60°C a medida que el HRT se reducía a 0,5 h. El caudal de gas en el tubo de aspiración aumentaba a 90 l/h. El inóculo bacteriano se derivó de una mezcla de suelo, compost, estiércol ruminal y aguas residuales.

3. Usando un medio Endo donde la sacarosa se sustituyó por salvado de trigo a una concentración de 20 g/l, el biorreactor dio una tasa volumétrica de producción de biohidrógeno de 150 mmol H₂/(h.l) a una temperatura termófila de 60°C para un HRT de 4 h. Un lecho fluidizado heterogéneo constituido por partículas de salvado recubiertas de biopelícula, gránulos bacterianos y flóculos bacterianos se formó en el biorreactor. El inóculo bacteriano se derivó de una mezcla de suelo, compost, estiércol ruminal y aguas residuales.

4. Con medio Endo suplementado con 17,5 g/l sacarosa, el biorreactor dio una tasa volumétrica de producción de metano de entre 150 mmol H₂/(h.l) a temperaturas mesófilas a un HRT de 0,5 h.

REIVINDICACIONES

1. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal, **caracterizado** porque el reactor (1) comprende una vasija primaria del reactor (2) que tiene un lecho (3) de bacterias productoras de hidrógeno hacia su base (4), un flujo de entrada de biomasa vegetal (5), un flujo de salida de efluente de biomasa vegetal tratada (6) hacia su extremo operativamente superior (7), y una entrada de reciclaje de efluente de biomasa vegetal saturado en gas (13) en el lecho, y una vasija secundaria del reactor (8) que tiene una entrada de efluente de biomasa vegetal tratada (6) desde la vasija primaria del reactor (2), una salida de gas (10) y una salida de reciclaje de efluente de biomasa vegetal saturado en gas (11), conduciendo la salida de reciclaje de efluente de biomasa vegetal saturado en gas (11) a una bomba de recirculación (12) que, durante el uso, recicla efluente de biomasa vegetal saturado en gas desde la vasija secundaria del reactor (8) a la vasija primaria del reactor (2).
2. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el lecho (3) es un biorreactor de lecho fluidizado, como alternativa un biorreactor de lecho sedimentado, como alternativa adicional un biorreactor de lecho expandido.
3. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado** porque, donde el biorreactor es un biorreactor de lecho fluidizado, gas reciclado desde la vasija secundaria del reactor (8) a la vasija primaria del reactor (2) fluidiza el lecho de bacterias productoras de hidrógeno termófilas en la vasija primaria del reactor (2).
4. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las bacterias son bacterias mesófilas y/o termófilas.
5. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el efluente de biomasa vegetal reciclado está saturado con hidrógeno gaseoso producido en la vasija primaria del reactor (2).
6. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el lecho (3) de bacterias productoras de hidrógeno tiene al menos una entrada de alimentación de nutrientes inorgánicos (16).
7. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la vasija primaria del reactor (2) está ubicada dentro de la vasija secundaria del reactor (8) y la vasija secundaria del reactor (8) tiene una salida de efluente de biomasa vegetal no reciclado, en exceso (15).
8. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la vasija secundaria del reactor (8) funciona, durante el uso, como clarificador y/o separador de gas para efluente de biomasa vegetal tratada recibido de la vasija primaria del reactor (2).
9. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las bacterias productoras de hidrógeno son un consorcio mixto de bacterias mesófilas y/o termófilas que incluye bacterias celulolíticas anaerobias y, preferentemente, las bacterias que componen el consorcio mixto se seleccionan entre uno o más de una gama de hábitats mesófilos que incluyen aguas residuales primarias, suelos, compost y estiércol ruminal.
10. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las bacterias productoras de hidrógeno están adaptadas a temperaturas que varían entre 20°C y 80°C y, preferentemente, entre 25°C y 75°C.
11. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la biomasa vegetal tratada es insoluble y, preferentemente, es materia vegetal celulósica que se ha sometido solamente a un pre-tratamiento mínimo que es molienda y/o calentamiento en húmedo.
12. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la biomasa vegetal tratada es un hidrolizado soluble derivado de hidrólisis de materia celulósica.
13. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la biomasa vegetal tratada es una mezcla de materia celulósica insoluble y un hidrolizado derivado de hidrólisis de materia celulósica.

- 5 14. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la vasija primaria del reactor (2) tiene una base (4) sobre la cual el lecho (3) se forma durante el uso, preferentemente mediante uno o más de bolas de acero, grava, perlas de vidrio, partículas de ceniza de carbón y similares, y para el lecho (3) a formarse mediante un lecho de materia particulada (22) recubierto con partículas de carbón activado (23) y para la materia particulada del lecho (22) a estar recubierta con una biopelícula formada a partir de un consorcio mixto de bacterias termófilas y/o mesófilas.
- 10 15. Un biorreactor (1) para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la vasija primaria del reactor (2) tiene un medio de circulación (17), que comprende preferentemente un tubo de aspiración (18) a través del cual materia saturada en gas es dirigida desde la base del reactor (14) hacia arriba y un tubo descendente (19) a través del cual la biomasa parcialmente tratada que fluye desde una salida al tubo de aspiración (18) es devuelta a la base del reactor (14), para hacer circular biomasa vegetal parcialmente tratada dentro de la vasija del reactor (2).
- 15 16. Un método para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal usando un biorreactor (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque el método se realiza de acuerdo con las siguientes etapas:
- 20 a) introducir una biomasa vegetal en una vasija primaria del reactor (2) de un biorreactor (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que tiene un lecho (3) de bacterias productoras de hidrógeno termófilas y/o mesófilas hacia su base (4):
- 25 b) tratar la biomasa vegetal introducida con un consorcio mixto de bacterias productoras de hidrógeno que incluye bacterias celulolíticas anaerobias para producir hidrógeno;
- 30 c) transferir la biomasa vegetal tratada a una vasija secundaria del reactor (8) que tiene una entrada de efluente de biomasa vegetal tratada (6) a partir de la vasija primaria del reactor (2);
- 35 d) recoger hidrógeno gaseoso de la segunda vasija del reactor (8) y clarificar el efluente de biomasa vegetal tratada;
- e) recoger un sobrenadante de la biomasa vegetal tratada clarificada; y
- f) recircular biomasa vegetal tratada clarificada no recogida a la vasija primaria del reactor (2).
- 40 17. Un método para cribar, seleccionar y aislar bacterias o consorcios de bacterias mesófilas y/o termófilas formadoras de biopelícula que generan altos niveles de hidrógeno a partir de biomasa vegetal o a partir de hidrolizados solubles derivados de la hidrólisis de materias celulósicas que incluyen hemicelulosa usando un biorreactor (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque dicho método comprende las siguientes etapas:
- 45 a) crear un lecho (3) adecuado para colonización por un consorcio mixto de bacterias, en una vasija primaria del reactor (2) de un biorreactor (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para producir hidrógeno a partir de biomasa vegetal, a partir de un lecho de materia particulada (22) recubierto con partículas de carbón activado (23) ;
- 50 b) introducir un consorcio mixto de bacterias en la vasija primaria del reactor (2);
- c) introducir una biomasa vegetal tratada en la vasija de reacción primaria (2) del reactor (1); y
- d) aislar bacterias o consorcios de bacterias formadoras de biopelícula a partir de la materia particulada del lecho (22).