



Valorización de residuos agroindustriales: producción biológica de hidrógeno y metano

Laura Fuentes, Victoria de la Sovera , Antônio Djalma Nunes Ferraz Júnior, Inés Etchelet, Patricia Bovio, Claudia Etchebehere.

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay, cetcbehere@iibce.edu.uy.

RESUMEN: Uruguay se propuso la meta de que un 30 % de los residuos agroindustriales y urbanos del país se utilicen para generar energía.

Nuestro grupo trabaja estudiando el proceso de digestión anaerobia utilizando microorganismos para producir biocombustibles. A través de estos procesos es posible producir, utilizando desechos orgánicos, tanto hidrógeno como metano, valorizando dichos residuos a la vez que se eliminan.

Asimismo, se enfoca en el estudio de las comunidades involucradas en estos procesos realizando estudios de biología molecular (secuenciación masiva, qPCR, etc) para analizar qué es lo que sucede en cada etapa y poder optimizar la producción.

En este trabajo se muestra por un lado los resultados en la producción de hidrógeno a partir de la co-digestión de suero de queso y yerba mate, ambos desechos abundantes en nuestro país; y por otro lado los resultados en la producción de metano a partir de desechos de la industria avícola, cuyos residuos representan el 28% de los residuos agroindustriales nacionales.

Estos estudios preliminares indicarían un aumento en la producción de hidrógeno al realizar la co-digestión de yerba y suero de queso respecto a la producción a partir de sólo suero. Por otro lado, para cinco residuos de la industria avícola ensayados en la producción de metano (sangre, cama de crianza, gallinaza, efluentes y barros grasos) se observó el mayor potencial para las camas de crianza con una producción de 300,8 ml de CH₄/ g SV sustrato.

PALABRAS CLAVE: digestión anaerobia, hidrógeno, metano, valorización de residuos.

1 INTRODUCCIÓN

Los cambios socioeconómicos de las últimas décadas junto con el aumento de la población a nivel mundial, desarrollo de la industria agroalimentaria, la intensificación de las explotaciones ganaderas, el aumento del consumismo, etc., han propiciado la producción de grandes cantidades de residuos orgánicos que ocasionan graves problemas ambientales (Wang et al., 2007).

Hoy en día, en la búsqueda de una solución para el tratamiento y/o eliminación de dichos residuos la valorización energética surge como una alternativa sumamente atractiva para

solucionar esta problemática. En este caso, nos enfocamos en la producción de hidrógeno y metano a partir de residuos orgánicos como forma de valorizar dichos residuos. Al proceso microbiológico que posibilita la producción de estos biocombustibles se le denomina digestión o fermentación anaerobia (Schink, 1997).

1.1. *El proceso de biodigestión*

La biodigestión anaerobia implica una compleja red trófica de microorganismos que convierten la materia orgánica en CH_4 y CO_2 . Entre ellos se destacan 3 grupos principales de microorganismos: bacterias acidogénicas, bacterias acetogénicas, y arqueas metanogénicas (Mosey, 1982; Guiot et al., 1992; Wirth et al., 2012).

En el proceso de degradación anaerobia del sustrato, los productos de la hidrólisis de la materia orgánica compleja son consumidos por las bacterias acidogénicas produciendo ácidos orgánicos volátiles, hidrógeno (H_2) y CO_2 . Teniendo en cuenta que tales reacciones son termodinámicamente favorables, las bacterias acidogénicas poseen las velocidades de crecimiento más elevadas del consorcio microbiano (Aquino y Chernicharo, 2005). Por otro lado, las reacciones acetogénicas son termodinámicamente desfavorables en condiciones estándar, aunque ocurren naturalmente en reactores anaerobios debido a la interacción entre los microorganismos metanogénicos y los acetogénicos. El hidrógeno producido en la acetogénesis debe ser continuamente removido para asegurar que la producción de acetato no sea interrumpida o disminuya drásticamente. La metanogénesis depende fuertemente de la disponibilidad de acetato, precursor de cerca del 70% del metano formado (Foresti, 1994; Leitão et al., 2006). Los principales factores que afectan la digestión anaerobia son la temperatura, pH, alcalinidad, macronutrientes adecuados (N, P, SO_4^{2-}) y micronutrientes (metales traza), tiempo metabólico adecuado, y la fuente de carbono para la síntesis como fuente de energía, DQO, TRH (Leitão et al., 2006).

La producción de hidrógeno se puede obtener por fermentación oscura siendo una de las tecnologías más atractivas, por su bajo costo y requiere configuraciones simples de reactores y menos energía al ser comparada con otras técnicas (Hallenbeck, 2009). Para favorecer la obtención de hidrógeno a partir de compuestos orgánicos es necesario alterar la cadena trófica de manera de evitar el último paso de consumo de hidrógeno por las bacterias metanogénicas y favorecer las bacterias fermentadoras productoras de hidrógeno así como también se deben evitar otros procesos en los cuales se consume hidrógeno (Hallenbeck, 2009).

El hidrógeno, “transportador” de energía, ha sido ampliamente estudiado, en virtud de ser 2,75 veces más energético que los combustibles fósiles (gasolina, propano, metano entre otros) y por generar agua como único subproducto (Chen et al., 2001). El mismo puede ser mezclado con otros gases para producir un combustible alternativo. Por ejemplo, un combustible alternativo gaseoso de quema particularmente limpia conocido como HYTHANE comprende una mezcla de hidrógeno y gas natural que presenta mayor poder calorífico (Sierens et al., 2000).

1.2. *Codigestión: Un nuevo enfoque*

A la mezcla de sustratos en el proceso de digestión anaerobia se da el nombre de co-digestión. La digestión de diversos sustratos busca equilibrar la relación C: N: P y las necesidades de minerales y metales requeridos para el proceso biológico anaerobio, en función de la diferente composición nutricional de diferentes sustratos (Mata-Alvarez et al., 2014).



Particularmente el suero de queso y los residuos de yerba mate se producen en grandes cantidades en nuestro país (Torrendel et al., 2008). Si bien ambos se producen en establecimientos separados su co-digestión podría significar un aumento de la producción de H_2 , con respecto a la producción individual, así como también una alternativa al tratamiento a estos residuos.

1.3 *Uso de técnicas moleculares para el estudio de comunidades microbianas*

Las herramientas moleculares basadas en el ADN se usan con frecuencia porque son rápidas y se pueden analizar varias muestras al mismo tiempo. En nuestro laboratorio hemos utilizado técnicas de qPCR, FISH, secuenciación de Sanger para revelar las comunidades microbianas involucradas. Más recientemente, se está utilizando la secuenciación masiva para identificar la composición taxonómica de varias muestras de reactor. Con estos métodos se detectan microorganismos cultivables y no cultivables. Esta es una ventaja importante porque la mayoría de los microorganismos de la naturaleza permanecen sin cultivar. Conocer la comunidad microbiana permitirá desarrollar estrategias para favorecer la producción de hidrógeno o metano según el caso (Ranjar et al., 2000).

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GENERAL

Valorizar diferentes tipos de residuos que se producen en nuestro país en grandes cantidades, produciendo a partir de ellos biogás o hidrógeno, dos gases que pueden ser utilizados como combustibles. Esto permitirá plantear una solución al problema de qué hacer con estos residuos a la vez que se obtiene energía de los mismos.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la producción de hidrógeno a partir de la co-digestión de suero de queso y yerba mate, ambos desechos abundantes en nuestro país.
- Estudiar la producción de metano a partir de diferentes tipos de desechos de la industria avícola.
- Realizar estudios moleculares para analizar la comunidad microbiana involucrada en estos procesos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 *Producción biológica de metano*

En el marco de los estudios realizados en nuestro laboratorio que evalúan la producción de metano a través de la digestión anaerobia, se evaluó el potencial bioquímico metanogénico de 5 residuos de la industria avícola: sangre, efluentes, barros grasos, gallinaza y cama de crianza. Estos ensayos se realizaron en batch utilizando el equipo AMPTS II.

Cada sustrato y el inóculo fueron previamente caracterizados (ST, SV, SSV, SST, DQO, humedad, etc) de acuerdo a las técnicas establecidas por Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMEWW) en la empresa NETUM SRL.

Se utilizó una relación sustrato-inóculo (S/I) de 0.5 en gramos de sólidos volátiles (SV), logrando en el volumen final (250 mL) una concentración de inóculo de 1,5% (m/v) en SV. Los ensayos se realizaron a 37 °C y por triplicado, utilizando como control positivo acetato de sodio y como control negativo el inóculo sin sustrato. Se midió el pH al comienzo y al finalizar el experimento (el mismo debe estar entre 6 y 8).

3.2 *Co-digestión de hidrógeno*

Se evaluó el rendimiento de la producción de hidrógeno en la co-digestión de residuo de yerba mate pre-tratado químicamente con KOH y suero de queso. Para esto se utilizó el equipo AMPTS II, anteriormente mencionado. Se utilizó compost como inóculo para la producción de hidrógeno ya que se sabe que el mismo posee microorganismos esporulados y por sus características (pH 5) no prevalecen microorganismos metanogénicos (Ueno et al., 1995) Los ensayos fueron realizados en batch con agitación en un volumen final de 200mL y una relación sustrato-inóculo (S/I) de 4 en gramos de sólidos volátiles (valor recomendable para sistemas fermentativos). Se utilizó una relación de suero de queso 20% y de yerba mate pretratada 80%. Como control se realizó un ensayo sin co-digestión (suero de queso como único sustrato) Los ensayos fueron realizados a 30°C y por triplicado.

3.3 *Estudios moleculares de las comunidades microbianas*

Para la cuantificación de bacterias productoras de hidrógeno se empleó la técnica de qPCR. Se realizó la amplificación del gen de la enzima hierro hidrogenasa (Fe-HyDA). Esta cataliza la oxidación reversible de hidrógeno molecular y está presente en las bacterias productoras de hidrógeno (Fang et al., 2006).

Para el proceso de metanogénesis se extrajo el ADN de la biomasa de cada inóculo utilizado y se realizó secuenciación masiva de genes del ARNr 16S y arquea. La secuenciación se realizó en la plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine en el IIBCE. El análisis de los datos obtenidos se realiza con el software QIIME. Este análisis, junto con la cuantificación por qPCR, nos permiten monitorear cualitativa y cuantitativamente las comunidades presentes en cada ensayo de potencial bioquímico de metano realizado para correlacionar resultados con las mismas.

4. RESULTADOS PRELIMINARES Y DISCUSIÓN

4.1 *Ensayos de actividad metanogénica.*

En lo que respecta a la producción de metano, de los residuos evaluados hasta el momento, se han observado resultados del potencial bioquímico de metano (PBM) en el entorno de lo esperado de acuerdo a lo reportado en bibliografía, observando la mayor producción para la digestión de las camas de crianza (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados preliminares de la producción bioquímica de metano (PBM) para cinco residuos diferentes de la industria avícola.

Sustratos	Sangre	Efluente	Barros Grasos	Gallinaza	Cama de crianza
-----------	--------	----------	---------------	-----------	-----------------

PBM (NmL CH ₄ /gSV sustrato)	(250,5± 4,2)	(45,5± 11,1)	(161,4 ± 3,6)	(252,7 ± 9,1)	(300,8 ± 3,2)
PBM literatura (NmL CH ₄ /gSV sustrato)	500 ¹ / 250 ⁵	-	278 ²	(291-395) ³	(335 ± 4,0) ⁴

1. *Bioresour. Technol.* 83 (2002) 13–26. 2. Lopez-Moreda 3. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, 171, 117-127. 4. *Biomass and Bioenergy* 32 (2008) 1195– 1201. 5. *Waste Management* 34 (2014) 204–209.

Hasta el momento hemos cuantificado por qPCR cuatro inóculos (octubre 2018- enero 2019), uno por mes, utilizando el gen *mcrA* (metil coenzima M reductasa) (Luton et al., 2002). Este gen se correlaciona con la presencia de microorganismos metanogénicos ya que codifica para la enzima involucrada en el último paso de la metanogénesis. Los resultados del análisis de estos inóculos muestran que el número de copias de dicho gen por ng de ADN se mantuvo relativamente constante (1,38E+07- 8,99E+07 copias_{mcrA}/ngADN).

4.2 Ensayos de producción de hidrógeno.

Como resultados preliminares en la producción de hidrógeno se observaron mejores rendimientos en la codigestión de yerba mate y suero de queso respecto a la digestión con el suero de queso como único sustrato. Los resultados obtenidos se indican en la figura 1.

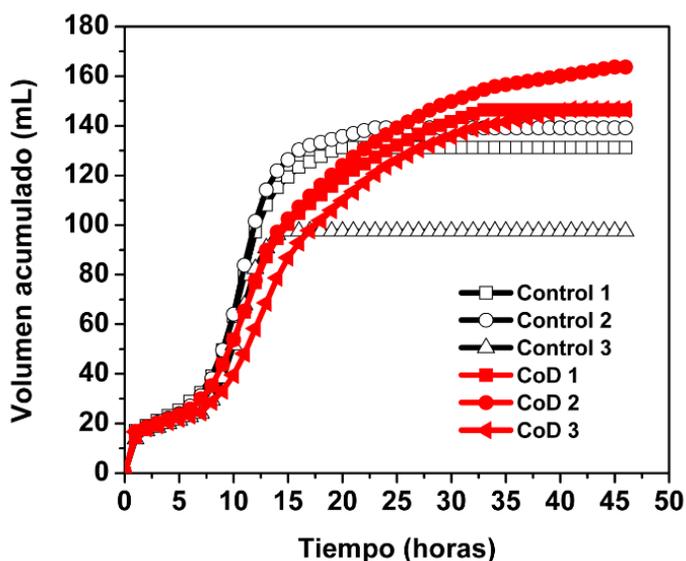


Figura 1. Volumen de producción de hidrógeno en horas. El control se corresponde al suero de queso sin yerba. CoD corresponde a la codigestión de suero de queso con yerba mate. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Estos resultados preliminares indicarían mayor producción de hidrógeno en la codigestión en comparación con el control. Los rendimientos obtenidos fueron de 19,8 mL H₂/gSV en el control y 20,1 mL H₂/gSV en la codigestión.

De los resultados de la cuantificación de qPCR para Fe-hidrogenasa (HYD) se obtuvo $6,59E+05$ (error $4,41E+04$) copias_{HYD/ngADN} para el control y $8,58E+04$ copias_{HYD/ngADN} (error $1,78E+03$). Estos resultados indicarían un menor número de copias en la codigestión con respecto al control. Sin embargo, cabe destacar que pueden haber otros microorganismos productores de hidrógeno que puedan estar presentes y no contengan este gen. En el caso del control puede que el gen esté presente pero no se esté expresando (Fang et al., 2006).

Las comunidades microbianas de los ensayos de metanogénesis están siendo actualmente analizadas por secuenciación masiva. Esta técnica nos permitirá correlacionar las comunidades microbianas con los parámetros operacionales de los reactores lo que permitirá elaborar estrategias para favorecer la producción de metano.

Tanto la producción de hidrógeno como metano son estrategias válidas para la valorización de los residuos orgánicos, disminución de la contaminación ambiental y diversificación de la matriz energética.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen por las becas y proyectos financiados por ANII, CAP, ANII FSE 6437, FSE 102944.

6. REFERENCIAS

Chen C.C., Lin C.Y., Chang J.S. (2001) Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57:56–64.

Fang, H. H., Zhang, T., & Li, C. (2006). Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen-producing population in an acidophilic sludge. *Journal of biotechnology*, 126(3), 357-364

Foresti, E. (1994) Fundamentos do processo de digestão anaerobia. In: Proceedings of III Taller y Seminario Latinoamericano of Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales, Montevideo, Uruguay.

Guiot, S., Pauss, A., Costerton, J. (1992) A structured model of the anaerobic granule consortium. *Water Sci Technol*. 25:1–10.

Hallenbeck, P.C. (2009) Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *Int J Hydrogen Energy*, 34 (17): 7379-89.

Leitão, R.C., Van Haandel, A.C., Zeeman, G., Lettinga, G. (2006) The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: a review. *Bioresour Technol*. 97:1105–18.

Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., & Riley, P. W. (2002). The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148(11), 3521-3530.

Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M. S., Fonoll, X., Peces, M., & Astals, S. (2014). A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and sustainable energy reviews*, 36, 412-427.

McCarty, P., Mosey, F. (1991) Modelling of anaerobic digestion processes (a discussion of concepts). *Water Sci Technol* 24:17–33.



Mosey F. (1982) Mathematical modelling of the anaerobic digestion process. Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. IAWPR Specialized Seminar, Copenhagen, Denmark.

O'Flaherty, V., Collins, G., Mahony, T. (2006) The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 5:39–55.

Pohland, F. G., Ghosh, S. (1971) Developments in anaerobic treatment process. *Biotechnol and Bioeng Symp*, 2: 85-106.

Ranjard, L., Poly, F., & Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in microbiology*, 151(3), 167-177.

Sierens, R., & Rosseel, E. (2000). Variable composition hydrogen/natural gas mixtures for increased engine efficiency and decreased emissions. *Transactions-American Society of Mechanical Engineers Journal of Engineering for Gas Turbines and Power*, 122(1), 135-140

Souza, C. L., Aquino, S. F., Chernicharo, C. A. L. (2005) Determinação da biodegradabilidade anaeróbica e aeróbica da espuma produzida em reatores UASB tratando esgotos domésticos. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife.

Speece, R. E. (1996) Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters. *Archae Press*.

Schink B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:262-280

Torrendel M., Useta G., Pelerino F. (2008) La yerba no es basura : lombricultura y producción de Vermicompost a partir de residuos de yerba mate en Uruguay. *Innotec*. 35–39. <https://doaj.org/article/561d200e9b3f457a84504bebbd181463>.

Ueno, Y., Kawai, T., Sato, S., Otsuka, S., & Morimoto, M. (1995). Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora. *Journal of fermentation and bioengineering*, 79(4), 395-397.

Wang, J., Wan, W. (2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy*, 34 (2):799-811.

Wirth, R., Kovacs, E., Maroti, G., Bagi, Z., Rakhely, G., Kovacs, K. (2012) Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol Biofuels*. 5:41.