

# Efecto de la temperatura y del origen del inóculo en la producción de biohidrógeno

María J. Pascualone<sup>1</sup> y Rubén D. Gonzalez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Transferencia en Ingeniería Química Ambiental (CIQA), Facultad Regional Córdoba, UTN, Argentina.

<sup>2</sup> Escuela de Cuarto Nivel, Facultad Regional Córdoba, UTN, Argentina.

Fecha de recepción del manuscrito: 14/03/2017

Fecha de aceptación del manuscrito: 03/07/2017

Fecha de publicación: 15/09/2017

**Resumen**—El hidrógeno es considerado un combustible ambientalmente amigable y puede producirse en el proceso de acidogénesis durante la degradación anaeróbica de compuestos orgánicos. Surge así la necesidad de estudiar bioprocesos limpios y basados en recursos renovables para la producción de hidrógeno. Se investigó el efecto de la temperatura de cultivo y del uso de inóculos mixtos de distintos orígenes en la producción biológica de hidrógeno. El estudio se llevó a cabo mediante ensayo batch. Se realizó la incubación en tres condiciones de temperatura: 20, 35 y 45°C. Se evaluó tres tipos de consorcios naturales: tierra, compost comercial y barros de una planta de tratamiento de aguas residuales. El inóculo tratado mediante shock térmico se cultivó a pH 5,5 en un medio rico en glucosa. Las diferentes fuentes de inóculo y la temperatura afectaron la cantidad de hidrógeno producida. La concentración máxima de hidrógeno y la velocidad máxima de producción aumentó cuando la temperatura se incrementó. A 45°C el tiempo adaptación del inóculo fue mayor. El consorcio de barros exhibió la mayor velocidad de adaptación y el compost logró la concentración de hidrógeno más alta. Las diferencias en las comunidades microbianas fueron probablemente responsables del comportamiento diverso de los inóculos.

**Palabras clave**—Biohidrógeno, Fermentación, Cultivos mixtos, Temperatura.

**Abstract**—Hydrogen is considered an environmentally friendly fuel and can be produced in the acidogenic process during the anaerobic degradation of organic compounds. Emerges thus the need to study clean bioprocesses and based in renewable resources for the hydrogen production. The effect of growing temperature and use of mixed cultures of different sources in the hydrogen biological production was investigated. The study was carried out in batch tests. Incubation was performed under three temperature conditions: 20, 35 and 45°C. Three types of natural consortia were evaluated: soil, commercial compost and sludge from a wastewater treatment plant. The treated seed by heat shock was grown at pH 5.5 in a glucose rich medium. The different sources of seed and temperature affected the amount of hydrogen produced. The maximum hydrogen concentration and the maximum production rate increased as the temperature increased. At 45°C the adaptation time of the seed was higher. The sludge culture exhibited the highest adaptation rate and compost reached the highest hydrogen concentration. Differences in microbial communities were likely responsible for the diverse behavior of inocula.

**Keywords**—Biohydrogen, Fermentation, Mixed cultures, Temperature.

## INTRODUCCIÓN

Las necesidades energéticas mundiales crecen exponencialmente y las reservas actuales de combustibles fósiles se agotan. En suma a la creciente contaminación ambiental que está ligada principalmente a la utilización de hidrocarburos, diversos combustibles alternativos se han propuesto para sustituirlos. El hidrógeno es considerado una de las mejores opciones por ser un combustible ambientalmente amigable ya que el único subproducto final de su combustión es el agua (Ghimire et al., 2015), debido a su carencia de átomos de carbono u

otros elementos precursores de contaminantes en su molécula. Cuenta con la mayor energía contenida por unidad de masa, con un valor de 122 kJ/g el cual es casi 2,75 veces mayor que la de los combustibles fósiles (Keskin et al., 2012).

En la actualidad, es generado casi exclusivamente por el reformado con vapor de metano y, un mínimo porcentaje, por la electrólisis del agua, los cuales son procesos altamente demandantes de energía y utilizan fuentes no renovables (Ghimire et al., 2015).

La producción de hidrógeno a través de procesos biológicos emerge como una alternativa de mejor relación costo-beneficio en tanto que genera energía limpia, a partir de reciclar residuos y con mínima producción de desechos peligrosos (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Los estudios se han centrado en biofotólisis de agua utilizando

Dirección de contacto:

María J. Pascualone, Maestro M. López esq. Cruz Roja s/n Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba. Tel: 5986000, mariapascualone@gmail.com

algas y cianobacterias, foto-descomposición de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas y fermentación oscura a partir de carbohidratos con anaerobios. Ésta última parece ser la más favorable, ya que el hidrógeno podría generarse a velocidades más altas durante el proceso de acidogénesis (Cui y Shen, 2012).

Dado 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. Se espera encontrar en estos consorcios una alta proporción de bacterias productoras de hidrógeno pertenecientes al género *Clostridium* spp. y *Enterobacter* spp. (Kapdan y Kargi, 2006). Sin embargo, también puede consistir en bacterias que consumen hidrógeno como metanógenos (Bundhoo y Mohee, 2016), por lo que un aspecto crucial del éxito de la hidrogenogénesis fermentativa es la inhibición de estos microorganismos.

La temperatura es otro factor importante que influye en la actividad de las bacterias productoras de hidrógeno, siendo un parámetro de tipo selectivo pues afecta la velocidad de crecimiento y la ruta metabólica de los microorganismos. Las bacterias son capaces de producir hidrógeno en un rango de temperatura de 15 - 85°C (Kanai et al., 2005). Varios estudios han demostrado que los rendimientos de hidrógeno y las velocidades de producción aumentan a medida que la temperatura se incrementa (Danko et al., 2008). Mientras que otros indican que la velocidad de reacción disminuye por encima de los 50°C ya que se ve afectada la catálisis por hidrogenasas (Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009).

Los objetivos del presente trabajo son determinar el efecto de la temperatura de cultivo y seleccionar el tipo de inóculo que resulte más adecuado en la producción biológica de hidrógeno para utilizarlo en una próxima etapa experimental de optimización del proceso.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *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 obtenido del digester de lodos purgados.

### *Condiciones de reacción*

Los experimentos se llevaron a cabo en viales de vidrio de 120 ml mediante ensayo batch, con un volumen de trabajo de 80 ml. Los viales fueron gaseados inicialmente con nitrógeno para lograr la anaerobiosis.

Los consorcios llevados a una concentración de sólidos suspendidos volátiles, (SSV para expresar concentración de biomasa) de 1000 mg/L, fueron pre-tratados, a fin de eliminar los microorganismos no deseados y seleccionar aquellos productores de hidrógeno, mediante shock térmico en un baño de agua a 100°C por 15 minutos y se incubó en la oscuridad a 35 ± 1°C durante 24 horas. Luego se añadió el medio de cultivo (40 ml) a pH 5,5 y se colocaron en

estufa de cultivo a temperatura controlada de 35 ± 1°C durante 168 horas (7 días) para determinar la composición del biogás, la concentración residual de sustrato y la variación de pH.

El medio de cultivo se preparó utilizando glucosa como sustrato en una concentración de 10 g/L y sales inorgánicas (Chen et al., 2002) (mg/L): NH<sub>4</sub>Cl, 3545,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 125; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 100; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 9,8; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 25; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 135 y NaHCO<sub>3</sub>, 6720. El pH inicial se ajustó con solución 1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### *Temperatura de cultivo*

Para evaluar el efecto de la temperatura, se cultivó una alícuota del consorcio de barros pre-tratado en medio fresco tal como se describió anteriormente. Los viales se incubaron a temperatura controlada de 20, 35 y 45°C.

### *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 se realizó siguiendo procedimientos estandarizados (APHA et al., 2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Efecto de la temperatura*

La Fig. 1 muestra las curvas de evolución de hidrógeno producido según las distintas temperaturas de incubación. En todos los casos el biogás estuvo constituido solo por hidrógeno y dióxido de carbono, demostrando la eficiencia del tratamiento térmico preliminar al inóculo.

La concentración máxima de hidrógeno (% v/v) en el biogás aumentó cuando la temperatura se incrementó, siendo de 11,1; 22,2 y 25,6 para 20, 35 y 45°C respectivamente. Aunque la diferencia de composición para las condiciones de 35 y 45°C no fue estadísticamente significativa.

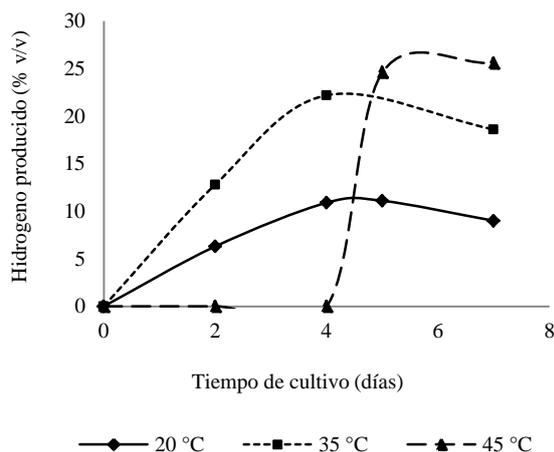


Fig. 1. Concentración de hidrógeno a diferentes temperaturas.

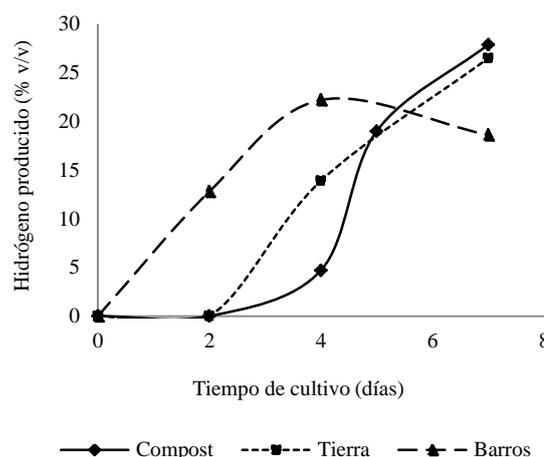


Fig. 2. Concentración de hidrógeno según el tipo de inóculo.

La velocidad máxima de producción de hidrógeno fue mayor a medida que aumentó la temperatura de cultivo hasta 45°C. Esto puede atribuirse a que la solubilidad de la mayoría de las sales aumenta con la temperatura de manera que la materia orgánica es más accesible para los microorganismos aumentando así la velocidad del proceso. Pese a dichos atributos, los sistemas termofílicos son especialmente apropiados para el tratamiento de materias primas que contienen agentes patógenos, o bien para ser acoplados a un proceso con calor residual asociado. De lo contrario, la entrada de energía necesaria para la operación en régimen termofílico eleva los costes de operación de forma considerable (Hawkes et al., 2007).

También se observaron diferencias en los tiempos de adaptación del inóculo al medio. A 45°C la producción de hidrógeno comenzó luego de 4 días de fermentación mostrando un mayor requerimiento en tiempo adaptación. Mientras que los cultivos a 20 y 35°C exhibieron un comportamiento similar, al lograr la mitad de su producción antes del día 2 y alcanzando su máximo a los 4 días de cultivo, la concentración máxima de hidrógeno a 35°C fue de dos veces mayor que en el cultivo a 20°C.

### Efecto del origen del inóculo

La Fig. 2 presenta las curvas de evolución de hidrógeno producido según los distintos tipos de inóculo utilizado. El consorcio de barros resultó el más eficiente en cuanto a velocidad de adaptación al medio, al lograr la mitad de su producción (11,1 % de hidrógeno en la mezcla gaseosa) en el menor tiempo, antes del día 2, y alcanzando su máximo a los 4 días de cultivo (22,2 %). Asimismo, los resultados mostraron una leve disminución en la concentración de hidrógeno hasta el día 7 (18,6 %).

Mientras que los consorcios provenientes de compost y de tierra de campo comenzaron a producir biohidrógeno después de los 2 días de fermentación, mostrando un mayor requerimiento en tiempo 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.

La mayor capacidad de adaptación exhibida por el consorcio de barros proveniente del digestor de una planta de tratamiento de efluentes, se debe probablemente 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 compost y tierra. Aunque también puede relacionarse a otros múltiples factores difíciles de fundamentar.

El rendimiento de sustrato en producto, parámetro importante del proceso, se calculó en el punto de máxima concentración de hidrógeno en el biogás. El inóculo proveniente del compost comercial logró el mayor rendimiento (% hidrógeno/g.L<sup>-1</sup> glucosa) que aquel originario de la tierra y el barro, siendo 25,4; 18,9 y 18,5 respectivamente.

En todos los casos, el pH del cultivo disminuyó progresivamente hasta valores de 3,9; 3,8 y 3,7 para el cultivo de compost, barro y tierra respectivamente, consecuente de la producción de componentes ácidos propios del metabolismo bacteriano.

### CONCLUSIONES

El efecto de la temperatura de cultivo y del origen del inóculo en la producción de biohidrógeno por fermentación oscura a partir de cultivos mixtos se estudió en este trabajo.

La producción de hidrógeno en el sistema experimental propuesto resultó viable y fue corroborado mediante cromatografía gaseosa. El pre-tratamiento al inóculo mediante shock térmico fue eficaz en la inhibición de microorganismos metanogénicos, ya que no se detectó metano.

Las diferentes fuentes de inóculo y la temperatura afectaron significativamente la cantidad de hidrógeno producida. Tanto la concentración máxima de hidrógeno en el biogás como la velocidad máxima de producción de hidrógeno aumentaron cuando la temperatura de incubación se incrementó. Aunque a temperaturas más altas el tiempo de adaptación fue mayor. Se considera que 35°C es la temperatura óptima para el proceso ya que la concentración

máxima de hidrógeno fue de dos veces mayor que en el cultivo a 20°C y sin diferencia significativa comparando con el cultivo a 45°C. Además, la principal desventaja del proceso de fermentación anaerobia termófila es el requisito de energía para el calentamiento y mantenimiento.

En cuanto al uso de cultivos mixtos, el consorcio de barros proveniente del digestor de una planta de tratamiento de efluentes exhibió la mayor velocidad de adaptación. Aunque el compost logró la concentración de hidrógeno más alta (27,9 %) y el mejor rendimiento de sustrato en producto. Esto sugiere emplear el compost como inóculo en el proceso, realizando una pre-adaptación al medio.

Las diferencias en las comunidades microbianas fueron probablemente responsables del comportamiento diverso de los inóculos. Pues una diversidad de especies productoras de hidrógeno coexiste con consumidoras de hidrógeno, que a su vez pueden ser diferentes según el origen del inóculo. De acuerdo al pre-tratamiento aplicado y a las condiciones de operación se desarrollarán aquellas bacterias que experimentan una mejor adaptación a las nuevas condiciones. Se espera determinar por análisis filogenético las especies dominantes en el sistema.

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

- [1] APHA, AWWA, WEF, (2013), *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 22<sup>nd</sup> edn. American Public Health Association, New York.
- [2] Bundhoo M. y Mohee R., (2016), "Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review", *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16):6713-6733.
- [3] Chen C. C., Lin C. Y. y Lin M. C., (2002), "Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process", *Applied Microbiology Biotechnology*, 58:224-228.
- [4] Cui M. y Shen J., (2012), "Effects of acid and alkaline pretreatments on the biohydrogen production from grass by anaerobic dark fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 37:1120-1124.
- [5] Danko A., Pinheiro F., Abreu A. y Alves, M., (2008), "Effect of methanogenic inhibitors, inocula type, and temperature on biohydrogen production from food components", *Environmental Engineering and Management Journal*, 7(5):531-536.
- [6] Ghimire A., Frunzo L., Pirozzi F., Trably E., Escudie R., Lens P. y Esposito G., (2015), "A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products", *Applied Energy*, 144:73-95.
- [7] Hawkes F. R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R. y Hawkes D. L., (2007), "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress". *International Journal Hydrogen Energy*, 32(2):172-184.
- [8] Kanai T., Imanaka H., Nakajima A., Uwamori K., Omori Y., Fukui T., Atomi H. y Imanaka, T., (2005), "Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", *Journal Biotechnology*, 116(3):271-282.
- [9] Kapdan I. y Kargi F., (2006), "Biohydrogen production from waste materials", *Enzyme and Microbial Technology*, 38:569-582.
- [10] Keskin T., Giusti L. y Azbar N., (2012), "Continuous biohydrogen production in immobilized biofilm system versus suspended cell culture", *International Journal Hydrogen Energy*, 37:1418-1424.
- [11] Miller G. L., (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- [12] Valdez-Vazquez I. y Poggi-Varaldo H., (2009), "Hydrogen production by fermentative consortia", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13:1000-1013.