

# Selección del Inóculo en la Producción Biológica de Hidrógeno

**Resumen:** En la necesidad de estudiar bioprocesos limpios, el hidrógeno surge como una alternativa prometedora de energía. La biomasa provee un método para la obtención de hidrógeno y la degradación de desechos orgánicos a través de la fermentación. Un aspecto crucial es la inhibición de bacterias consumidoras de hidrógeno. Se investigó el efecto del tratamiento preliminar del inóculo para obtener una especie productora de hidrógeno a partir de consorcios naturales. El estudio se llevó a cabo en cultivos batch. Se realizaron dos tipos de tratamiento: enriquecimiento ácido y shock térmico. Se evaluaron tres tipos de consorcios: tierra, abono y lodos. El inóculo tratado se cultivó a pH 5,5 y se incubó a 35 °C. El tratamiento térmico resultó más eficiente e inhibió totalmente los microorganismos metanogénicos. El consorcio de lodos exhibió una velocidad de producción más alta y el abono una marcada tendencia al aumento de la producción.

**Palabras Claves:** Hidrógeno; Inóculo; Enriquecimiento; Shock térmico.

**Abstract:** In the need to study clean bioprocesses, hydrogen arises as a promising alternative of energy. Biomass provides a method for producing hydrogen and the degradation of organic waste through fermentation. A crucial aspect is the inhibition of bacteria consuming hydrogen. The effect of pretreatment of the seed was investigated to obtain a hydrogen-producing species from natural consortia. The study was carried out in batch tests. Two types of treatment were realized: acid enrichment and heat-shock. Three types of consortia were evaluated: soil, compost and sludge. The treated seed was grown at pH 5.5 and incubated at 35 °C. The heat treatment was more efficient and completely inhibited the methanogenic microorganisms. The consortium sludge exhibited a higher rate of production and compost a strong trend to increase production.

**Keywords:** Hydrogen; Seed; Enrichment; Heat-shock.

**María J. Pascualone, Rubén D. González**

Centro de Investigación y Transferencia en Ingeniería Química Ambiental (CIQA),

Facultad Regional Córdoba.UTN. Argentina.

Mail: mariapascualone@gmail.com

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La digestión anaerobia de residuos orgánicos produce gas metano que puede ser utilizado como fuente de energía. Sin embargo, el metano y el dióxido de carbono producto de su combustión son causantes del efecto invernadero (Chen et al. 2002). El hidrógeno es una alternativa prometedora de energía y puede producirse en el proceso de acidogénesis durante la degradación anaerobia de compuestos orgánicos (Chen et al. 2002).

El hidrógeno es considerado un combustible ambientalmente amigable (Lay et al. 1999), debido a su carencia de átomos de carbono u otros elementos precursores de contaminantes en su molécula. En la actualidad, es generado casi exclusivamente por el reformado con vapor de metano o por la electrólisis del agua, los cuales son procesos altamente demandantes de energía (Forsberg 2003). Surge así la necesidad de estudiar bioprocesos limpios y basados en recursos renovables para la producción de hidrógeno.

Dado a que la fermentación se puede llevar a cabo con cultivos mixtos se propone seleccionar inóculos provenientes de materiales de fácil obtención, no estériles, naturales y donde hubiera alto grado de anaerobiosis (Martinez et al. 2011). Se espera encontrar en estos consorcios una alta proporción de bacterias productoras de hidrógeno pertenecientes al género *Clostridium* y *Enterobacter* (Kapdan y Kargi 2006). Los organismos del género *Clostridium* son formadores de esporas. Las endosporas pueden ser muy resistentes al calor o productos químicos nocivos incluyendo ácidos y bases ya que no pueden ser destruidas fácilmente (Brock et al. 1994).

En un digestor anaeróbico, las bacterias metanogénicas están presentes y consumen el hidrógeno producido (Chen et al. 2002), por lo que un aspecto crucial del éxito de la hidrogenogénesis fermentativa es la inhibición de estos microorganismos. Dado que la mayoría de los metanógenos crecen en un intervalo de pH rela-

tivamente estrecho (pH 6 - 8) y no son formadores de esporas (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo 2009), con el fin de mejorar la producción de hidrógeno, se sugiere la utilización de un inóculo previamente enriquecido a pH bajo (Chen et al. 2002) o mediante un tratamiento de shock térmico (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo 2009).

Los objetivos del presente trabajo son determinar la eficiencia del tratamiento preliminar del inóculo mediante enriquecimiento ácido (por ajuste de pH del inóculo) o por tratamiento térmico y seleccionar el tipo de inóculo que resulte más adecuado en la producción biológica de hidrógeno para utilizarlos en una próxima etapa experimental de optimización del proceso.

## METODOLOGÍA

Se utilizó glucosa como sustrato en una concentración de 10 g/l y sales inorgánicas (Endo et al. 1982) (mg/l):  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3545,5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 125;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 100;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 9,8;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 25;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 5;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 135 y  $\text{NaHCO}_3$ , 6720.

### Condiciones de Reacción

Los experimentos se llevaron a cabo en viales de vidrio de 120 ml mediante ensayo batch. Los viales fueron gaseados inicialmente con nitrógeno para lograr la anaerobiosis y se añadió el inóculo pre-tratado (40 ml) y el medio de cultivo (40 ml). Luego, se colocaron en estufa de cultivo a temperatura controlada de  $35 \pm 1$  °C.

### Pre-tratamiento

Para eliminar los microorganismos no deseados y seleccionar aquellos productores de hidrógeno, se plantearon tres valores de pH para el enriquecimiento ácido:

pH 3, 4 y 5. El pH se ajustó con solución 1 N de HCl. En otro experimento se realizó un tratamiento térmico: en un baño de agua a 100 °C por 15 minutos. También se preparó un blanco sin ajuste de pH ni shock de calor. El inóculo tratado y el blanco se incubaron en la oscuridad a  $35 \pm 1$  °C durante 24 h (Chen et al. 2002).

Para cada una de las condiciones, el inóculo enriquecido se cultivó a pH 5,5 durante 96 horas para determinar la composición del biogás y la concentración de glucosa.

La simiente se obtuvo del reactor de barros activados de una planta de tratamiento de aguas residuales. Las características del inóculo fueron: pH 6,75; la concentración de sólidos suspendidos volátiles (SSV, para expresar concentración de biomasa), 990 mg/l y la concentración de sólidos totales (ST), 1640 mg/l.

### Tipos de Inóculo

A fin de hallar una alta proporción de bacterias productoras de hidrógeno, se evaluaron tres tipos de consorcios naturales: tierra de campo recolectada a una profundidad de 15 cm, compost comercial utilizado para abono de cultivos y barros de una planta de tratamiento de aguas residuales (Martinez et al. 2011) obtenidos del digestor de lodos purgados.

Los consorcios llevados a una concentración de 1000 mg/l de SSV, fueron pre-tratados mediante shock térmico en un baño de agua a 100 °C por 15 minutos. Cada inóculo se cultivó a pH 5,5. El contenido se extrajo a los 2, 4 y 7 días para determinar la composición del biogás, la concentración de glucosa y la variación de pH.

### Métodos Analíticos

El porcentaje de hidrógeno contenido en el biogás se determinó mediante cromatografía gaseosa en un

cromatógrafo HP 5890 series II plus, equipado con un detector de conductividad térmica (columna capilar HP-PLOT/Q a 60 °C por 3 minutos y 15 °C/min hasta 250 °C, temperatura del inyector de 200 °C, temperatura del detector de 260 °C, utilizando He como gas portador). La concentración de glucosa para calcular el consumo de sustrato, se midió a través de la cuantificación de azúcares reductores por la técnica colorimétrica del DNS (Miller 1959). La determinación de sólidos suspendidos volátiles y sólidos totales se realizó siguiendo los procedimientos de APHA Standard Methods (APHA et al. 1995).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pre-tratamiento

La Figura 1 muestra la concentración acumulada en porcentaje de hidrógeno después de 96 horas de incubación luego del pre-tratamiento ácido y térmico. En el enriquecimiento ácido se observó una marcada producción de hidrógeno. La evolución fue del orden: pH 4 > pH 5 > pH 3 > blanco, siendo 25,9 %, 21,5 %, 15,6 % y 15,4 % respectivamente. Sólo el cultivo enriquecido a pH 5 produjo metano (0,2 %), pero en menor cantidad que el blanco (0,3 %).

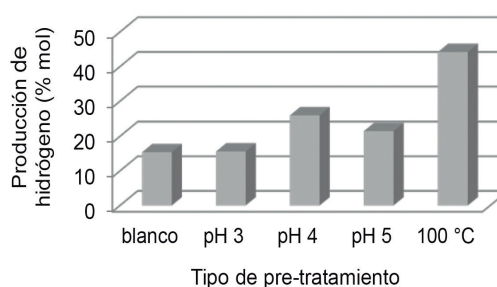


Figura 1. Porcentaje de hidrógeno acumulado (en moles) luego de 96 h de fermentación, para un inóculo pre-tratado.

Para el inóculo tratado a 100 °C la composición de hidrógeno fue de 44,2 % correspondiendo el resto a dióxido de carbono. Los microorganismos metanogénicos se inhibieron totalmente ya que no se detectó metano. El pre-tratamiento térmico resultó eficaz en la selección de microorganismos productores de hidrógeno.

Como se observa en la Figura 2 el inóculo con pre-tratamiento térmico logró mayor rendimiento de sustrato en producto que el control y que aquellos enriquecidos por tratamiento ácido, siendo del 46,0 %.

En todos los casos de enriquecimiento el consumo de glucosa fue mayor al 80 %, lo cual revela una buena degradación del sustrato.

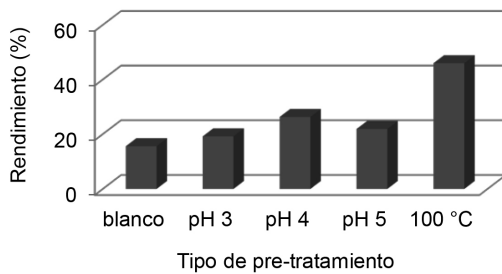


Figura 2. Rendimiento de sustrato en producto luego de 96 h de fermentación, según el pre-tratamiento aplicado al inóculo.

### Tipo de Inóculo

La Figura 3 presenta las curvas de evolución de hidrógeno producido según los distintos tipos de inóculo utilizado. El consorcio de lodos resultó ser el más eficiente en cuanto a cinética de reacción, al alcanzar su máxima producción a los 2 días de cultivo (20,4 % de hidrógeno). Así mismo, los resultados mostraron una disminución en la producción de hidrógeno al día 4 y se mantuvo relativamente constante hasta el día 7 (12,9 %).

Mientras que el abono y la tierra de campo comenzaron a producir biohidrógeno luego de los 2 días de

fermentación, mostrando un mayor requerimiento en tiempo de adaptación, lograron una concentración de hidrógeno más alta al día 7 (27,9 % y 26,5 % respectivamente).

En todos los casos el biogás estuvo constituido solo por hidrógeno y dióxido de carbono.

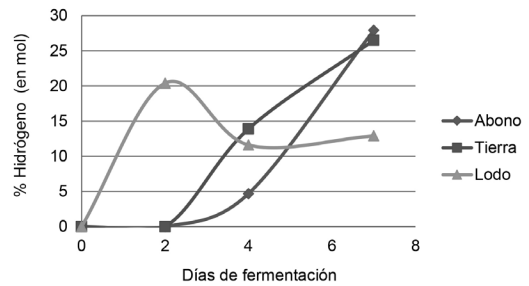


Figura 3. Porcentaje de hidrógeno (en moles) producido según el tipo de inóculo utilizado.

La Figura 4 muestra que el inóculo proveniente del abono comercial logró el mayor rendimiento de sustrato en producto que la tierra y el lodo, siendo 45,7 %, 41,4 % y 39,2 % respectivamente.

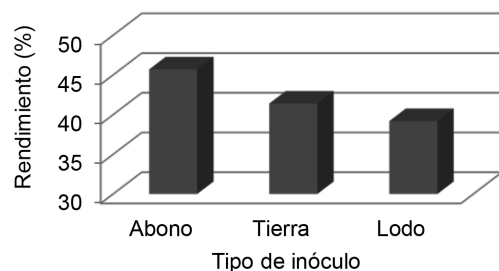


Figura 4. Rendimiento de sustrato en producto en la máxima producción de hidrógeno, según el tipo de inóculo.

El pH del cultivo disminuyó progresivamente hasta valores de 3,9, 3,7 y 3,6 para el abono, la tierra y el lodo respectivamente, consecuente de la producción de componentes ácidos propios del metabolismo bacteriano.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados experimentales se observa que el enriquecimiento del inóculo mediante shock térmico resultó eficaz en la inhibición de microorganismos metanogénicos, ya que no se detectó metano.

En principio, es factible la producción de biohidrógeno a partir de glucosa utilizando cultivos mixtos. El consorcio proveniente de lodos del digester de una planta de tratamiento de efluentes exhibió una velocidad de producción más alta, probablemente debido a que estos microorganismos están naturalmente sujetos a un proceso de degradación anaeróbica en su medio y no tienen que adaptarse partiendo de un

ambiente más aerobio, como en el caso de los consorcios del abono y tierra.

El abono reveló una buena tendencia al aumento de la producción y logró el mayor rendimiento de sustrato en producto. Esto sugiere realizar una pre-adaptación del inóculo al medio. Ajustando adecuadamente los parámetros del cultivo, se pueden obtener las condiciones óptimas para la acidogénesis y la producción de hidrógeno durante la degradación anaeróbica de materia orgánica.

Se prevé que los resultados de este estudio contribuyan a obtener conocimiento aplicable a la preservación de recursos naturales, como así también al desarrollo de una fuente de energía limpia.

## REFERENCIAS

- APHA, AWWA, WPCF. (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th edn. New York: American Public Health Association.
- Brock, TD., Madigan, MT., Martinko, JM., Parker, J. (1994). *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall, New York.
- Chen, CC., Lin, CY., Lin MC. (2002). Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58, 224-228.
- Endo, G., Noike, T., Matsumoto, J. (1982). Characteristics of cellulose and glucose decomposition in acidogenic phase of anaerobic digestion (in Japanese). *Proceedings of the Society of Civil Engineering*, 325, 61-68.
- Forsberg, C.W. (2003). Hydrogen futures and technologies. En *Rohsenow Symposium on Future Trends in Heat Transfer Massachusetts Institute of Technology Cambridge, Massachusetts*.
- Kapdan, I., Kargi, F. (2006). Biohydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569-582.
- Lay, J.J., Lee, Y.J., Noike, T. (1999). Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Research*, 33, 2579-2586.
- Martinez, V, García, R., Curutchet, G., Franco, J. (2011). Selección de consorcios bacterianos naturales para la producción de hidrógeno biológico. *HYFUSEN 2011*; 01, 118.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Valdez-Vazquez, I., Poggi-Varaldo, H. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1000-1013.