

CONAMA 2022

CONGRESO NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE

Explorando nuevas estrategias de producción de hidrógeno por fermentación oscura

Proyecto H24NEWAGE



CONAMA 2022

EXPLORANDO NUEVAS ESTRATEGIAS DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR FERMENTACIÓN OSCURA

Autor Principal: Dolores Hidalgo (Fundación CARTIF)

Otros autores: Jesús M. Martín-Marroquín (Fundación CARTIF); Enrique Pérez (Fundación CARTIF)

ÍNDICE

1. Título
2. Palabras clave
3. Resumen
4. Introducción
5. Principios de la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura
6. Nanopartículas como aditivo
7. Materiales y métodos
8. Resultados
9. Conclusiones y próximas acciones
10. Agradecimientos
11. Bibliografía

TÍTULO

Explorando nuevas estrategias de producción de hidrógeno por fermentación oscura.

PALABRAS CLAVE

Bioaugmentación, digestión anaerobia en dos fases, nanopartículas, hidrógeno verde.

RESUMEN

La búsqueda de alternativas para la producción sostenible de combustibles es, sin duda, una de las actividades de investigación más importantes en el mundo actual. Las instalaciones de tratamiento de residuos se están convirtiendo, en este sentido, en una oportunidad para la generación de vectores energéticos renovables. Hasta ahora, la producción de metano era algo habitual en los procesos de tratamiento de residuos de biomasa, pero el interés que está despertando el hidrógeno se está volcando hacia la generación de este otro gas renovable con mucho futuro.

En los últimos años, la fermentación oscura se ha consolidado como el método más prometedor de producción biológica de hidrógeno motivado, por un lado, por su mayor productividad y rendimiento de biohidrógeno en comparación con otros métodos biológicos, y, por otro lado, por su mayor versatilidad en el tratamiento de diferentes sustratos, desde azúcares simples

hasta biomasa lignocelulósica, residuos de alimentos y corrientes de aguas residuales altamente cargadas, o glicerol. El uso de estos sustratos aporta una ventaja competitiva a esta vía productiva con valor añadido en cuanto a su papel en la valorización de residuos, clave en la transición hacia una economía circular. La producción de hidrógeno por fermentación oscura se lleva a cabo por bacterias anaerobias que usan sustratos ricos en carbohidratos. El proceso de fermentación oscura para producir hidrógeno aún no se ha implementado a escala industrial y actualmente se encuentra bajo investigación debido a que el proceso a veces es inestable debido a que las bacterias involucradas son muy sensibles, especialmente a la presión parcial de hidrógeno.

El presente trabajo, desarrollado en el marco del proyecto H24NEWAGE, se centra en explorar estrategias operativas que incluyen aprovechar el potencial de la nanotecnología en la activación de microorganismos de interés que favorezcan la producción de biohidrógeno por fermentación oscura, analizando los mecanismos implicados, la influencia del sustrato utilizados y los cambios operativos que deben realizarse para aumentar la eficiencia global de producción de hidrógeno por esta ruta fermentativa. Los resultados preliminares a escala de laboratorio muestran un **aumento en la producción de hidrógeno por fermentación oscura de hasta un 25 % utilizando como aditivo las nanopartículas en estudio.**

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de alternativas para la producción sostenible de combustibles es, sin duda, una de las actividades de investigación más importantes en el mundo actual. Las instalaciones de tratamiento de residuos se están convirtiendo, en este sentido, en una oportunidad para la generación de vectores energéticos renovables. Hasta ahora, la producción de metano era algo habitual en los procesos de tratamiento de residuos de biomasa, pero el interés que está despertando el hidrógeno se está volcando hacia la generación de este otro gas renovable con mucho futuro [1].

En los últimos años, la fermentación oscura se ha establecido como el método más prometedor de producción de hidrógeno biológico [2] motivado, por un lado, por su mayor productividad y rendimiento de biohidrógeno en comparación con otros métodos biológicos, y, por otro lado, por su mayor versatilidad en el tratamiento de diferentes sustratos [3]. El uso de estos sustratos aporta una ventaja competitiva a esta vía productiva con valor añadido en cuanto a su papel en la valorización de residuos, clave en la transición hacia una economía circular. La producción de hidrógeno por fermentación oscura se lleva a cabo por bacterias anaerobias que crecen en la oscuridad y usan sustratos ricos en carbohidratos. La fermentación oscura es un proceso basado en la recuperación del hidrógeno que se genera durante las primeras etapas de la digestión anaerobia, evitando que sea consumido por las bacterias metanogénicas. Dependiendo de las condiciones específicas de operación aplicadas, tales como el tipo de microorganismos inoculados, pH, tiempos de retención hidráulica, temperatura, presión parcial de hidrógeno, etc., se puede optimizar la producción de biohidrógeno a partir de los residuos orgánicos [4]. Sin embargo, la cantidad de biohidrógeno producido por la fermentación oscura en la práctica es baja y está lejos de los valores teóricos. El máximo estequiométrico teórico que podría obtenerse de la degradación de 1 mol de glucosa es de 12 moles de hidrógeno, pero, por ejemplo, basándose en *Clostridium sp.*, el productor conocido más eficiente de bio-H₂, un consorcio microbiano diseñado artificialmente ha sido capaz de producir un máximo de 5,6 moles de H₂/mol de glucosa en el laboratorio [5], resultados prometedores pero alejados de la teoría.

Muchos factores están involucrados en esta baja productividad, como la aparición de rutas metabólicas alternativas en el proceso que consumen hidrógeno en lugar de producirlo. Además, el proceso a veces es inestable porque las bacterias involucradas son muy sensibles, especialmente a la presión parcial de hidrógeno y a la presencia de oxígeno [4].

Como consecuencia de estos inconvenientes, el proceso de fermentación oscura aún no se ha implementado a escala industrial para producir hidrógeno pero, debido a su potencial real como fuente de generación de este gas, actualmente se encuentra bajo una intensa investigación. El enfoque principal de esta investigación está en el desarrollo de consorcios microbianos adecuados, nuevos biorreactores y nuevas estrategias operativas para que el proceso se lleve a cabo de manera estable y continua [6]. En este sentido, la nanotecnología se ha introducido recientemente como una herramienta para mejorar la tasa de fermentación oscura. Las nanopartículas inorgánicas y orgánicas pueden facilitar el crecimiento microbiano y la actividad enzimática en la fermentación oscura, lo que conduce a un mejor rendimiento del proceso [7]. Además, desde el punto de vista de la aplicación, el uso de nanopartículas parece ser más factible en comparación con otros enfoques de intensificación (por ejemplo, pretratamiento o enriquecimiento microbiano) debido a sus ventajas de operación simple y bajo consumo de energía [8]. Una amplia gama de aditivos de nanopartículas, como los basados en metales (monómeros, iones, óxidos) [9-11], microorganismos nanosportados y enzimas [12, 13], nanotubos de carbono [14] y nanocarbono activado [15] han sido estudiados. Entre ellos, las nanopartículas magnéticas, incluidos los monómeros de hierro, níquel y cobalto [16-19] y sus formulaciones [20-22], han llamado cada vez más la atención debido a la mejora significativa del rendimiento de biohidrógeno logrado y sus ventajas rentables [23] (Ren et al., 2022).

PRINCIPIOS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO MEDIANTE FERMENTACIÓN OSCURA

La fermentación oscura se considera el método más prometedor de producción de biohidrógeno a través de la conversión de biomasa. La base del proceso de fermentación oscura es convertir compuestos orgánicos en hidrógeno con la ayuda de bacterias fermentativas anaerobias facultativas y obligadas [24]. Los microorganismos como *Clostridium spp.*, *Enterobacter spp.* y *Escherichia coli* son los más utilizados para obtener hidrógeno debido a su mayor rendimiento en este proceso [23]. Estos microorganismos utilizan los electrones de la oxidación del hidrógeno para producir energía. En ausencia de aceptores de electrones externos, los microorganismos tienen un exceso de electrones generados en procesos metabólicos como resultado de la reducción de protones produciendo moléculas de hidrógeno.

La fermentación oscura de la materia orgánica para la producción de biohidrógeno está impulsada principalmente por el metabolismo anaerobio del piruvato (Figura 1), que es el intermediario clave en las vías metabólicas con la formación de la forma reducida de NADH [25]. El piruvato se produce a partir de la descomposición glicolítica de los azúcares derivados de los carbohidratos [26]. En condiciones anaerobias, el piruvato puede evolucionar a acetil-CoA en una reacción catalizada por la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR). Como productos de reacción, además de acetil-CoA, también se obtiene ferredoxina reducida, que participa en la reducción de [FeFe]-hidrogenasas, que posteriormente reducen protones generando hidrógeno. Una segunda vía posible para la conversión de piruvato en acetil-CoA es la reacción catalizada por la piruvato formiato liasa (PFL). Aquí se genera formiato, que se puede convertir fácilmente en H₂ y CO₂ en presencia de [FeFe]-hidrogenasas o [NiFe]-hidrogenasas. El

acetil-CoA puede dar lugar a otros compuestos orgánicos de interés, como etanol, butanol o ácidos grasos de cadena corta, con oxidación simultánea de NADH y formación de ATP [27]. Existen varios tipos de fermentaciones glucolíticas en función de cuáles sean los principales productos finales. Dependiendo de la ruta metabólica seguida, se pueden producir fermentaciones de butirato, butanol y ácidos grasos C1 o C2. La fermentación de butirato y butanol la llevan a cabo las bacterias *Clostridium*, mientras que la fermentación ácida es característica de las bacterias *Enterobacter* y *Bacillus* [26].

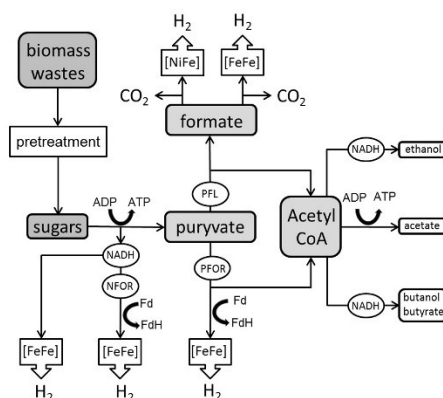
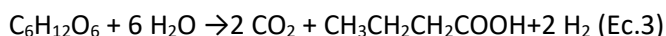
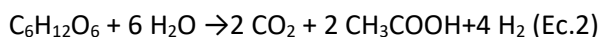
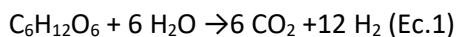


Figura 1. Vías de producción de biohidrógeno por fermentación oscura.
Adaptado de Lukajtis et al. [25]

La cantidad estequiométrica (producción teórica máxima) de hidrógeno molecular es de 12 moles por mol de glucosa (Ec.1), sin embargo, la formación de los productos finales antes mencionados reduce la cantidad final de hidrógeno producido en la fermentación. Por ejemplo, la formación de ácido acético conduce a que la generación de hidrógeno molecular se reduzca a 4 moles en lugar de 12 (Ec.2). Y si el ácido butírico es el producto final, 1 mol de glucosa produce solo 2 moles de hidrógeno (Ec.3). En la situación más habitual en la que el producto final es una mezcla de varios compuestos químicos, el rendimiento de hidrógeno se reduce aún más, con un promedio de 1-2,5 mol de hidrógeno por mol de glucosa. Son muchos los factores que pueden afectar al rendimiento de producción de hidrógeno por fermentación oscura y es por ello que los numerosos estudios existentes sobre la optimización de las condiciones del proceso [6, 28-30] con el fin de obtener un rendimiento cercano al teórico.



Las principales enzimas que regulan el metabolismo del hidrógeno son las hidrogenasas y las deshidrogenasas. Ambos tipos están involucrados en el proceso de fermentación para acelerar las reacciones bioquímicas relevantes [10, 26]. Estas enzimas contienen centros metálicos complejos que actúan como sitios activos [31]. Los grupos de hierro en el sitio central de la hidrogenasa sirven para transferir electrones entre el grupo de hidrógeno y el transportador de electrones externo (p. ej., NADH) [10]. Las dos hidrogenasas básicas, filogenéticamente diferentes, con diferentes sitios activos son [FeFe]-hidrogenasa y [NiFe]-hidrogenasa. Estas enzimas catalizan la reacción reversible de producción de hidrógeno molecular a partir de los

protones presentes en el medio. Las [FeFe]-hidrogenasas muestran una mayor actividad en la producción de hidrógeno molecular que las [NiFe]-hidrogenasas, que son las principales responsables de catalizar la oxidación del hidrógeno molecular. Cabe señalar que las hidrogenasas de [FeFe] suelen ser sensibles al oxígeno y su actividad puede ser inhibida por este componente [32]. Las [NiFe]-hidrogenasas son las más abundantes en la naturaleza y constituyen la mayor fracción de hidrogenasas. Pueden catalizar la producción de hidrógeno al bombear protones a través de la membrana celular [33]. En general, las [NiFe]-hidrogenasas aparecen principalmente en microorganismos oxidantes de hidrógeno, mientras que las [FeFe]-hidrogenasas se encuentran con mayor frecuencia en microorganismos productores de hidrógeno [10, 23].

NANOPARTÍCULAS COMO ADITIVO

El interés en las nanotecnologías y los materiales a nanoescala ha crecido recientemente y sus aplicaciones han atraído la atención de las comunidades industriales y de investigación en los sectores ambiental, químico y médico. Por ejemplo, han mostrado un rendimiento prometedor en la eliminación de contaminantes o la mitigación de la toxicidad [34], en procesos de purificación y tratamiento de agua [35, 36], o en campos médicos, donde el interés por integrar la nanotecnología se ha expandido exponencialmente, particularmente en las áreas de administración de fármacos [37]. Pero una de las aplicaciones más importantes y generalmente aplicadas de las nanopartículas magnéticas es la catálisis de una variedad de reacciones [38]. Ciertos nanomateriales tienen un alto potencial para mejorar la producción de hidrógeno en los procesos biológicos debido a sus efectos sobre el crecimiento de microorganismos, la transferencia de electrones intracelulares y la actividad de las metaloenzimas [7]. La Tabla 1 reúne varias estrategias para mejorar la producción de biohidrógeno mediante la adición de nanomateriales orgánicos e inorgánicos.

En la producción de biohidrógeno, dos enzimas están predominantemente involucradas, la hidrogenasa, ya comentada en el apartado anterior, y la nitrogenasa [39]. Por lo tanto, las estrategias para aumentar la producción de biohidrógeno generalmente se enfocan en estas enzimas [40]. Debido a su gran área superficial, las nanopartículas muestran una alta capacidad para absorber electrones y favorecer su transferencia, lo que mejora las propiedades catalíticas de las enzimas y, con ello, la producción de biohidrógeno a través de diversas vías biológicas [25]. Cuando las nanopartículas se agregan al medio de fermentación, interactúan con los microorganismos y entran a las células a través de las membranas celulares, aumentando la actividad del sistema [7].

El hierro ha demostrado ser una nanopartícula eficaz en sus diferentes estados de oxidación (valencias). Varios trabajos han demostrado que el Fe^{2+} podría mejorar la actividad hidrogenasa, ya que juega un papel clave en su centro activo [41]. Yang y Wang [10] observaron que las nanopartículas de Fe(0) están involucradas en la síntesis de la proteína ferredoxina que contiene hierro, por lo que su adición al reactor acelera la transferencia de electrones entre la ferredoxina y la hidrogenasa, que como se mencionó anteriormente, son las enzimas clave implicadas en la formación de biohidrógeno. Estos autores encontraron que las nanopartículas de Fe(0) tienen la capacidad de estimular la transferencia de electrones entre la ferredoxina y la hidrogenasa, y promover la actividad de enzimas clave. En este estudio, se logró una tasa máxima de producción de H_2 de 12,1 ml/h mediante la adición de 400 mg/l de nanopartículas de Fe0, lo que supuso un aumento del 128,3 % con respecto a la prueba de control sin Fe(0).

Los iones de níquel también han mostrado su efecto positivo como cofactor en el sitio activo de la hidrogenasa [7]. Elreedy et al. [42] obtuvieron rendimientos máximos de H₂ de 24,7 mL/g DQO inicial tras la adición de 60 mg/L de nanopartículas de Ni²⁺ al medio, superando los resultados obtenidos en el ensayo sin Ni. Las nanopartículas de NiO produjeron una mejora mucho mayor (109 %) en la producción de biohidrógeno, ya que su adición favoreció las vías de acetato y butirato de la síntesis de biohidrógeno [43]. También se ha demostrado que otros elementos metálicos, como el oro [44], el cobalto o el titanio [43], mejoran la bioactividad de los microorganismos productores de hidrógeno.

Tabla 1. Algunos ejemplos de nanopartículas que mejoran la producción de bio-H₂ (adaptado de Shanmugam et al. [7])

Nanopartícula	Concentración (mg/L)	Sustrato	Producción bioH ₂	Incremento (%) rendimiento bioH ₂
Inorgánica				
CoO	1.0	Aceit. palma	0.487 L/g COD _{eliminado}	67.4
Cu	6.4	Sucrosa	144.4 mL H ₂ /L.d	-
Fe	100	Glucosa	1.90 mol H ₂ /mol subs.	100
	5	Glucosa	338 mL H ₂ /g VS	37
	312	Malato	3.10 mol H ₂ /mol subs.	19.4
FeO	50	Glucosa	1.92 mol H ₂ /mol subs.	7.9
Fe ₂ O ₃	200	Almidón	124.3 mol H ₂ /mol subs.	63.1
Fe ₃ O ₄	200	Bagazo	1.21 mol H ₂ /mol subs.	69.6
Hematite	200	Sucrosa	3.57 mol H ₂ /mol subs.	32.64
Maghemita	25	Almidón	0.90 mol H ₂ /mol subs.	57.8
Ni	2.5	Glucosa	250 mL H ₂ /g VS	0.90
Pd	5.0	Glucosa	2.48 mol H ₂ /mol subs.	6.4
SiO ₂	40.0	Aire:CO ₂ (97:3)	3121.5 L H ₂ /h	45.2
TiO ₂	100	Fango activo	1.01 L H ₂ /h	46.1
Fe + Ni	37.5 + 37.5	Almidón	149.6 mL H ₂ /g VS	200
Hematite + NiO	50 (Hematite) + 10 (NiO)	Efluente lácteo	17.2 mmol/g COD	27.1
Hematite + NiO	200 (Hematite) + 5 (NiO)	Destilado	7.85 mmol/g COD	62.0
Hematite + TiO ₂	800	Glucosa	2.20	5.0
Inorgánico + Orgánico Mezcla				
Fe ⁰ + carbón activo	400	Glucosa	1.23	38.0
Orgánica				
Nanotubos carbón	100	Glucosa	2.45	-
Carbón en polvo activado	33.3	Sucrosa	2.60	62.5
Nano carbón activado	33.3	Sucrosa	1.30	70.0

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustratos y aditivos

A pesar de que el objetivo final del estudio realizado en el marco del proyecto H24NEWAGE es emplear corrientes residuales para la producción de hidrógeno, los primeros ensayos, que son los que aquí se recogen, se han llevado a cabo con un sustrato sintético, con el objetivo de tener controladas las características del mismo. El sustrato empleado está compuesto por glucosa como fuente de carbono principal y una disolución de macro y micronutrientes. La composición de la disolución de nutrientes (en g/L) es: NH_4Cl 170, KH_2PO_4 38, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8, $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9, $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03, ZnCl_2 0.05, H_3BO_3 0.05, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.09, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05, EDTA 1, Resorcina 0.5. Como inóculo se empleó digestato de un reactor anaerobio que opera en una planta de tratamiento de aguas residuales municipales, con una concentración de sólidos volátiles (SV) de 13.21 ± 0.5 g/L.

Durante los ensayos se comprobó la efectividad de distintos aditivos con potencial para mejorar la actividad de los microorganismos productores de hidrógeno. Como aditivo principal, se emplearon nanopartículas de hierro monovalente encapsuladas en carbono a partir de residuos oleícolas (comercializadas por SMALLOPS). Además, en un segundo ensayo se emplearon aditivos orgánicos como el hidrochar (comercializado por Ingelia) procedente de un proceso de carbonización hidrotermal y carbón activo (marca ChiemiVall).

Montaje y métodos analíticos

Durante la experimentación, se llevaron a cabo dos ensayos, uno para comprobar si el uso de nanopartículas de Fe(0) aporta una mejora en la producción de hidrógeno por fermentación oscura y otro para comparar la efectividad de estas nanopartículas con la del carbón activo y el hidrochar. Los experimentos se realizaron en reactores de acero inoxidable de 1 L, con un volumen disponible para la fase líquida de 500 mL (Figura 2). En cada uno de los reactores se alimentaron 10 g/L de glucosa (5 g por reactor) y 1 mL de la disolución de nutrientes. Los sólidos totales (ST) y volátiles (SV) fueron analizados en el digestato y se determinaron de acuerdo con métodos estándar [45]. La cantidad de inóculo se calculó en función de la relación S/X (g DQO glucosa/g SV digestato), la cual se fijó en 2.



Figura 2. Montaje experimental

Tras llenar las botellas con la mezcla de sustrato e inóculo, se ajustó el pH a 5.5 como pretratamiento empleando HCl o H_2SO_4 . Esta acidificación de la mezcla selecciona las bacterias

productoras de hidrógeno, ya que las metanógenas ven inhibida su actividad en estas condiciones. Tras esto, se usó nitrógeno para purgar el aire que quedaba en los espacios de cabeza y mantener, así, un ambiente anaerobio. Cada una de las condiciones experimentadas se realizó por triplicado en una sala termostática a 34 ± 1 °C bajo agitación constante.

La producción de biogás se midió automáticamente mediante transmisores de presión (Desin InstrumenST, TPR-14 / N, rango 0-1 bar) conectados a las cabezas de las botellas. Estos datos fueron ajustados posteriormente a la ecuación de Gompertz modificada (Ec. 4).

$$M = P_b * \exp\left(-\exp\left[\frac{R_m * e}{P_b}(\lambda - t) + 1\right]\right) \quad (\text{Ec.4})$$

Donde M es la producción acumulada de biogás o hidrógeno en mL, P_b es la producción total en mL, R_m es la producción máxima en un día en mL/día, λ es la latencia en días y e es una constante igual a 2.721828. Durante el ensayo se extrajeron periódicamente muestras de biogás empleando bolsas Tedlar y fueron analizadas mediante un cromatógrafo Varían CP-4900 Micro-GC con un detector de conductividad térmica para determinar la composición de las mismas y, con ello, la producción de hidrógeno.

RESULTADOS

Ensayo 1 (E1)

El objetivo principal del primer ensayo fue la comprobación de la efectividad de las nanopartículas (NP) de Fe(0) como potenciadoras de la producción de hidrógeno en fermentación oscura. Además, se quiso probar si el rendimiento del proceso se veía afectado en función del tipo de ácido que se empleara para acondicionar el inóculo con objeto de reducir la presencia de metanógenos. De esta manera se pretende probar tanto la efectividad de las nanopartículas de Fe(0) como aditivos potenciadores de la producción de hidrógeno como el efecto de distintos ácidos. Las condiciones ensayadas se recogen en la Tabla 2 mientras que los resultados medios de las tres réplicas realizadas ajustados por la Ec. de Gompertz se muestran en la Figura 3.

Tabla 2. Condiciones establecidas en el ensayo E1

	HCl			HCl+NPFe(0)			H ₂ SO ₄			H ₂ SO ₄ +NPFe(0)		
Nº muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH inicial	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
Ácido empleado	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	HCl	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄
Nanopartículas (mg/L)	-	-	-	200	200	200	-	-	-	200	200	200

NP: nanopartículas

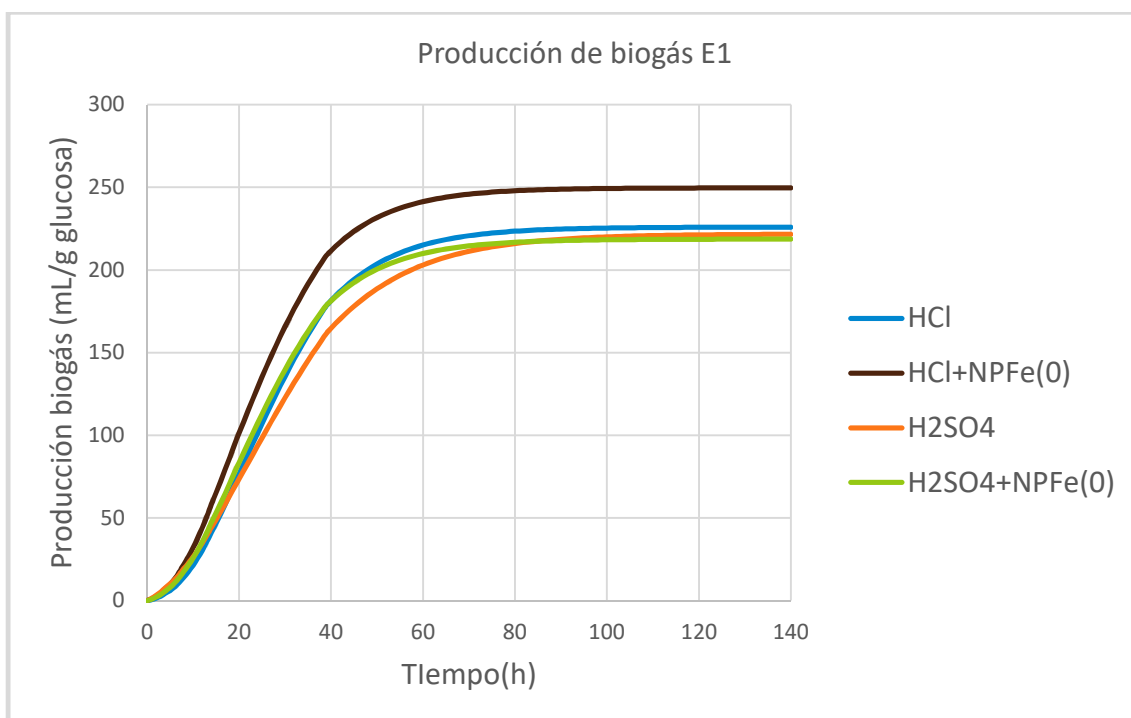


Figura 3. Producción acumulada de biogás en el ensayo E1

La producción de biogás fue bastante similar para las distintas condiciones ensayadas, excepto en el caso del inóculo pretratado con HCl en el ensayo en el que se habían añadido nanopartículas de Fe(0), en el que ésta fue mayor. Aquí se alcanzó la producción de 249.6 mL de biogás/ g glucosa, lo que suponía una producción media de 86.5 mL de H₂/ g glucosa, de acuerdo a los porcentajes de hidrógeno detectados en el biogás generado y que se recogen en la Tabla 3. Se observa que los porcentajes máximos de producción de H₂ obtenidos en el biogás son muy similares en las distintas condiciones de este ensayo. Sin embargo, el porcentaje de hidrógeno en las primeras 24 horas del ensayo era mucho mayor en los reactores con nanopartículas de Fe(0). En este periodo de arranque, en los ensayos ajustados con HCl, el porcentaje de hidrógeno en el biogás fue 19.65% para las reactores sin adición de nanopartículas y 24.62% para los reactores en las que estas se habían añadido, mostrando que las partículas de Fe(0) favorecen el inicio de la producción de hidrógeno en el sistema.

Tabla 3. Porcentaje máximo de H₂ en el ensayo E1

	HCl	HCl+NPFe(0)	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄ +NPFe(0)
%H ₂ máx.	35.16 ± 0.38	34.65± 0.20	35.75± 1.57	35.30± 0.93

Teniendo en cuenta los porcentajes de hidrógeno medidos en cada momento del ensayo y la producción acumulada de biogás, se obtiene la producción de hidrógeno para distintos periodos de la experimentación, que se recoge en la Tabla 4. Se observa, en todos los casos, como la presencia del hidrógeno en el biogás aumenta a medida que avanza el ensayo, al hacerlo el porcentaje de hidrógeno en el gas generado.

Tabla 4. Producción media acumulada de H₂ en el ensayo E1

Día de ensayo	Tiempo (h)	H ₂ (mL/gSV)			
		HCl	HCl+NPF _e (0)	H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄ +NPF _e (0)
1	21	16.09	27.80	16.16	20.86
2	45	64.97	73.85	55.40	62.46
3	65	78.22	84.50	83.93	78.58

Ensayo 2 (E2)

En este segundo ensayo, tras comprobar que las nanopartículas de Fe(0) aumentaron ligeramente la producción de hidrógeno, se procedió a comparar su comportamiento con el de otros aditivos, en este caso orgánicos, conocidos por aumentar la actividad de los microorganismos, como son el hidrochar y el carbón activo (C.A.). Las condiciones ensayadas se recogen en la Tabla 5 mientras que los resultados medios de las tres réplicas realizadas ajustados por la Ec. de Gompertz se muestran en la Figura 4. En todos los casos, se empleó HCl para aclimatar el inóculo a las condiciones del ensayo reduciendo la presencia de metanógenos.

Tabla 5. Condiciones establecidas en el ensayo E2

Nº muestra	Sin aditivos			NPF _e (0)			C.A.			Hidrochar		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
pH inicial	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
Cantidad (mg/L)	-	-	-	200	200	200	200	200	200	200	200	200

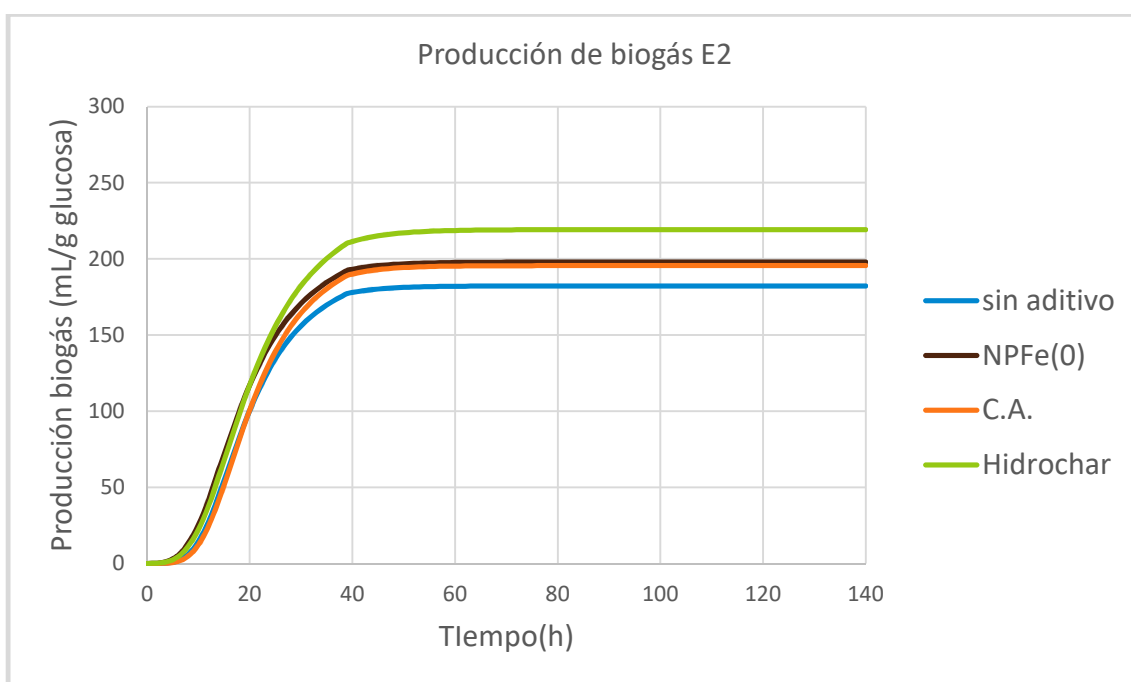


Figura 4. Producción acumulada de biogás en el ensayo E2

En este segundo ensayo la mayor producción de biogás fue la del reactor al que se le había añadido hidrochar (Figura 4), alcanzando una producción media acumulada de 219.2 mL de biogás/g de glucosa. De igual manera que el ensayo anterior, los porcentajes máximos de hidrógeno son muy similares en todas las condiciones, siendo ligeramente mayor, en este caso, en los reactores con carbón activo, tal y como se recoge en la Tabla 5.

Tabla 1. Porcentaje máximo de H₂ en el ensayo 2 (E2)

	Sin aditivos	NPF ₂ (0)	C.A.	Hidrochar
%H ₂ máx.	33.70 ± 3.71	36.67± 1.65	36.12± 1.63	35.11± 1.27

En cuanto a producción acumulada de hidrógeno destaca la de los reactores con nanopartículas por encima de las demás. Se aprecia que la evolución de la producción es parecida entre el hidrochar y las nanopartículas, mientras que las que usan carbón activo tienen un comportamiento similar a las que no usan aditivos.

Tabla 2. Producción acumulada de H₂ en el ensayo E2

Día de ensayo	t (h)	H ₂ (mL/gSV)			
		Sin aditivos	NPF ₂ (0)	C.A.	Hidrochar
1	20	19,85	25,32	18,22	25,56
1	23	31,41	40,35	32,14	39,12
2	44	70,27	88,25	69,53	76,15

CONCLUSIONES Y PRÓXIMAS ACCIONES

El uso de aditivos en procesos de producción de hidrógeno mediante fermentación oscura ha demostrado lograr mejoras en los rendimientos de generación de este gas. Especialmente destacable es el efecto de las nanopartículas de hierro monovalente que consiguen incrementar la producción de hidrógeno hasta el 25,6%. A pesar de ser un aumento considerable, esta mejora es muy variable en ensayos cortos como los realizados en esta experimentación. Es por ello que, aunque los resultados son muy prometedores, se ve necesario confirmar esta tendencia mediante la realización de ensayos en continuo.

Por otro lado, todos los incrementos de producción observados son en términos absolutos. Es decir, el porcentaje de hidrógeno en el biogás generado no parece aumentar con el uso de aditivos en este tipo de ensayos, ya que todos los experimentos los porcentajes máximos alcanzados son muy similares entre sí, independientemente del uso de aditivos.

Como conclusión se establece que es posible aumentar los rendimientos del proceso de fermentación oscura mediante el uso de ciertos aditivos. Sin embargo, es necesaria la realización de más ensayos para comprobar hasta qué punto esos aditivos son capaces de mejorar el proceso. Estos serán los siguientes pasos a realizar en el marco del proyecto H24NEWAGE, donde se plantearán ensayos con corrientes residuales reales y operando en modo continuo o

semicontinuo, con objeto de obtener información realista de cara a proponer un escalado de esta tecnología.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo a este trabajo por parte del CDTI-Ministerio de Ciencia e Innovación de España en el marco del proyecto H24NEWAGE (Ref. CER-20211002).

BIBLIOGRAFIA

- [1] Hidalgo D, Martín-Marroquín J, Díez D (2022) Biohydrogen: Innovative technologies for biohydrogen production at industrial level. In: Kuddus M, Yunus G, Ramteke PW, Molina G (ed) *Organic Waste to Biohydrogen*. Springer, Singapore pp 108-206
- [2] Show KY, Yan YG, Lee DJ (2019) Biohydrogen production: status and perspectives. In: Pandey A, Larroche C, Dussap CG et al (ed) *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes for the production of liquid and gaseous biofuels*, 2nd edn. Academic Press. pp 693-713
- [3] Soares JF, Confortin TC, Todero I, Mayer FD, Mazutti MA (2020) Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: technological challenges and future prospects. *Renew Sustain Energy Rev*, 117:109484. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109484>
- [4] Sivagurunathan P, Kumar G, Bakonyi P, Kim SH, Kobayashi T, Xu KQ et al (2016) A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *Int J Hydrog Energy* 41(6):3820-3836. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.081>
- [5] Ergal İ, Gräf O, Hasibar B, Steiner M, Vukotić S, Bochmann G et al (2020) Biohydrogen production beyond the Thauer limit by precision design of artificial microbial consortia. *Commun Biol* 3(1):1-12. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01159-x>
- [6] Lopez-Hidalgo AM, Smoliński A, Sanchez A (2022) A meta-analysis of research trends on hydrogen production via dark fermentation. *Int J Hydrog Energy* 47(27):13300-13339. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.02.106>
- [7] Shanmugam S, Hari A, Pandey A, Mathimani T, Felix L, Pugazhendhi A (2020) Comprehensive review on the application of inorganic and organic nanoparticles for enhancing biohydrogen production. *Fuel* 270:117453. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117453>
- [8] Dahiya S, Chatterjee S, Sarkar O, Mohan SV (2021) Renewable hydrogen production by dark-fermentation: Current status, challenges and perspectives. *Bioresour Technol* 321:124354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124354>
- [9] Kumar G, Mathimani T, Rene ER, Pugazhendhi A (2019) Application of nanotechnology in dark fermentation for enhanced biohydrogen production using inorganic nanoparticles. *Int J Hydrog Energy* 44(26):13106-13113. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.03.131>

- [10] Yang G, Wang J (2018) Various additives for improving dark fermentative hydrogen production: a review. *Renew Sustain Energy Rev* 95:130-146. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.029>
- [11] Taherdanak M, Zilouei H, Karimi K (2016) The effects of FeO and NiO nanoparticles versus Fe²⁺ and Ni²⁺ ions on dark hydrogen fermentation. *Int J Hydrog Energy* 41(1): 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.11.110>
- [12] Srivastava N, Srivastava M, Malhotra BD, Gupta VK, Ramteke PW, Silva RN et al (2019) Nanoengineered cellulosic biohydrogen production via dark fermentation: a novel approach. *Biotechnol Adv* 37(6):107384. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.006>
- [13] Júnior ADF, Etchebehere C, Zaiat M (2015) Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: influence of support materials. *Anaerobe*, 34:94-105. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.008>
- [14] Liu Z, Lv F, Zheng H, Zhang C, Wei F, Xing XH (2012) Enhanced hydrogen production in a UASB reactor by retaining microbial consortium onto carbon nanotubes (CNTs). *Int J Hydrog Energy* 37(14):10619-10626. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.057>
- [15] Wimonsong P, Nitorisavut R (2015) Comparison of different catalyst for fermentative hydrogen production. *J Clean Energy Technol* 3:128-131. <https://doi.org/10.7763/JOCET.2015.V3.181>
- [16] Sewwandi KAHS, Nitorisavut R (2020) Nano zero valent iron embedded on chitosan for enhancement of biohydrogen production in dark fermentation. *Energy Rep* 6:392-396. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.11.225>
- [17] Arisht SN, Roslan R, Gie GA, Mahmud SS, Sajab MS, Lay CH et al (2021). Effect of nano zero-valent iron (nZVI) on biohydrogen production in anaerobic fermentation of oil palm frond juice using *Clostridium butyricum* JKT37. *Biomass Bioenerg* 154:106270. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106270>
- [18] Zhang J, Li W, Yang J, Li Z, Zhang J, Zhao W, Zang L (2021) Cobalt ferrate nanoparticles improved dark fermentation for hydrogen evolution. *J Clean Prod* 316:128275. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128275>
- [19] Pugazhendhi A, Shobana S, Nguyen DD, Banu JR, Sivagurunathan P, Chang SW et al. (2019) Application of nanotechnology (nanoparticles) in dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(3), 1431-1440.
- [20] Rambabu K, Bharath G, Thanigaivelan A, Das DB, Show PL, Banat F (2021) Augmented biohydrogen production from rice mill wastewater through nano-metal oxides assisted dark fermentation. *Bioresour Technol* 319:124243. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124243>
- [21] Cheng J, Li H, Ding L, Zhou J, Song W, Li YY, Lin R (2020) Improving hydrogen and methane co-generation in cascading dark fermentation and anaerobic digestion: The effect of magnetite nanoparticles on microbial electron transfer and syntrophism. *Chem Eng J* 397:125394. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125394>

- [22] Soares JF, Confortin TC, Todero I, Mayer FD, Mazutti MA (2020) Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: technological challenges and future prospects. *Renew Sustain Energy Rev* 117:109484. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109484>
- [23] Ren Y, Si B, Liu Z, Jiang W, Zhang Y (2021) Promoting dark fermentation for biohydrogen production: Potential roles of iron-based additives. *Int J Hydrog Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.10.137>
- [24] Sarangi P K, Nanda S (2020) Biohydrogen production through dark fermentation. *Chemical Engineering & Technology*, 43(4):601-612. <https://doi.org/10.1002/ceat.201900452>
- [25] Łukajtis R, Hołowacz I, Kucharska K, Glinka M, Rybarczyk P, Przyjazny A, Kamiński M (2018) Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 91:665-694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- [26] Hallenbeck PC (2009). Fermentative hydrogen production: principles, progress, and prognosis. *Int J Hydrogen Energy* 34:7379e89. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.080>
- [27] Hawkes FR, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes DL (2007) Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *Int J Hydrog Energy* 32:172-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.014>
- [28] Villanueva-Galindo E, Moreno-Andrade I (2021) Bioaugmentation on hydrogen production from food waste. *Int J Hydrog Energy* 46(51):25985-25994. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.092>
- [29] Castelló E, Ferraz-Junior ADN, Andreani C, del Pilar Anzola-Rojas M, Borzacconi L, Buitrón G et al (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: possible causes and solutions. *Renew Sustain Energy Rev*, 119:109602. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>
- [30] Wong YM, Wu TY, Juan JC (2014) A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 34:471-482. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.008>
- [31] Peters JW (1999) Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* 9(6):670-676. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00028-7)
- [32] Mishra J, Khurana S, Kumar N, Ghosh AK, Das D (2004) Molecular cloning, characterization, and overexpression of a novel [Fe]-hydrogenase isolated from a high rate of hydrogen producing *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Biochem Biophys Res Commun* 324:679-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.108>.
- [33] Cha M, Chung D, Westpheling J. (2016) Deletion of a gene cluster for [Ni-Fe] hydrogenase maturation in the anaerobic hyperthermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor bescii* identifies its role in hydrogen metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:1823-1831. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7025-z>. [34]

- [34] Adams MW (1990) The structure and mechanism of ironhydrogenases. *Biochim Biophys Acta* 1020 (2):115-145. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90044-5)
- [35] Soy lak M, Ozalp O, Uzc an F (2021) Magnetic nanomaterials for the removal, separation and preconcentration of organic and inorganic pollutants at trace levels and their practical applications: A review. *Trends Environ Anal Chem* 29:e00109. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00109>
- [36] Shukla S, Khan R, Daverey A (2021) Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles, and their applications in wastewater treatment: A review. *Environ Technol Inno va* 24:101924. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101924>
- [37] Kianfar E (2021) Magnetic nanoparticles in targeted drug delivery: a review. *J Supercond Nov Magn* 34(7):1709-1735. <https://doi.org/10.1007/s10948-021-05932-9>
- [38] Mourdikoudis S, Kostopoulou A, LaGrow AP (2021) Magnetic nanoparticle composites: synergistic effects and applications. *Adv Sci* 8(12):2004951. <https://doi.org/10.1002/advs.202004951>
- [39] Sampath P, Reddy KR, Reddy CV, Shetti NP, Kulkarni RV, Raghu AV (2020) Biohydrogen production from organic waste—a review. *Chem. Eng. Technol.* 43(7):1240-1248. <https://doi.org/10.1002/ceat.201900400>
- [40] Singh H, Tomar S, Qureshi KA, Jaremko M, Rai PK (2022) Recent advances in biomass pretreatment technologies for biohydrogen production. *Energies* 15(3):999. <https://doi.org/10.3390/en15030999>
- [41] Wu H, Wang C, Chen P, He AY, Xing FX, Kong XP, Jiang M (2017) Effects of pH and ferrous iron on the coproduction of butanol and hydrogen by *Clostridium beijerinckii* IB4. *Int J Hydrog Energy* 42(10):6547-6555. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.094>
- [42] Elreedy A, Ibrahim E, Hassan N, El-Dissouky A, Fujii M, Yoshimura C, Tawfik A (2017) Nickel-graphene nanocomposite as a novel supplement for enhancement of biohydrogen production from industrial wastewater containing mono-ethylene glycol. *Energy Convers Manag* 140:133-144. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.02.080>
- [43] Arun J, Sasipraba T, Gopinath KP, Priyadharsini P, Nachiappan S, Nirmala N, Pugazhendhi A (2022) Influence of biomass and nanoadditives in dark fermentation for enriched biohydrogen production: A detailed mechanistic review on pathway and commercialization challenges. *Fuel* 327:125112. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125112>
- [44] Zhang Y, Shen J (2007) Enhancement effect of gold nanoparticles on biohydrogen production from artificial wastewater. *Int J Hydrog Energy* 32(1):17-23. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.004>
- [45] Rice EW, Baird RB, Eaton AD. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd ed., APHA, Washington, 2017.