

USO DE PRETRATAMIENTO Y NUEVO BUFFER PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO BIOLÓGICO

USE OF PRETREATMENT AND NEW BUFFER TO OPTIMIZE THE PRODUCTION OF BIOLOGICAL HYDROGEN

**Fernando Gerosa¹, Rodrigo García¹, Florencia Daneri¹, Marcelo Cabezas²,
Verónica Martínez², Juan Franco²**

(1) Dirección de Investigación de la Armada Argentina (DIIV-ARA), Laprida 201, Vicente López, Buenos Aires - Argentina

(2) Laboratorio de Pilas de Combustión PEM a Hidrógeno (LAB-PEM), CITEDEF, San Juan B. de La Salle 4397,
Villa Martelli, Buenos Aires – Argentina
(e-mail: fgerosa@citedef.gob.ar)

Recibido: 22/12/2016 - Evaluado: 26/01/2017 - Aceptado: 26/04/2017

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es optimizar la producción de hidrógeno biológico por fermentación oscura a partir de cultivos bacterianos mixtos, utilizando glucosa como fuente de carbono. Para ello se evaluó el efecto en rendimientos y porcentajes de hidrógeno, al aplicar un pretratamiento con calor del inóculo. Esto permitió alcanzar porcentajes mayores de hidrógeno y rendimientos algo superiores con respecto a cultivos sin pretratamiento. También se evaluaron distintas soluciones amortiguadoras para regular el pH del medio. Comparamos el *buffer* comercial MES con un *buffer* acético-acetato de preparación propia. Éste último mantuvo el pH en valores cercanos al pKa del ácido acético, que es uno de los principales productos de fermentación. Además, al ser más económico, se lo utilizó para realizar un escalado en lote en un biorreactor de 5 litros tipo tanque agitado, logrando obtener un rendimiento entre los más altos reportados para cultivos mixtos.

ABSTRACT

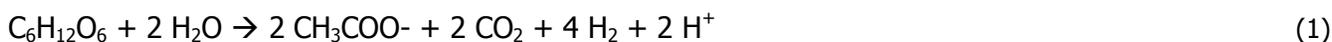
The objective of this work is to optimize the production of biological hydrogen by dark fermentation from mixed bacterial cultures, using glucose as carbon source. This paper evaluates the effect on the yield and percentage of hydrogen produced when applying a heat pretreatment to the inoculum. Results show that higher percentages of hydrogen and higher yields are obtained when applying this pretreatment. Different buffer solutions were also evaluated to regulate the pH of the medium, comparing commercially available MES buffer against an acetate based buffer prepared in our laboratory. The latter maintained the pH close to pKa of acetic acid, which is one of the main fermentation products. Additionally, this buffer was used to scale the batch process in a 5-liter stirred tank bioreactor, achieving yields among the highest reported for mixed cultures.

Palabras clave: biohidrógeno, consorcios microbianos, fermentación, optimización
Keywords: biohydrogen, microbial consortia, fermentation, optimization

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los hidrocarburos son la principal fuente de energía utilizada por el hombre. Sin embargo, el continuo y progresivo aumento en el uso de esta fuente de energía a lo largo del siglo XX hasta el presente, está asociado por gran parte de la comunidad científica al aumento de la temperatura media del planeta y a los efectos medioambientales que genera el calentamiento global. Esto se debe principalmente a que el uso de hidrocarburos provoca la emisión de gases de efecto invernadero como el CO₂, además de otros gases contaminantes que son nocivos para la salud. Por esta razón, la búsqueda de nuevas fuentes de energía que sean renovables y menos contaminantes para el medio ambiente resulta de gran interés para el desarrollo y sustentabilidad de las sociedades futuras. En este contexto, la utilización de hidrógeno para alimentar celdas de combustible tipo PEM es una alternativa atractiva, ya que este gas no es tóxico ni contaminante para el medio ambiente y posee una mayor densidad de energía en comparación con otros combustibles, como la gasolina y el etanol (Thomas, 2000; Wong *et al.*, 2014). Además, el hidrógeno es un vector de energía limpia, que sólo genera agua como residuo de su utilización para generar energía eléctrica en este tipo de celdas (Franco *et al.*, 2010; Kordesch & Simader, 1996). Sin embargo, a pesar de ser el elemento más abundante en el Universo, el hidrógeno no se encuentra en su forma molecular en la naturaleza, por lo que tiene que ser producido.

La mayoría de los métodos de producción de hidrógeno utilizados en la actualidad, son altamente dependientes de los hidrocarburos que pretenden reemplazar, como por ejemplo a partir del reformado de gas natural, gasificación de carbón, entre otros. Sin embargo, existen otros métodos de producción de hidrógeno que están siendo investigados y que presentan buenas perspectivas a futuro, como por ejemplo, la fermentación oscura de carbohidratos por parte de consorcios microbianos mixtos (Dincer & Acar, 2015; García & Franco, 2013; Kordesch & Simader, 1996; Lang *et al.*, 2011; Nikolaidis & Poullikkas, 2017). Estos microorganismos, al metabolizar la fuente de carbono, reducen moléculas de NAD⁺ a NADH y de ferredoxina a ferredoxina reducida. Para poder continuar con el metabolismo celular, estas moléculas deben volver a oxidarse. Las enzimas hidrogenasas toman los electrones provenientes de NADH y ferredoxina reducida para producir hidrógeno, permitiendo así la oxidación de estos intermediarios de reacción, utilizando H⁺ como aceptor final de los electrones. Idealmente, según la estequiometría del catabolismo de glucosa por la vía de formación de acetato (que es la vía más favorable para la formación de hidrógeno) se pueden obtener un máximo de 4 moles de H₂ por mol de glucosa consumida (Ecuación 1). De esta forma, los microorganismos generan la energía química necesaria para su crecimiento en forma de ATP, produciendo una mezcla de H₂ y CO₂ como subproducto de la fermentación (Cheng *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2016; Saady 2013). Esta mezcla de gases tiene la ventaja de que puede ser utilizada directamente en una pila de combustible PEM, ya que el CO₂ no contamina los componentes de la celda. Además, este tipo de las celdas de combustible nos permite estimar el porcentaje de hidrógeno presente en una muestra de biogás, ya que solamente el hidrógeno es consumido y el dióxido de carbono no (Martínez *et al.*, 2012).



La fermentación oscura por cultivos bacterianos mixtos presenta algunas dificultades que deben solucionarse para alcanzar mayores rendimientos y poder ser así una alternativa competitiva dentro de las energías alternativas. En primer lugar, los cultivos mixtos utilizados para realizar la fermentación están conformados por diferentes tipos de microorganismos, de los cuales algunos son capaces de producir hidrógeno, mientras que otros lo utilizan como sustrato para generar diferentes subproductos (como por ejemplo las bacterias homoacetogénicas o las metanogénicas que generan ácido acético y metano respectivamente, a partir del hidrógeno y dióxido de carbono) (Cheng *et al.*, 2007; Saady, 2013). Este inconveniente puede solucionarse aplicando diferentes pretratamientos de los inóculos que permitan seleccionar los microorganismos que producen hidrógeno y eliminar a los que lo consumen (Wong *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2016; Zumar Bundhoo *et al.*, 2015). Esto se debe a que algunos microorganismos son capaces de formar estructuras altamente resistentes llamadas esporas en respuesta a un estrés físico, como por ejemplo las bacterias productoras de

hidrógeno del género *Clostridium*, que se encuentran presentes en gran porcentaje en aguas cloacales (Brock *et al.*, 1994; Kapdan & Kargi, 2006; Olguín-Araneda *et al.*, 2015). De esta manera, se han investigado diferentes tipos de pretratamientos, como tratamientos con ácidos o bases, con calor, entre otros (Ren *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2014; Zumar Bundhoo *et al.*, 2015). En este trabajo se determina el efecto del pretratamiento con calor sobre la producción de hidrógeno mediante fermentación por cultivos mixtos provenientes de aguas cloacales, utilizando glucosa como sustrato. Por otro lado, se estima la efectividad para regular el pH de diferentes soluciones amortiguadoras (*buffer*) y sus efectos en la producción de hidrógeno. Algunos autores utilizan el *buffer* comercial MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico monohidratado) de pKa 6,15 (Logan *et al.*, 2002; García *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2012), que tiene la propiedad de no formar complejos con iones metálicos, pero tiene un elevado costo. Por este motivo, se estudia el efecto de utilizar una solución amortiguadora de preparación propia con acetato de sodio y ácido acético, a un pH de 5,2. La elección de este *buffer* se basa en que uno de los principales productos de este tipo de fermentación es el ácido acético (Cheng *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2016) y por lo tanto, el propio metabolismo bacteriano estaría generando su propia solución amortiguadora capaz de regular el pH en un valor cercano al pKa de ácido acético (4,76). A partir de éstos resultados, se elige la estrategia de escalado del proceso para trabajar en un biorreactor de tanque agitado de 5 litros y calcular el rendimiento. Además se diseñó un sistema de almacenamiento de gases que permita trabajar a una presión cercana a la atmosférica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Consortios microbianos

Los consorcios microbianos utilizados en este trabajo fueron extraídos de una planta de tratamiento de aguas cloacales ubicada a bordo de la corbeta ARA Guerrico perteneciente a la Armada Argentina. Dicho inóculo demostró ser el mejor productor de hidrógeno en trabajos previos, en donde se lo comparó con la producción de consorcios provenientes de compost comercial y de muestras de suelo (García *et al.*, 2012). En los casos en los que se aplicó un pretratamiento con calor, se mantuvieron los inóculos durante 1 hora a 75°C en baño termostático.

Incubación

La incubación se realizó en matraces Erlenmeyers de 500 ml. Se utilizaron 10 ml de inóculo y 100 ml de medio de cultivo conteniendo: 30 g/l de sustrato (D(+)-glucosa anhidra, Cicarelli ®), 2 g/l NH_4HCO_3 (P/A Cicarelli ®), 1,2 g/l KH_2PO_4 (P/A Biopack®), 200 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Uso técnico), 200 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (P/A Cicarelli ®), 200 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (P/A Cicarelli ®), 200 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (P/A Biopack®), 200 mg/l FeSO_4 (Uso técnico). La solución se amortiguó, según el caso, con 5 % v/v de solución reguladora acetato de sodio-ácido acético con un pH final de 5,2, o con 0,05 M (10,665 g/l) de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico monohidratado (*buffer* MES; J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) (Logan *et al.*, 2002). Los ensayos se realizaron de forma individual a diferentes tiempos de cultivo (24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas, según el caso). Para generar las condiciones anaeróbicas en las que se lleva a cabo la fermentación, se desplazó el aire dentro de los matraces con nitrógeno. Finalmente se taparon los matraces con un tapón de goma (en los casos en los que se calculó el rendimiento, se adaptó un manómetro a los tapones para poder medir la presión dentro de los matraces y calcular los moles de hidrógeno producidos) y se sellaron con cita para prevenir la fuga de gases o el desprendimiento del tapón por la presión. La incubación se realizó en una estufa a 38°C, sin agitación. El pH inicial y final de cada cultivo se midió utilizando un pH-metro Adwa AD12.

Porcentaje de H_2

Para estimar el porcentaje de hidrógeno presente en la mezcla de gases generada por el consorcio microbiano, se utilizó un método propio basado en el volumen de gas remanente en una jeringa. Este método se basa en que una celda de combustible tipo PEM sólo es capaz de consumir hidrógeno para generar energía eléctrica, mientras que

otros gases, como el nitrógeno y el dióxido de carbono, pasan a través de la pila sin ser consumidos. Para ello, se extrajo un volumen inicial (20 ml) del gas producido con una jeringa y se lo inyectó en la entrada de gases de una pila PEM de $0.5V \pm 0.1V$ acoplada a un motor eléctrico. El gas no utilizado por la pila se colectó con otra jeringa conectada a la salida de gases de la misma. El gas se hizo recircular a través de la pila hasta que el motor eléctrico dejó de funcionar. A partir del volumen de gas remanente en la jeringa (V_f) se pudo calcular el porcentaje de hidrógeno presente en la mezcla de gases (García *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2012).

Glucosa consumida

Las determinaciones de glucosa se realizaron con el Kit de Glicemia Enzimática AA de Weiner Lab. Dicho kit provee los reactivos con la enzima glucosa oxidasa (que cataliza la reacción de glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno) y la enzima peroxidasa. Esta última enzima cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno, que junto al 4-hidroxibenzoato y 4-aminofenazona (también provistos por el kit) permite obtener el compuesto coloreado quinonimina roja. Luego se determinó la absorbancia de las muestras a 505 nm utilizando un espectrofotómetro Numak modelo 721. Las muestras de cultivo se almacenaron congeladas a -18°C , para finalmente descongelar y determinar la cantidad de glucosa a tiempo inicial y final de cada cultivo. Los datos de glucosa consumida se utilizaron para calcular los rendimientos de los cultivos expresados en moles de H_2 producidos por mol de glucosa consumida.

Ensayo en biorreactor

Se realizó un ensayo en un biorreactor de tanque agitado Biostat A-Plus de 5 litros (Sartorius Stedim Biotech S.A.). Para ello se utilizaron 4,5 litros de medio de cultivo preparado de la misma manera que en los matraces Erlenmeyer, utilizando el *buffer* acético-acetato y 500 ml de inóculo, al que se le aplicó el pretratamiento con calor a 75°C durante 1 hora. Para generar la atmósfera anaeróbica necesaria para la fermentación se burbujeó nitrógeno dentro del cultivo hasta que el sensor de oxígeno del biorreactor alcanzó un valor estable cercano a cero. El biogás producido en la fermentación se almacenó en 3 tubos de acrílico de 5 litros cada uno, conectados al biorreactor por medio de mangueras y válvulas, que fueron llenados previamente con agua. De esta forma, el biogás generado en el biorreactor desplazó un volumen de agua de los tubos de almacenamiento. El agua desplazada se almacenó en otros tubos de reserva, que a su vez actuaron como cierre hidráulico del sistema. En cuanto se generó más gas del que los tubos eran capaces de almacenar, éste burbujeó hacia la atmósfera por los tubos de reserva de agua que se encontraban destapados, evitando que se genere sobrepresión dentro del reactor, manteniendo una presión en todo el sistema cercana a la atmosférica (Fig. 1).

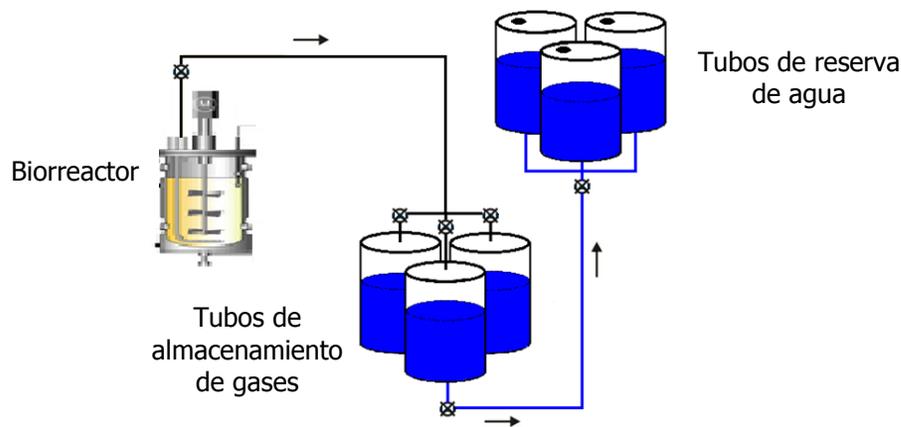


Fig. 1: Esquema del sistema de almacenamiento de gases. Línea negra: Biogás. Línea azul: Agua.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del pretratamiento con calor

Para determinar el efecto del pretratamiento del inóculo sobre la producción de hidrógeno, se realizaron ensayos independientes con y sin pretratamiento utilizando el *buffer* comercial MES, a diferentes tiempos finales. También se determinó el pH inicial y final de cada cultivo, ya que la producción de hidrógeno está asociada a la producción de ácidos grasos volátiles y al consecuente descenso del pH (Ecuación 1).

En primer lugar, se observó que el uso del pretratamiento permitió alcanzar un porcentaje de hidrógeno más alto en la mezcla de gases (valor máximo de 56,25 % a las 144 horas) (Fig. 2a) con respecto a cultivos sin pretratamiento (valor máximo de 50 % a las 120 horas) (Fig. 2b). En las primeras 48 horas, los cultivos con pretratamiento presentaron porcentajes de H₂ algo menores (17,5 % y 25 % sin pretratamiento, 10 % y 15 % con pretratamiento a las 24 y 48 horas respectivamente), pero esta tendencia se revirtió en las horas posteriores (Fig. 2c). Por otro lado, los porcentajes de hidrógeno disminuyeron luego de alcanzar su valor máximo (41,87 % y 40,83 % a las 144 y 168 horas) en los cultivos sin pretratamiento (Fig. 2b). Esto pudo deberse a que en los cultivos sin pretratamiento con calor, pueden estar presentes microorganismos que utilizan el hidrógeno generado como sustrato para formar otros productos finales. Estos microorganismos estarían siendo eliminados por el pretratamiento de los inóculos.

Al analizar los rendimientos obtenidos, en los cultivos con pretratamiento se alcanzó el valor máximo en el momento en el que ocurre la producción inicial de hidrógeno (2,05 mol H₂ /mol de glucosa a las 48 horas) (Fig 3). Luego, se observó un descenso abrupto del rendimiento a las 72 horas (0,76 mol H₂/ mol glucosa), pero luego aumentó progresivamente a 1,04 y 1,60 mol H₂/mol glucosa a las 96 y 120 horas respectivamente. En el caso de los cultivos sin pretratamiento, se alcanzaron los rendimientos más altos en las horas iniciales de producción (2,35, 2,32 y 2,93 mol H₂/mol glucosa a las 48, 72 y 96 horas) y luego el rendimiento cayó abruptamente a las 120 horas (1,33 mol H₂/mol glucosa) (Fig. 3). Como se mencionó previamente, esto pudo deberse a que en los cultivos sin pretratamiento estén presentes microorganismos que consuman hidrógeno, o bien que utilicen glucosa como sustrato sin producir hidrógeno, disminuyendo así el rendimiento.

Al comparar los rendimientos de las dos condiciones en las horas iniciales, el uso del pretratamiento con calor no resultó en una mejora neta en la producción de hidrógeno (Fig. 3). Sin embargo, a las 120 horas de cultivo se revirtió la tendencia inicial y se obtuvo un rendimiento mayor en cultivos con pretratamiento que sin pretratamiento (1,60 mol H₂/mol glucosa y 1,33 mol H₂/mol glucosa respectivamente) (Fig. 3).

La obtención de rendimientos iniciales más altos (así como porcentajes iniciales de hidrógeno más altos) en cultivos sin pretratamiento pudo estar asociada a que dentro del consorcio microbiano conviven gran cantidad de microorganismos de distintos géneros y especies. Por lo tanto, al realizar el pretratamiento, además de eliminar bacterias que consumen hidrógeno, es posible que se hayan eliminado microorganismos productores de hidrógeno que no sean capaces de formar esporas. Por ejemplo, algunas especies de género *Enterobacter*, como *E. cloacae* o *E. aerogenes* son productoras de hidrógeno, pero a diferencia de las bacterias del género *Clostridium*, no son capaces de formar esporas (Cheng *et al.*, 2007).

Evaluación del uso de diferentes soluciones reguladoras de pH

También se estudió el efecto de utilizar distintas soluciones reguladoras del pH en los medios de cultivo, tanto en la producción de hidrógeno como en los rendimientos alcanzados. Motivó estos ensayos, la necesidad de disminuir los costos a la hora de realizar un escalado. Además, al evaluar los valores obtenidos en los ensayos anteriores utilizando el *buffer* MES (pKa= 6,15) se pudo observar que al utilizar esta solución reguladora, con o sin pretratamiento (Fig. 2 a, b) los valores de pH cayeron muy por debajo del rango de amortiguación (que es máxima en el valor del pKa). Por estas razones se eligió comparar el *buffer* MES con una solución reguladora de

elaboración propia, preparada con acetato de sodio y ácido acético a pH 5,2. Para dicha comparación no se realizó el pretratamiento con calor.

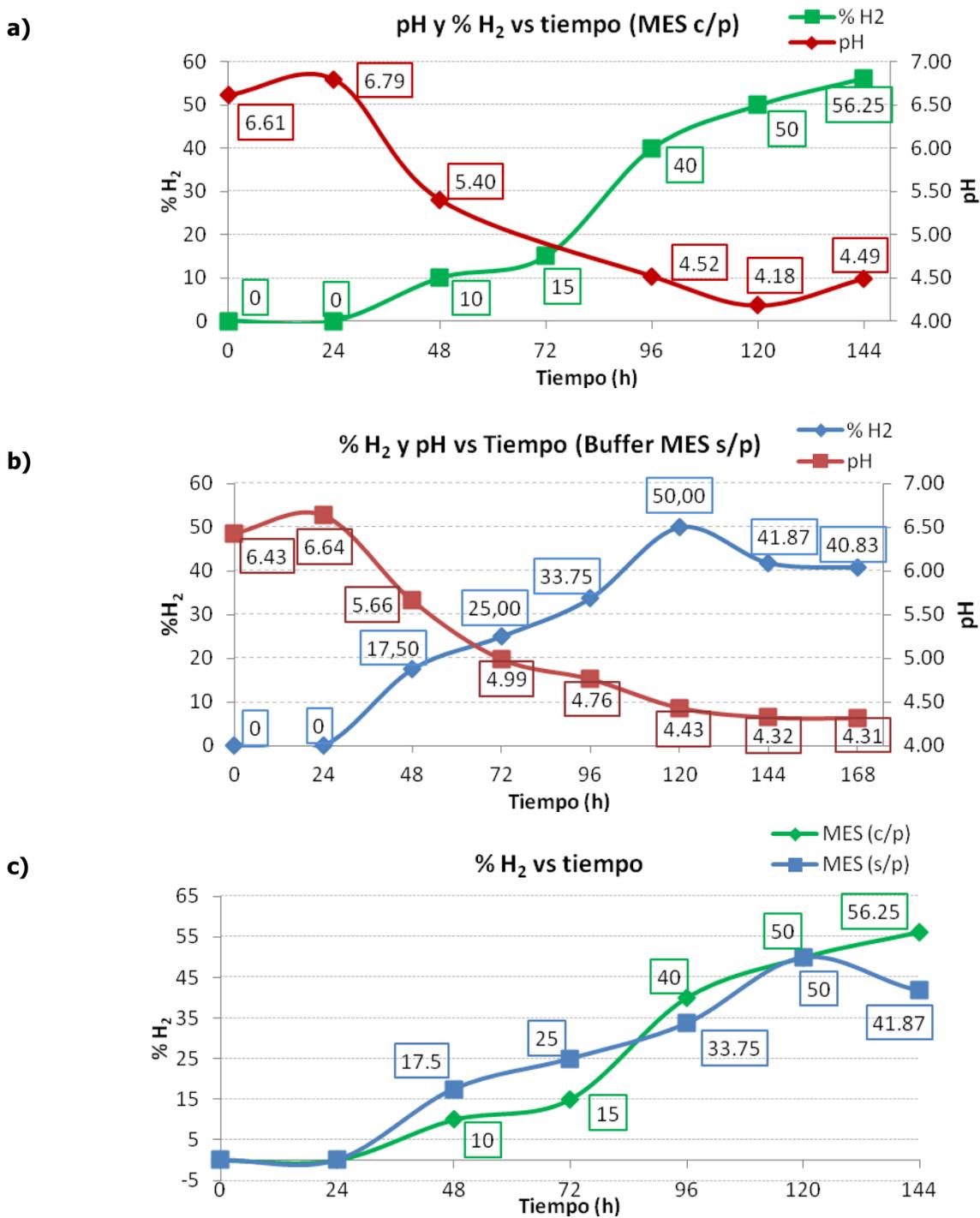


Fig. 2: a) Porcentaje de hidrógeno obtenido en la mezcla de gases y pH final en cultivos con pretratamiento (c/p). b) Porcentaje de hidrógeno y pH final en cultivos sin pretratamiento (s/p). c) Comparación de la evolución del % H₂ en el tiempo en ambas condiciones.

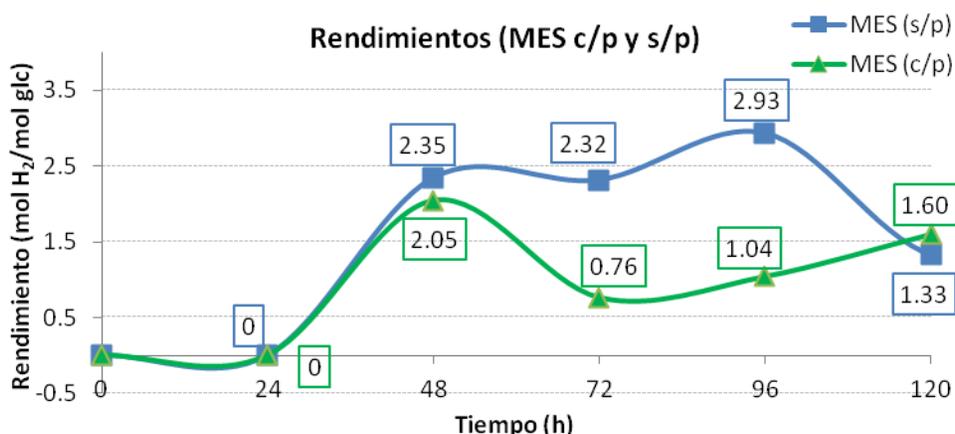


Fig. 3: Comparación de los rendimientos de formación de H₂ en cultivos con y sin pretratamiento (c/p y s/p) expresados en mol H₂ producido/mol glucosa consumida.

Al comparar los valores de pH final en ambos casos pudimos observar que al utilizar *buffer* MES se alcanzaron valores más bajos (pH final de 4,31 a las 168 horas). El pH final de la fermentación cayó muy por debajo del rango de amortiguación de una solución reguladora, por lo tanto el *buffer* MES no logró regular el pH del medio. En cambio al utilizar el *buffer* acético-acetato, la diferencia observada entre el pH inicial y final de los cultivos fue menor, siendo el pH final un valor similar al pKa del ácido acético (pKa ác. acético= 4,76, pH final= 4,80 a las 168 horas) (Fig. 4). Éste *buffer* acético-acetato se eligió como solución reguladora debido a que el ácido acético es uno de los principales productos de la fermentación microbiana en la producción de hidrógeno (Ecuación 1). Por lo tanto, el propio metabolismo bacteriano es capaz de generar ácidos grasos, que en presencia de sus sales que se encuentran en el *buffer*, son capaces generar una solución reguladora del pH en un valor similar a su pKa, que es de 4,76 (Fig. 4).

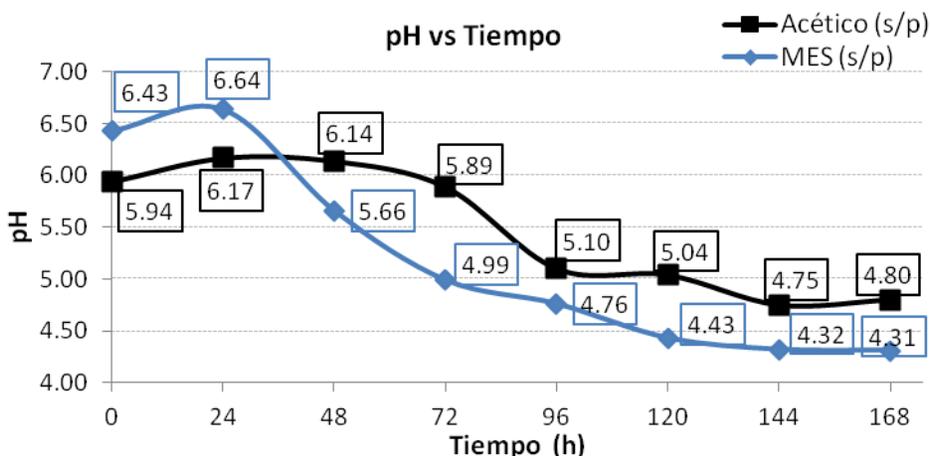


Fig. 4: Valores de pH final a cada tiempo de cultivo con *buffer* MES y acético-acetato sin pretratamiento (s/p).

Al analizar los porcentajes de hidrógeno obtenidos en ambos casos, se pudo observar que con la solución *buffer* MES se alcanzaron porcentajes más altos de hidrógeno en todos los puntos (Fig. 5a). También se observó que al utilizar el *buffer* acético-acetato, los cultivos demoraron más horas en comenzar la producción de hidrógeno (48 horas en el caso del MES y 96 horas para el acético-acetato) y se alcanzaron porcentajes de hidrógeno inferiores. A tiempos de cultivo más largos, la diferencia en los porcentajes finales de hidrógeno con ambas

soluciones reguladoras se hizo más estrecha (Fig. 5 a). El mismo efecto se observó al analizar los rendimientos en las dos condiciones. En los tiempos iniciales se obtuvieron rendimientos muy superiores con el *buffer* MES, pero a tiempos más largos (a partir de las 120 horas) se alcanzaron valores muy similares (Fig. 5b).

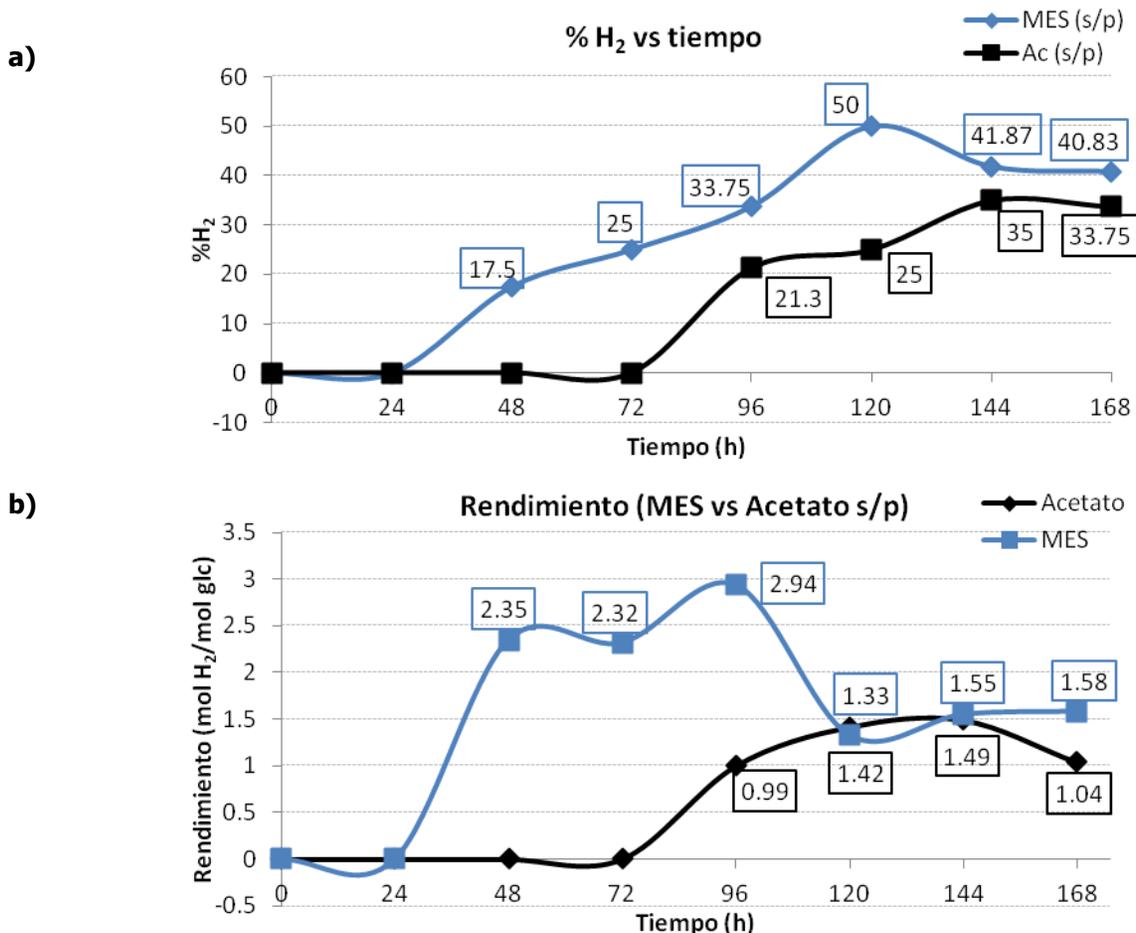


Fig. 5: a) Porcentajes de hidrógeno obtenidos en la mezcla de gases en función del tiempo con el *buffer* MES y acético-acetato sin pretratamiento. b) Comparación de los rendimientos de formación de H₂. A las 168 horas en el cultivo con *buffer* acético-acetato se observó el crecimiento de un hongo, lo que podría haber disminuido el rendimiento.

Escalado en biorreactor de 5 litros

Se realizó un primer escalado del cultivo en un biorreactor tipo tanque agitado de 5 litros, utilizando el *buffer* acético-acetato y aplicando el pretratamiento con calor de los inóculos. Para la elección de las condiciones de cultivo (*buffer* y pretratamiento), se tuvieron en cuenta tanto los resultados de la sección precedente como la necesidad de disminuir los costos para realizar el escalado del proceso. También se tuvo en cuenta los resultados obtenidos en ensayos en matraces Erlenmeyers, en los que se analizaron el porcentaje de hidrógeno producido con el *buffer* MES y el acético-acetato, pero esta vez implementando el pretratamiento con calor. Las diferencias entre ambas condiciones fueron menos notorias que en los ensayos sin pretratamiento mostrados en la sección anterior de este trabajo (15 % en ambos casos a las 72 horas, a las 96 horas 38 % para el *buffer* MES y 32,5 % para acético-acetato).

Una de las dificultades que presenta trabajar en matraces cerrados, es que la producción de hidrógeno puede verse inhibida a medida que aumenta la presión parcial de este gas. Por lo tanto acumular presión dentro de los matraces puede ser una gran desventaja (Cheng *et al.*, 2007; Kisieleska *et al.*, 2015). Por esta razón, a diferencia de los ensayos en Erlenmeyers, el sistema diseñado para almacenar el gas del biorreactor permite que no se acumule presión en los tubos (Fig. 1), favoreciendo así la producción de hidrógeno por parte del cultivo.

En este ensayo se produjo hidrógeno desde las 18 hasta las 72 horas de cultivo y se obtuvo un rendimiento total de 2,80 moles H₂/mol glucosa (Tabla 1), alcanzando un valor cercano al mejor rendimiento obtenido con el *buffer* MES y superando ampliamente los rendimientos alcanzados con los con el *buffer* acético-acetato en matraces Erlenmeyers.

Tabla 1: Valores de producción de hidrógeno obtenidos en el biorreactor, con un volumen de cultivo de 5 litros.

Vol. gas total (L)	Vol. H ₂ total (L)	% Total H ₂	Rendimiento (mol H ₂ /mol glc.)
21.06	14.50	68.85	2.80

CONCLUSIONES

En cuanto al uso del pretratamiento con calor de los inóculos se observaron dos efectos. En las horas iniciales los cultivos sin pretratamiento obtuvieron porcentajes de hidrógeno y rendimientos mayores (Fig. 2c y 3). Sin embargo esta tendencia se fue revirtiendo en tiempos de cultivo más largos. A partir de las 120 horas se obtuvieron porcentajes de hidrógeno y rendimientos mayores en cultivos con pretratamiento (Fig. 2a y 3). Esto indica que el pretratamiento con calor del inóculo genera cambios en la composición del mismo y en la consecuente producción de hidrógeno, viéndose levemente favorecida en cultivos con pretratamiento a tiempos largos. Además, en uno de los ensayos sin pretratamiento (*buffer* acético-acetato a las 168 horas) se observó el crecimiento de un hongo en el medio de cultivo. Por lo tanto, independientemente de los porcentajes de hidrógeno alcanzados, el pretratamiento con calor puede ser efectivo para eliminar cualquier microorganismo que pueda consumir la fuente de carbono sin producir hidrógeno. Teniendo en cuenta estos resultados, debería considerarse la aplicación o no del pretratamiento con calor (o cualquier pretratamiento) para cada inóculo en particular, ya que distintos inóculos provenientes de diferentes fuentes pueden tener una composición microbiana muy distinta, por lo que también pueden eliminarse microorganismos productores de hidrógeno menos resistentes.

Por otro lado, el uso del *buffer* acético-acetato presenta algunas ventajas con respecto al *buffer* MES. En primer lugar, el pH inicial de los cultivos con el *buffer* acético-acetato es de 5,94 frente a los 6,43 de MES. Algunos microorganismos consumidores de hidrógeno, como las bacterias metanogénicas, crecen a un pH óptimo entre 6 y 7. Por lo tanto comenzar el bioproceso con un pH inicial menor (que bajará aún más a medida que avance la fermentación) podría controlar la población microbiana metabólicamente activa dentro del cultivo. Además, con la utilización de este nuevo *buffer*, se logra regular el pH de la fermentación en un valor similar al pKa del ácido acético. Cuando la solución tiene un valor de pH cercano al pKa del ácido acético, la capacidad amortiguadora del *buffer* es máxima. Según los resultados observados con el *buffer* MES (pKa 6,15), éste no logra actuar como solución reguladora. A pesar de que inicialmente se obtienen mejores resultados con el *buffer* MES, a tiempos más largos de cultivo se observan resultados similares en cuanto a rendimiento y porcentajes de hidrógeno. Por estas razones, y teniendo en cuenta que el *buffer* acético-acetato es considerablemente más barato que el MES, la utilización de esta nueva solución reguladora resulta conveniente.

Por último, a partir del ensayo en el biorreactor y del diseño empleado para el almacenamiento de gases, se pudo apreciar el efecto que tiene trabajar a presiones elevadas en los cultivos, ya que esto afecta negativamente la producción de hidrógeno. Ante las mismas condiciones de cultivo pero acumulando la presión del gas, se obtienen rendimientos y porcentajes de hidrógeno muy inferiores. El valor de rendimiento alcanzado en el biorreactor con el

buffer acético-acetato (2,8 mol H₂/mol glucosa) fue casi tan alto como los alcanzados con MES en matraces Erlenmeyers, encontrándose entre los valores más altos reportados para cultivos mixtos con glucosa como sustrato, que se encuentran entre 2 y 2,89 mol H₂/mol glucosa (Kim & Kim, 2012; Ren *et al.*, 2008, Wong *et al.*, 2014). De esta manera pudo observarse el efecto negativo que tiene la acumulación de presión dentro de los matraces en la producción de hidrógeno, ya que desfavorece el pasaje de hidrógeno disuelto en el líquido a la fase gaseosa, además de inhibir la actividad enzimática de las hidrogenasas que catalizan la producción de hidrógeno (Cheng *et al.*, 2007; Kisieleska *et al.*, 2015).

A partir de los ensayos realizados en este trabajo se puede tener una idea de las condiciones y de los parámetros que se deben tener en cuenta a la hora de optimizar la producción de hidrógeno biológico mediante cultivos mixtos. La realización de duplicados y análisis estadísticos futuros, así como el análisis de diferentes parámetros y estrategias de cultivo (ya sea cultivos continuos, diferentes tipos de reactores o fuentes de carbono), nos permitirán mejorar los niveles de producción en escala de laboratorio para diagramar ensayos a escalas mayores, potenciando así el desarrollo de éste método renovable de producción de hidrógeno para generar energía eléctrica limpia y sustentable.

AGRADECIMIENTOS

A Marcelo Cabezas por colaborar en el diseño del sistema almacenador de gases, al Programa de Investigación y Desarrollo para la Defensa (PIDEFF 20/14) otorgado por el Ministerio de Defensa por financiar la presente investigación y a las instituciones a las que pertenecen los investigadores por el apoyo brindado.

REFERENCIAS

1. Brock, T.D., Madigan, M.T. & Martinko, J.M. (1994). *Biology of Microorganisms*, 8° edición. Prentice-Hall, New York.
2. Cheng, K.Y., Cord-Ruwisch, R. & Ho, G. (2007). *Limitations of bio-hydrogen production by anaerobic fermentation process: An overview*. Renewable Energy for Sustainable Development in the Asia Pacific Region Conference. Fremantle, Western Australia.
3. Dincer, I. & Acar, C. (2015). Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 11094-11111.
4. Franco, J.I., Fasoli, H.J., Sanguinetti, A.R. & Lavorante, M.J. (2010). *Tecnología Argentina en la ingeniería de pilas de combustión a hidrógeno con electrolito polimérico*. Records of World Congress & Exhibition Engineering. Buenos Aires, Argentina.
5. García, R.E. & Franco, J.I. (2013). Hydrogen production by mixed cultures. *Bioenergy systems, biological sources and enviromental impact*. Nova Science Publisher. New York. ISBN 978-1-62417-331-8.
6. García, R.E., Martínez, V.L., Franco J.I. & Curutchet, G. (2012). Selection of natural bacterial communities for the biological production of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 10095-10100.
7. Kapdan, I.K. & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 569-582.
8. Kim, D. & Kim, M. (2012). Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 2021-2017.
9. Kisieleska, M., Debowski, M. & Zielinski, M. (2015) Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 38, 1925-1933.

10. Kordesch, K. & Simader, G. (1996). *Fuel cells and their applications*. VCH. Weinheim, Alemania. ISBN 3-527-28579-2.
11. Lang, Y., Arnepalli, R. & Tiwari, A. (2011). A review on hydrogen production: methods, materials and nanotechnology. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11, 3719-3739.
12. Logan, B.E., Oh, S.E., Kim, I.S. & Van Ginkel, S. (2002). Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environmental Science & Technology*, 36, 2530-2535.
13. Martínez, V.L., García, R.E., Curutchet, G., Sanguinetti, A., Fasoli, H.J. & Franco J.I. (2012). Demonstration of the possibility to power a fuel cell with hydrogen derived from the fermentation of sugar. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 14920-14925.
14. Nikolaidis, P. & Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 597-611.
15. Olguín-Araneda, V., Banawas, S., Sarker, M. & Paredes-Sabaja D. (2015). Recent advances in germination of *Clostridium* spores. *Research in Microbiology*, 166, 236-243.
16. Rahman, S., Masdar, M., Rosli, M., Majlan, E., Husaini, T., Kamarudin, S., *et al.* (2016). Overview biohydrogen technologies and application in fuel cell technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 137-162.
17. Ren, N., Guo, W., Wang, X., Xiang, W., Liu, B., Wang, X., *et al.* (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33, 4318-4324.
18. Saady N. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 13172-13191.
19. Thomas, G. (2000). *Overview of storage development: DOE hydrogen program*. U.S. Department of Energy, Sandia National Laboratories. San Ramon, California. U.S. DOE Hydrogen Program 2000 Annual Review.
20. Wong, Y., Wu, T. & Juan, J. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471-482.
21. Zumar Bundhoo M.A., Mohee, R. & Ali Hassan, M. (2015). Effect of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 157, 20-48.

