

COMPARACIÓN DE LA GENERACIÓN DE HIDRÓGENO ENTRE UN CONSORCIO DE BACTERIAS NATIVAS Y UN CONSORCIO ESPECÍFICO

Evaristo Ávila-Vera^{1,2}, Suilma M. Fernández Valverde^{2*} David Alcántara Díaz³

¹ Departamento de Ciencias Básicas. Instituto Tecnológico de Toluca, Av. Tecnológico s/n, Ex-Rancho La Virgen, Metepec, Edo. de México.

² Departamento de Química, ³ Depto. de Radiobiología del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Apdo. Postal 18-1027, México D. F. 11801, México.

*smfv@nuclear.inin.mx; evaristovae@yahoo.com.mx

RESUMEN

En este trabajo se evalúa la producción de hidrógeno de los residuos generados en la cafetería del Instituto Tecnológico de Toluca (ITTol) en los que se cuantificaron proteínas, grasas y aceites, fibra, y carbohidratos. Para la producción de hidrógeno se utilizaron dos consorcios de bacterias, uno formado por las bacterias *Enterobacter cloacae*-*Clostridium butyricum* y el otro por bacterias provenientes de excretas de vaca. Las bacterias nativas obtenidas de excretas de vaca se trataron térmicamente para eliminar a las bacterias metanogénicas inhibidoras de la producción de hidrógeno. El proceso se realizó en biorreactores piloto de 18 litros en ambos biorreactores se obtuvo hidrógeno con concentraciones mayores al 50% en volumen, en el biorreactor con el consorcio de las bacterias *E. cloacae* y *C. butyricum*, se detectó el hidrógeno a las 7 horas y la velocidad de producción fue de 2.014 mmol H₂/Lxh con una producción máxima de 13.628 mmol H₂/L. El consorcio de las bacterias nativas después de ser tratadas térmicamente comenzó a generar hidrógeno hasta las 20 horas a una velocidad de 1.15mmol H₂/Lxh y con una producción máxima de 12.82 mmol H₂/L.

El trabajo es para presentación oral

Palabras clave: residuos biodegradables, *Enterobacter cloacae*, *Clostridium butyricum*, hidrógeno y metabolismo.

1.-Introducción

En la actualidad la economía energética mundial a excepción de Francia y Canadá, depende del uso de combustibles fósiles, los cuales han ocasionado diversos problemas ambientales como son el cambio climático y el calentamiento global. El hidrógeno es reconocido como la alternativa energética, de combustible limpio, más prometedora para sustituir a los combustibles derivados del petróleo[1], las ventajas que presenta son: a) tiene el mas alto contenido energético por unidad de peso entre los combustibles conocidos (142 KJ/g), b) es el único libre de carbón, c) al oxidarse genera agua como producto único, d) puede ser transportado como el gas natural doméstico y e) puede ser utilizado directamente en motores de combustión interna o en celdas de combustible [2-4].

El uso de técnicas biológicas es una alternativa viable, ya que son amigables con el ambiente y se pueden utilizar residuos orgánicos como materia prima [1,2]. Estos métodos se pueden dividir en dos categorías: la primera es por procesos fotosintéticos de bacterias cultivadas en condiciones anaerobias en presencia de luz y la segunda a través de fermentaciones en la oscuridad. [5].

Existen varios factores involucrados en la producción fermentativa de hidrógeno, entre los que se encuentran las condiciones de operación (pH, temperatura y velocidad de agitación), concentración y tipo de sustrato, además del tipo de inóculo. En el control del pH, se puede utilizar una solución amortiguadora de fosfatos, la cual ayuda a incrementar la producción de hidrógeno [2]. La fermentación en la oscuridad se realiza en condiciones anóxicas (no existe oxígeno presente como aceptor de electrones), cuando las bacterias crecen en sustratos orgánicos, éstos son degradados para generar más células, productos y energía.

Una gran ventaja de la fermentación es la rápida degradación de compuestos orgánicos simples y otros complejos que se encuentran en la basura y productos agrícolas [3]. La conversión microbiológica de residuos en hidrógeno ha atraído el interés de varios investigadores, debido a que es una excelente alternativa energética candidata para ser utilizada en el futuro [6]. Diversos trabajos a nivel mundial muestran que los sustratos más eficientes para la producción de hidrógeno son los azúcares como la glucosa y la sacarosa

[2]. En los residuos orgánicos el carbohidrato que se encuentran en mayor cantidad es el almidón [7,8], el cual es usado por las bacterias para producir azúcares, los cuales le sirven para la generación de hidrógeno. En varias investigaciones se han utilizado cultivos puros para la producción del gas y, con el objetivo de asegurar altos rendimientos se utilizan consorcios de microorganismos. Una gran cantidad de especies de microorganismos que generan hidrógeno por medio de fermentaciones en la oscuridad han sido reportados, pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*, utilizando como substrato principalmente carbohidratos[3]. Por ejemplo Fan *et al.* realizaron satisfactoriamente un tratamiento térmico a excremento de vaca para transformar la materia orgánica de agua residual a hidrógeno [9]; Lay *et al.* (1999) estudiaron un consorcio de bacterias tomado de una pila de composta, un campo de papa y lodo, para generar hidrógeno a través de sacarosa o glucosa en experimentos por lote [6,10].

En este trabajo se evalúa la producción de hidrógeno de los residuos generados en la cafetería del ITTol, utilizando dos consorcios de bacterias, uno formado por las bacterias *Enterobacter cloacae*-*Clostridium butyricum* y el otro por bacterias nativas provenientes de excretas de vaca después de pasar por un tratamiento térmico de purificación.

2.- Condiciones experimentales

2.1 Substrato

Se recolectaron diariamente durante un mes los residuos generados en la cafetería del ITTol y cada semana las muestras recolectadas se homogenizaron por el método de cuarteo [11], se separaron por tipo de residuo y se pesaron para ser caracterizadas por las técnicas analíticas correspondientes [12]. Para la experimentación, se prepararon muestras de 1kg de residuos orgánicos con las cantidades obtenidas en los residuos de la cafetería, se molieron y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

2.2 Medio de Cultivo

Se utilizó una solución conteniendo: 10.5 g/L de K_2HPO_4 , 4.5 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ y 0.001 de resazurina.

2.3 Inóculo

Se prepararon dos mezclas diferentes de bacterias, la primera formada por un consorcio de dos cepas de bacterias puras, una de *Enterobacter cloacae* y otra de *Clostridium butyricum*. El segundo consorcio fue una mezcla de microorganismos nativos, que se obtuvieron de excremento de vaca. A esta última, se le aplicó un tratamiento térmico a 105°C durante dos horas para eliminar a las bacterias que inhiben la producción de hidrógeno.

Para mantener cada una de las cepas viables y establecer las condiciones anaerobias, se calentaron 12 viales de 25 mL que contenían 10 mL de medio de cultivo de tioglicolato de sodio con resazurina, se inyectó nitrógeno hasta que el color de la solución cambió de rosa a amarillo, se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos, se inoculó 0.1 mL de la cepa de la bacteria *E. cloacae* a cada uno de 4 viales, se incubó a 35°C durante 24 horas y se guardaron en refrigeración. Se hizo el mismo procedimiento con las cepas de *C. butyricum* y bacterias nativas.

2.4 Generación de hidrógeno en los biorreactores.

Se usaron dos biorreactores de 18 litros, a cada uno se agregaron 10 litros de la solución de fosfatos junto con 1Kg de sustrato de residuos orgánicos, se cerraron herméticamente y se introdujo nitrógeno por la válvula de la tapa inferior durante 5 minutos, permitiendo la salida de aire por una de las válvulas de la tapa superior, se encendieron los sistemas de calentamiento y agitación, manteniéndose la temperatura a 37°C y la velocidad de agitación a 80 rpm. En uno de los biorreactores se inocularon 50 mL de las bacterias nativas de excremento de vaca y en el otro 25 mL de cada una de las cepas de las bacterias *E. cloacae* y *C. butyricum*. Se tomaron muestras de 40 mL para el análisis de hidrógeno los cuales se hicieron por triplicado en un cromatógrafo de gases Varian 3600, con detector TCD y una columna empacada de acero inoxidable: Porapak N mesh 80/100. Para el conteo de bacterias se tomaron 2 microgotas (obtenidas con jeringa para insulina), se colocaron en una cámara Petroff-Hausser y se contaron en un microscopio de contraste de fases.

3.- Resultados y discusión

Después de homogenización de la muestra por el método de cuarteo, se determinaron los porcentajes de los residuos orgánicos e inorgánicos obteniéndose un 14.5% de éstos últimos formados por materiales reciclables: vidrio, plástico y unicel y el 85% restante correspondió a los residuos orgánicos, de éstos, el mayor porcentaje fue de productos de maíz con un 58.4 % formado por tortilla, masa de tamal y hojas de maíz. Los productos de trigo, sobre todo pan, correspondieron al 17.98% y el 23.66% restante estaba compuesto por huevo, aguacate, mamey, plátano, carnes frías, mango y lechuga.

Los resultados de los análisis bromatológicos realizados, se presentan en la tabla 1, el $66 \pm 4\%$ en peso corresponden a los carbohidratos y reflejan el porcentaje de los residuos de trigo y maíz, lo que hace de éstos residuos un buen sustrato para el desarrollo metabólico de las bacterias productoras de hidrógeno.

Tabla 1. Porcentaje promedio de los diferentes componentes de los residuos orgánicos de la cafetería del ITTol.

Parámetro	% en peso promedio
Proteínas	10 \pm 1.9
Grasas y aceites	6 \pm 1.13
Fibra	12 \pm 0.53
carbohidratos	66 \pm 3.88
Cenizas	6 \pm 1.55

Ya que el almidón puede ser hidrolizado y aprovechado por las bacterias acidogénicas en la producción de hidrógeno. Las proteínas, fibra y lípidos presentes, también generan hidrógeno al ser degradados pero en menor proporción.

Las concentraciones de hidrógeno y bióxido de carbono obtenidas, se encuentran reportadas en la tabla 2, en las muestras tomadas a 0, 1, 3, 5 horas para ambos birreactores, no se detectó ni hidrógeno ni bióxido de carbono.

Tabla 2. Concentración de gases en el biogás

Tiempo (horas)	bacterias nativas %V/V		E. cloacae-C. butyricum %V/V	
	H ₂	CO ₂	H ₂	CO ₂
7	nd	nd	5	Nd
9	nd	nd	16	Nd
11	nd	nd	56	43
13	nd	nd	59	40
15	nd	nd	54	44
17	nd	nd	54	45
20	3	nd	54	45
46	20	12	54	45
65	54	39	54	45
89	56	44	54	45

En el biorreactor con el consorcio específico el hidrógeno se detectó a las 7 horas en cambio en el consorcio de bacterias nativas se observó hasta las 20 horas. Después del inicio de la producción de hidrógeno ambos gases se produjeron prácticamente de forma equimolar, si se toma en cuenta el inicio de la producción de hidrógeno, con el consorcio de las bacterias nativas las concentraciones máximas obtenidas, a las 89 horas, fueron de 56% y 44% para el hidrógeno y el bióxido de carbono respectivamente. Para el consorcio de las dos bacterias específicas, las concentraciones máximas se presentaron a las 13.30 horas y fueron de 59% y 40% para el hidrógeno y bióxido de carbono, éstas se mantuvieron prácticamente constantes hasta las 20 horas, después las concentraciones disminuyeron ya que las bacterias murieron.

La comparación de la producción de hidrógeno en los dos biorreactores, uno conteniendo el consorcio de bacterias nativas y el otro el consorcio de bacterias específicas, se muestra en la figura 1.

El consorcio de las bacterias *E. cloacae* y *C. butyricum* se adaptó rápidamente al medio, alcanzando la producción máxima a las 13.30 horas, después de iniciado el experimento, posteriormente la producción bajó, debido a que la disminución de la concentración de substrato y nutrientes inhibió el número de bacterias generadoras de hidrógeno, la velocidad de producción fue de 2.014 mmol H₂/Lxh con una producción máxima de 13.628 mmol H₂/L. El consorcio de las bacterias nativas alcanzó el máximo a las 89 horas

con una velocidad de 1.15mmol H₂/Lxh y con una producción máxima de 12.82 mmol H₂/L.

En el biogás producido en ambos reactores no se detectó la presencia de metano, lo que indica que el tratamiento térmico es eficiente para inhibir el crecimiento de los microorganismos metanogénicos y que ambos consorcios pueden ser utilizados para la producción de hidrógeno.

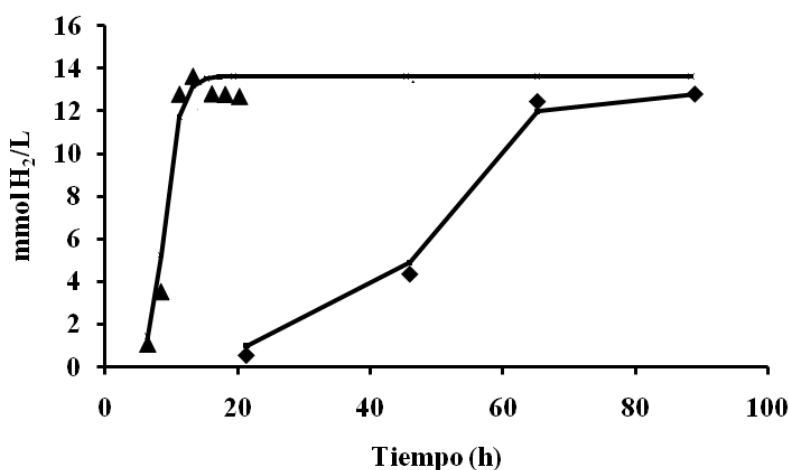


Figura 1. Producción de hidrógeno en (♦) consorcio de bacterias nativas y (▲) consorcio de *E. cloacae*-*C. butyricum*

El pH de la solución cambia durante el desarrollo del experimento y su variación en función del tiempo se presenta en la figura 2, allí se observa que para ambos consorcios de bacterias el pH se mantiene a 6.7 hasta las 10 horas, esto se debe a que los fosfatos presentes en la solución funcionan como amortiguador, evitando que el pH descienda rápidamente e inhiba la producción de hidrógeno. Después de ese tiempo el pH de la solución que contiene las bacterias específicas comienza a disminuir y a las 20 horas llega a 4.7, por lo que el intervalo de pH para la producción de hidrógeno, en el biorreactor con el consorcio de bacterias específicas fue de 6.6 a 4.7 y la mayor producción se dio en el intervalo de pH 5.7 a 6.7.

En cambio el consorcio de bacterias nativas, mantiene el valor de pH de 6.7 hasta las 16 horas y al iniciarse la producción de hidrógeno disminuye a pH de 6.2 obteniéndose el mayor rendimiento de hidrógeno, cuando el pH alcanzó un valor de 4.6, lo que indica que en el consorcio de bacterias nativas muy probablemente el hidrógeno no se genera ni por *Enterobacter cloacae* ni por *Clostridium butyricum*.

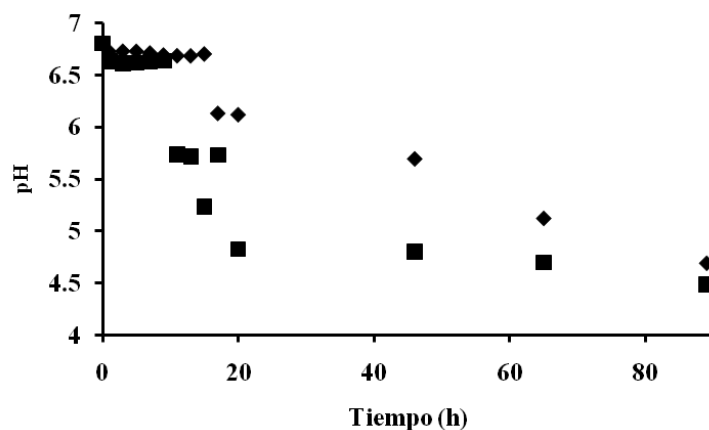


Figura 2. Comportamiento del pH durante el experimento (♦) consorcio de bacterias nativas y (■) consorcio de *E. cloacae*-*C. butyricum*

4.- Conclusiones

Los residuos orgánicos generados en la cafetería del ITTol., son un buen sustrato para generar hidrógeno, ya que fueron metabolizados por las bacterias presentes en los dos consorcios estudiados, debido al alto contenido de carbohidratos.

El tratamiento térmico aplicado a la muestra de excremento de vaca es adecuado para eliminar las bacterias metanogénicas, que consumen hidrógeno, permitiendo la supervivencia de las esporas de las bacterias productoras de hidrógeno.

El consorcio formado por las bacterias *E. cloacae* y *C. butyricum* se adaptó rápidamente al medio detectando la producción de hidrógeno a las 7 horas teniendo una diferencia, con las bacterias nativas de 13 horas. El contenido de hidrógeno en el biogás fue 3 % superior con el consorcio de las bacterias específicas que con el consorcio de las bacterias nativas, reflejándose en tan solo 0.8 mmol H₂/L del rendimiento máximo para la producción de

hidrógeno con las bacterias específicas en relación a las nativas. Lo que permite afirmar que ambos consorcios pueden ser utilizados para la generación de hidrógeno, la diferencia es el tiempo de inicio y la velocidad de la reacción.

5.- Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto CB-906 del ININ, los autores agradecen a los estudiantes de licenciatura del ITTol: Cristina Domínguez, Edgar Daniel Cortés y Yair Lozano por su valiosa participación en la realización de este trabajo.

6.- Referencias

- [1] H. Balat, E. Kirtay. Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. *Int. J. of Hydrogen Energy*. 2010; **35**: 7416-7426.
- [2] W. Ching-Hsiung, L. Wei-Bin, C. Jo-Shu. Feasibility study on fermentative conversion of raw and hydrolyzed starch to hydrogen using anaerobic mixed microflora. *Int. J. of Hydrogen Energy*. 2007; **32**:3849 – 3859.
- [3] M. Kotay, D. Das, Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials. *Int. J. of Hydrogen Energy*. 2008;**33**:258 – 263.
- [4] D. Das, T. N. Veziroglu, Advances in biological hydrogen production processes. *Int. J. of Hydrogen Energy*. 2008;**33**:6046-6057.
- [5] J-J. Lay, Y-J. Lee and T. Noike, Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res.* 1999;**33**:2579-2586.
- [6] Y-T. Fan, Y-H. Zhang, S-F. Zhang, H-W. Hou, B-Z. Ren, Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Biores. Technol.* 2006; **97**:500-505.
- [7] I.K, Kapdan, F. Kargi, Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microb. Technol.* 2006;**38**:569–82.
- [8] D. Levin and R. Chahine, Challenges for renewable hydrogen production from biomass. *Int. J. of Hydrogen Energy*. 2010; **35**: 4962-4969.
- [9] Y. Fan, C. Li, J-J. Lay, H. Hou, G. Zfiang, G. Zhang, Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost. *Biores. Technol.* 2004;**91**, 189-193.
- [10] J.-J. Lay, K.-S. Fan, J.-I. Chang, C.-H. Ku, Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *Int. J. of Hydrogen Energy*. 2003;**28**, 1361-1367.
- [11] Norma Mexicana. 1985. NMX-AA-015-1985. Protección al ambiente, contaminación del suelo, residuos sólidos municipales, muestreo, Método de Cuarteo. *Secretaría de comercio y fomento industrial*.
- [12] R. Lees. Food analysis: Analytical and Quality Control Methods for the Food Manufacturer and Buyer. *Leonard Hill Books. Blackie and Son Limited*. Bishopbriggs. Glasgow. Gran Bretaña. 1982.