

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 347**

51 Int. Cl.:

C02F 3/34 (2006.01)

A01C 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05812051 .0**

96 Fecha de presentación: **28.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1828065**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Método para la producción aumentada de biogás en fermentadores anaerobios termofílicos**

30 Prioridad:
26.11.2004 HU 0402444

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2012

73 Titular/es:
SCHMACK BIOGAS GMBH (100.0%)
Bayernwerk 8
92421 Schwandorf , DE

72 Inventor/es:
KOVACS, KORNEL;
BAGI, ZOLTAN;
RAKHELYNE PEREI, KATALIN y
RAKHELY, GABOR

74 Agente/Representante:
LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 390 347 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la producción aumentada de biogás en fermentadores anaerobios termofílicos

5 La invención se relaciona con el uso de una bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica, para aumentar la producción de biogás de los sistemas anaerobios termofílicos en donde el sistema de fermentación del biogás se inocula con un cultivo de microorganismos. El microorganismo se selecciona para aumentar la producción de un intermediario facilitando el proceso y/o acelera la descomposición del sustrato, y de ese modo promueve los eventos microbianos que resultan en la producción de biogás. Mediante el uso de la invención se puede aumentar la eficacia de las plantas que están trabajando actualmente mediante una intervención sencilla, y la velocidad de retorno en el caso de las nuevas se puede disminuir significativamente.

15 Ha sido conocido por mucho tiempo que el biogás rico en metano se forma cuando el material orgánico a partir de diversas fuentes se descompone en condiciones anaerobias. Numerosas cepas microbianas participan en el proceso, estas cepas se pueden dividir en tres grupos principales. El primer grupo incluye las bacterias degradantes de polímeros; estas hidrolizan las biomoléculas grandes y las convierten en moléculas más pequeñas. Estos intermediarios constituyen el alimento para los acetógenos, que producen ácidos orgánicos, por ejemplo, acetato, propionato y butirato. En determinados casos los acetógenos producen también hidrógeno como un subproducto de su metabolismo. El tercer grupo de microbios que participan en la formación de biogás se llama el grupo de metanógenos. Actúan en la última etapa de la cadena metabólica y generan los componentes principales del biogás, es decir, metano y dióxido de carbono. Así, los microbios que participan en la degradación del material orgánico y en la generación de biogás dependen de la actividad metabólica de otros: forman un consorcio cuando funciona apropiadamente.

25 En las tecnologías de tratamiento anaerobio de los residuos, la utilización del biogás producido (metano) disminuye los costos operativos, lo que puede hacer la tecnología de tratamiento económicamente factible en sí misma. El número de instalaciones de tratamiento de residuos económicamente competitivas aumenta según se implementa ampliamente la gestión moderna del proceso y principios de ingeniería. Estas nuevas tecnologías utilizan cada vez más frecuentemente el concepto de producción fermentativa de biogás. Obviamente, el agotamiento gradual de las fuentes de energía fósiles aumenta la importancia de usar el metano obtenido a partir de recursos renovables para cubrir las necesidades futuras de energía. Por lo tanto, se está llevando a cabo un intenso trabajo de investigación y desarrollo en todo el mundo para mejorar las tecnologías de producción de energía a partir de residuos y biomasa.

35 Un problema importante a ser resuelto es la eficacia relativamente baja de los sistemas actuales de un fermentador, de otra manera baratos y sencillos.

40 Se conoce bien que la formación de metano a partir de materiales orgánicos complejos requiere la participación de microorganismos que se hidrolizan, acetogénicos y metanogénicos (ver, por ejemplo patente de los Estados Unidos núm. 5,529,692). Se han realizado varios intentos para identificar las etapas que limitan la velocidad en el proceso de producción de biogás y determinar los factores que afectan el rendimiento de biogás. De acuerdo con la patente de Estados Unidos núm. 5,651,890, la etapa limitante de la velocidad generalmente se puede encontrar ya sea en la fase de degradación del polímero o es la última fase de formación de biogás, y la fase acetogénica consiste en las etapas rápidas en comparación con la primera y última fase.

45 De acuerdo con la técnica varios autores señalan que la acumulación de un producto metabólico generado por algunos de los microbios puede inhibir fácilmente la velocidad de todo el proceso. Además, se estableció también que pueden variar las condiciones óptimas para las etapas individuales de bioconversión. La patente europea núm. EP 1 236 688 va más allá y manifiesta que las condiciones requeridas por los microbios acetogénicos y metanogénicos son incompatibles. Por lo tanto se sugiere generalmente que las etapas individuales se deben llevar a cabo deliberadamente en recipientes de reacción separados o fermentadores (patentes de Estados Unidos núms. 5,529,692 y 6,342,378) o al menos en espacios de reacción divididos (patente EP 0,262,796).

Una dificultad específica identificada en la patente EP 0 263 796 es el requisito de temperatura óptima diferente para las etapas acetogénica e hidrolítica (por encima de 37°C) y para la metanogénesis (más abajo de 37°C).

55 De acuerdo con la patente de Estados Unidos con núm. 3,383,309 la velocidad de la metanogénesis aumentó cuando el gas hidrógeno se introdujo en el barro de agua residual fermentado. Otras fuentes informan sobre el efecto inhibitorio de hidrógeno cuando se administra a partir de fuentes externas. El papel de hidrógeno en la tecnología de biogás es así ambigua.

60 Un equipo que trabaja en el Centro de Investigaciones Biológicas de la Academia Húngara de Ciencias y en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Szeged demostró primero que, usando residuo sólido orgánico doméstico comunitario, barro de agua residual o estiércol animal, el proceso microbiano complejo que conduce a la formación de biogás se puede acelerar bajo condiciones mesofílicas si interfieren en el proceso de producción de biogás de acuerdo con su método patentado de suministro del hidrógeno microbiano a la etapa metanogénica [Kovács, K., Cs. Bagyinka, I. Verebely, Process to increase the biogas production capability of mixed bacterium fermentation systems.

Patente húngara con núm. 195 978 (1985)]. Los autores sugieren que en los sistemas mesofílicos de producción de biogás una de las etapas que limita la velocidad es la disponibilidad de hidrógeno, que se puede aumentar adicionando hidrógeno que producen las bacterias al consorcio natural. En dicha patente húngara, sin embargo, no se menciona que la sugerencia se puede aplicar en la producción termofílica de biogás.

A pesar del largo tiempo que ha transcurrido desde el anuncio de la patente original y el extenso trabajo de investigación y desarrollo que se ha hecho en todo el mundo para mejorar el rendimiento de las tecnologías de producción de biogás, según el conocimiento de los presentes inventores, nadie ha sugerido que la formación de metano en los sistemas termofílicos se puede aumentar por el suministro del hidrógeno producido in situ usando una bacteria productora de hidrógeno.

Como la composición microbiológica de los consorcios de producción termofílica de biogás es completamente diferente de la contraparte mesofílica, debido a la gran diferencia en la temperatura operativa, las conclusiones basadas en los hallazgos de los sistemas mesofílicos no se pueden extender a la producción termofílica de biogás. Por lo tanto, nuestra comprensión del proceso mesofílico no se puede extrapolar a la tecnología termofílica.

J. Sipma y otros examinaron los efectos de los iones CO, hidrógeno y sulfato en la conversión termofílica de hidrógeno y CO a 55°C, en condiciones anaerobias y usando aguas de residuos industriales y barro de agua residual. Se observó que, dependiendo de las condiciones ambientales y sustratos, el hidrógeno y dióxido de carbono se utilizaron por distintos microbios, por ejemplo, metanógenos, homo-acetógenos, reductores de sulfato [Sipma J y otros, Appl. Microbiol. Biotechnol. 64(3) 421-428 (2004)].

Kim y otros [Water Research 36 (2002) 4369-4385] llevaron a cabo un estudio comparativo de la digestión anaerobia mesofílica y termofílica para evaluar diversas configuraciones de reactores. Los autores usaron un cultivo anaerobio termofílico de barro obtenido a partir de un digestor anaerobio de barro para iniciar la fermentación. Este es un método bien establecido usado por los presentes inventores, así como otros muchos para acortar el período de puesta en marcha de los reactores. Dicho cultivo de inoculación se forma espontáneamente y su composición es indefinida. En la comparación de las configuraciones de reactor, Kim y otros, concluyeron que "La digestión de dos fases a ambas temperaturas no mostró ningún beneficio significativo".

Además, Kim y otros describieron sus resultados con un modelo en el que los microorganismos en un consorcio están en una estrecha proximidad entre sí. Kim y otros mencionaron también, como hipótesis, que la concentración de H₂ debe estar en un intervalo muy estrecho, es decir, entre 10⁻⁴ hasta 10⁻⁶ para lograr una conversión suficiente de propionato a acetato/H₂ y en la conversión de vuelta de H₂ a metano y mencionan que "esto es una limitación grave" (página 4370, párrafo de unión col 1 y col 2). Así, Kim y otros no sugieren cualquier herramienta sencilla y eficaz para mejorar la producción de biogás de estos fermentadores.

Shin y otros [International Journal of hydrogen Energy, 29 (2004) 1355-1363] describen un método termofílico para la formación de hidrógeno. En la Tabla 2 se muestra que, en condiciones termofílicas no se desarrolló el metano, sino una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (la relación de metano en el biogás fue 0%); parece que los metanógenos simplemente no crecieron.

Además, se cita con frecuencia en la literatura científica que los sistemas anaerobios termofílicos son particularmente vulnerables y son por lo general menos estables desde el punto de vista microbiológico. Así el equilibrio metabólico puede cambiar significativamente debido a la acumulación de ácidos orgánicos, y se puede detener la producción de biogás. Si este desastre operativo tiene lugar el fermentador se tiene que vaciar y reiniciar usando sustrato orgánico fresco y el desarrollo del consorcio microbiano adecuado por lo general toma una cantidad significativa de tiempo, a veces incluso meses.

En resumen, podemos concluir que aún existe una necesidad de sistemas para la producción termofílica de biogás eficiente, económicamente factibles y confiables que pueden usar diversos materiales orgánicos y residuos como sustratos. Es de particular importancia tener sistemas de un reactor eficientes en el intervalo de temperatura termofílica para la producción de biogás económicamente factible.

El nuevo proceso que se propone se dirige a servir a este objetivo, recomendando una tecnología eficiente, asequible para el ambiente, que permita la implementación a gran escala.

Inesperadamente los presentes inventores encontraron que se puede aumentar la eficacia de las tecnologías termofílicas de producción de biogás adicionando un hidrógeno adecuado que produce el cultivo microbiano termofílico al ya existente consorcio natural de producción de biogás. La actividad microbiana de los productores de metano se puede aumentar de esta manera en el consorcio termofílico, suministrando suficiente energía reductora y sustrato para la producción biológica de metano. Una ventaja adicional se puede emplear si usamos una cepa productora de hidrógeno que contribuye a la mejor utilización del sustrato orgánico, por ejemplo, por su capacidad para hidrolizar biopolímeros.

De acuerdo con la tecnología de la invención, la producción anaerobia de biogás se puede intensificar a través de un método biotecnológico relativamente sencillo. Esto mejora la factibilidad económica del sistema global cuando los residuos y productos secundarios generados en el procesamiento de alimentos y actividades agrícolas se convierten en biogás en una tecnología de tratamiento anaerobio.

La eficacia de la producción de biogás usando nuestro método se mejora significativamente y supera la eficacia de los procesos mesofílicos similares. Inesperadamente, el sistema termofílico demostró ser útil en una amplia variedad de aplicaciones que usan biomasa a partir de muchas fuentes. Esto indica que los diversos consorcios microbianos termofílicos son similares en al menos un aspecto, es decir, la producción de hidrógeno in situ es una etapa beneficiosa crucialmente importante en todos los sistemas termofílicos investigados hasta ahora.

Encontramos que *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* es un microorganismo particularmente adecuado para provocar el efecto ventajoso deseado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto, la invención se relaciona con un uso de una bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica, para aumentar la producción de metano en un sistema de fermentación de biomasa, en donde la biomasa se fermenta bajo condiciones anaerobias y termofílicas por un consorcio que comprende microorganismos que degradan polímeros, microorganismos acetogénicos y microorganismos metanogénicos.

En una modalidad preferida, la bacteria se usa en un método que comprende

- iniciar la fermentación de la biomasa y formar a partir de los microorganismos que participan en la fermentación, un consorcio capaz de producir biogás bajo condiciones termofílicas, en donde dicho consorcio comprende al menos microorganismos metanogénicos y que degradan polímero,
- inocular el sistema productor de biogás por un cultivo de microorganismo termofílico productor de hidrógeno,
- fermentar la biomasa bajo condiciones en donde los microorganismos se activan,
- recoger el biogás producido.

De acuerdo con un aspecto adicional, la invención se relaciona con un uso para aumentar la producción de biogás fermentando la biomasa bajo condiciones anaerobias y termofílicas, usando un consorcio que comprende microorganismos que degradan polímeros, microorganismos acetogénicos y microorganismos metanogénicos, en donde antes de iniciar la producción de biogás o durante la producción de biogás un cultivo de microorganismo termofílico, que produce hidrógeno, se añade, al menos una vez, al consorcio que produce biogás. Preferentemente, el consorcio comprende además un microorganismo degradante de polímeros y/o antes del inicio de la producción de biogás o durante la producción de biogás se añade un microorganismo degradante de polímeros, al menos una vez, al consorcio.

Después que se proporcionan las condiciones de fermentación termofílica, a temperatura se ajusta preferentemente a 45-70°C, con mayor preferencia a 50-60°C.

Después de la fermentación, si es necesario, el pH se ajusta. Preferentemente, al comienzo de la fermentación el pH está entre pH 6 y pH 8 con mayor preferencia entre pH 6,5 y pH 7,5, más preferentemente entre pH 6,5 y pH 7, entre pH 6,8 y pH 7,2, por ejemplo, aproximadamente pH 7, o entre pH 7 y pH 7,5.

Preferentemente, los microorganismos de la invención son bacterias. De acuerdo con la invención, los microorganismos son termófilos, es decir, son capaces de ejercer su efecto deseado bajo condiciones termofílicas, es decir, intervalo de temperatura. Preferentemente, en condiciones termofílicas la temperatura usada en la invención es preferentemente 40-90°C, con mayor preferencia 45-70°C, más preferentemente 50-60°C.

La bacteria productora de hidrógeno usada de acuerdo con la invención es una bacteria acetogénica.

Así, de acuerdo con la invención se usa una bacteria acetogénica que es capaz de trabajar bajo condición termofílica y anaerobia, y que es un productor de hidrógeno.

De acuerdo con una modalidad preferida, la bacteria usada en la invención tiene una actividad que degrada polímero, preferentemente que degrada un hidrato de carbono (polisacárido).

De acuerdo con una modalidad preferida adicional del método se pueden usar los aditivos de la invención. Los aditivos pueden ser, por ejemplo, nutrientes o alimentos para los microorganismos o bacterias, por ejemplo, diversos compuestos orgánicos o mezclas de éstos. Determinados compuestos, por ejemplo, el azúcar puede resultar en una inhibición de sustrato; por lo tanto, se deben llevar a cabo experimentos para determinar la cantidad útil.

Los materiales de gran área de superficie, por ejemplo, astillas de madera, se pueden aplicar también, y en modalidades preferidas, las células se pueden enlazar a los portadores (inmovilizadas a), por ejemplo, toba riolítica.

Preferentemente, la biomasa puede ser

- excremento líquido, por ejemplo, estiércol de cerdo o estiércol de aves de corral
- barro de agua residual, por ejemplo, barro de agua residual rico en lípidos (grasa),
- residuos vegetales, por ejemplo, paja, tallo de maíz (maíz), mazorca de maíz, etc., preferentemente residuos vegetales de las plantas de alta energía, por ejemplo, bagazo de caña o sorgo, alcachofa, por ejemplo, alcachofa de Jerusalén, cebada, papa, trigo, azúcar de remolacha, avena, colza, etc.,

o cualquier mezcla de éstos.

De acuerdo con una modalidad preferida adicional las células sedimentadas o en gránulos (por ejemplo, por centrifugación) se usan, o se usan células inmovilizadas (por ejemplo, células inmovilizadas a, por ejemplo toba riolítica o perlita).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS:

La Fig. 1 muestra la producción anaerobia de metano en unidades GC a partir de estiércol de cerdo cuando el sistema se inocula con un cultivo puro de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*.

La Fig. 2 muestra la producción de biogás a partir de estiércol de cerdo y diversos aditivos. Las fuentes de biomasa añadidas fueron barro de agua residual, azúcar (sacarosa) y corteza de madera.

Las Figs. 3 y 4 muestran la producción de biogás a partir de bagazo. El cultivo puro de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* se adicionó en diversas cantidades y los efectos de intensificación de la bacteria sedimentada (Fig.3) y de la misma bacteria inmovilizada sobre perlita (Fig. 4) se compararon.

La producción intensificada de biogás a partir de estiércol de cerdo (Fig. 5), barro de agua residual rico en lípido (Fig. 6) y la mezcla de los dos sustratos (Fig. 7). Los valores representan el contenido de metano (%) en comparación con el valor del día 14.

La Fig. 8 resume la producción de metano total en los experimentos individuales para el propósito comparativo.

Las Figs. 9 y 10 muestran la producción intensificada de biogás (en unidades de GC) usando la alcachofa de Jerusalén como fuente de biomasa. Diversas cantidades de cultivos puros de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* se añadieron a las muestras inoculadas. En el experimento mostrado en la Fig. 9 las células de la bacteria se usan junto con el medio, mientras que en la Fig. 10 se muestra el efecto de las células sedimentadas.

Las Figs. 11 a y 11 b presentan los datos de la producción intensificada y control de biogás usando sorgo dulce como sustrato bajo condiciones mesofílicas (11.a.) y termofílicas (11.b) La producción de biogás se expresa en volúmenes normalizados con los volúmenes de gas a 30 °C y para el contenido unitario de material seco del sustrato.

La Fig. 12 muestra la producción de biogás en un fermentador industrial termofílico de 15 m³. El fermentador contiene 6 m³ de estiércol de cerdo como sustrato. El sistema se operó en un modo de alimentación semicontinuo.

DEFINICIONES

Algunos de los términos usados en la presente descripción se explican más abajo; el resto de los términos y expresiones se usan como común en el lenguaje técnico del campo pertinente de la técnica.

"Biomasa" significa el material orgánico de los organismos vivos o no vivos (es decir, de origen microbiano, vegetal o animal) y los subproductos de cualquier procesamiento industrial que usan estos materiales así como la fracción orgánica de origen biológico producido en las actividades agrícolas y comunas humanas. La biomasa o su fracción se pueden convertir usando la fermentación.

Un "consorcio microbiano" significa una población de varias especies microbianas que involucran al menos dos cepas o especies independientes, donde se utiliza al menos un producto metabólico de una especie por una distinta, es decir, los microorganismos cooperan o actúan juntos.

"Condiciones termofílicas" significa un medio ambiente que es adecuado para el crecimiento microbiano y tiene una temperatura mínima de 40°C, preferentemente de 45°C, y con mayor preferencia de 45-75°C o al menos 50°C, o altamente preferido 50-60°C.

Una "bacteria acetogénica" es un microbio que produce ácidos orgánicos pequeños como uno de los productos finales de su fermentación, por ejemplo, acetato, propionato, o butirato, a partir de los productos de degradación de biopolímeros tales como polisacáridos o proteínas.

Una bacteria acetogénica "que produce hidrógeno" es capaz de convertir las moléculas de sustrato de origen de biopolímero (por ejemplo polisacáridos, proteínas) a gas hidrógeno.

Las bacterias acetogénicas y productoras de hidrógeno que se usan en el proceso patentado actúan preferentemente, pero no exclusivamente, como parte de un consorcio microbiano.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se describe más abajo en una manera más detallada, en parte por medio de ejemplos. Los ejemplos son de naturaleza meramente ilustrativos, y no se deben interpretar como que delimitan el alcance reivindicado.

10 La invención se relaciona con un uso de una bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica para aumentar la producción de metano en un sistema de fermentación de biomasa.

15 Un elemento esencial del uso de la invención es la inoculación de los sistemas que producen biogás por un cultivo de microorganismo apropiado, en donde dicho sistema productor de biogás opera a temperaturas termofílicas por fermentación anaerobia.

La inoculación se puede usar tanto durante el período de puesta en marcha de un fermentador de biogás como durante el período operativo de un sistema ya establecido que fermenta biogás.

20 Las siguientes consideraciones se deben tener en cuenta cuando se selecciona el microorganismo añadido: el microbio debe ser un microorganismo anaerobio que produce hidrógeno, termofílico (crecimiento a 45-70°C preferentemente entre 50-60°C). Preferentemente, debe ser una bacteria acetogénica.

25 La actividad biológica del microorganismo seleccionado debe facilitar los eventos microbiológicos que conducen a la producción de biogás, por ejemplo, a través de la generación de intermediarios adecuados para el rendimiento aumentado de biogás o a través de una fermentación más cabal del sustrato orgánico original. El microorganismo altamente preferido cumple ambos requisitos.

30 La bacteria apropiada se puede seleccionar mediante, por ejemplo, el siguiente enfoque:

Entre los microorganismos termofílicos, acetogénicos conocidos en la técnica se selecciona una cepa que tiene capacidad de producción de hidrógeno. La capacidad de producción de hidrógeno de la cepa se puede probar por cualquier método conocido [por ejemplo, Goodwin S. y otros, Appl. and Environmental Microbiology, 590-593, febrero (1988), Strocchi A y Levitt D L, The Journal of Clinical Investigation, 89 1304-1311 (1992)]

35 De acuerdo con una estrategia distinta se puede probar cualquier cepa recién aislada termofílica, que degrada polímeros. En este caso, la capacidad de degradar polímeros se demuestra cultivando las bacterias en el polímero particular (oligo o polisacáridos) como única fuente de carbono. Aquellos que pueden crecer en la fuente de carbono en particular serán capaces de su metabolismo. Las pruebas se deberán llevar a cabo bajo condiciones anaerobias (anóxica), condiciones termofílicas, en pH casi neutro. Si el microbio seleccionado puede crecer en un consorcio que forma biogás, puede contribuir a la intensificación de la producción de biogás.

40 Es recomendable buscar entre las bacterias acetogénicas ya que tienen una buena oportunidad para convertirse en un miembro del consorcio natural, que es un requisito previo de la producción aumentada de biogás.

45 La actividad que desarrolla hidrógeno de la cepa aislada se debe controlar.

De acuerdo con un método preferido se prueba la cepa seleccionada o aislada por su actividad que degrada polímero. Esto puede ser por ejemplo, la degradación de proteínas y/o polisacáridos.

50 Estas pruebas se pueden realizar usando métodos de rutina añadiendo el sustrato al cultivo de bacteria en condiciones anaerobias y termofílicas. El sistema deliberadamente debe carecer de otras fuentes de carbono.

55 De acuerdo con un enfoque adicional preferido se podrían examinar los microorganismos termofílicos conocidos degradantes de polímeros, que degradan proteínas o que degradan carbohidratos, de una cepa de bacteria acetogénica de actividad aumentada que produce hidrógeno.

60 Aunque la(s) cepa(s) seleccionada(s) de acuerdo a los procedimientos mencionados anteriormente será(n) probablemente más adecuada(s) para usar en la invención, los experimentos del modelo son aconsejablemente necesarios antes de la aplicación a gran escala para ver si la cepa seleccionada puede de hecho encajar en el consorcio termofílico que produce biogás.

En estos experimentos a escala de laboratorio la(s) cepa(s) seleccionada(s) se prueban para determinar su capacidad de adaptación al consorcio termofílico. La producción de biogás se modela de una forma tal que antes del inicio de la fermentación o durante el proceso desarrollado se añaden las bacterias cultivadas por separado y se controla la

producción de biogás. El experimento de control es idéntico en todos los aspectos excepto que la bacteria que intensifica no se añade al sistema.

5 Los resultados demostrarán la velocidad aumentada de producción de biogás y/o la cantidad absoluta y nos dirá si es aceptable el contenido de metano del biogás.

Además de la medición volumétrica del biogás producido, se determina su composición. Se puede usar cualquiera de las técnicas ampliamente conocidas y aceptadas para este propósito, por ejemplo, análisis de elemento, espectrometría de masas, métodos espectroscópicos, cromatografía de gases etc.

10 Basado en la información anterior, se supone que los microorganismos intensificadores buenos y adecuados probablemente se encuentran entre las siguientes especies:

15 *Género Thermotoga*, por ejemplo, *Thermotoga elfii*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neopolitana*,
Género Thermococcus, por ejemplo, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus sibiricus*, *Thermococcus celer*,
Thermococcus pacificus
Género Pyrococcus, por ejemplo *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus furiosus*,
Género Clostridium, por ejemplo *Clostridium thermocellum*, *Clostridium butyricum*
20 *Género Ruminococcus*, por ejemplo *Ruminococcus albus*, o de acuerdo con una modalidad preferida el Género *Caldicellulosiruptor*, con mayor preferencia *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. De acuerdo con una modalidad muy preferida el microorganismo es el *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 (DSMZ, Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig ALEMANIA).

25 Algunos ejemplos adicionales de bacterias candidatas potenciales que se usan en la realización de la tecnología patentada son como sigue:

Caloramator fervidus, por ejemplo, la cepa ATCC 43204, depositada como *Clostridium fervidus* [Patel B. K. y otros J. Bacteriol. 37, 123-126 (1984)],
30 *Coprothermobacter proteolyticus*, por ejemplo, la cepa ATCC 35245, depositada como *Thermobacteriodes proteolyticus* [Ollivier y col. Int. J Syst. Bacteriol. 35 425-428 (1985)],
Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, por ejemplo, la cepa *T. thermosaccharolyticum* KU110 [Ueno Y. y otros, Journal of Bioscience and Bioengineering, 92(4) 397-400 (2001)],
Thermotoga neapolitana [van Ooteghem S. A. y otros, Appl. Biochem. Biotechnol Spring 98-100 177-89 (2002)],
35 *Moorella thermoacetica* [Gner y otros, Appl. Envi. Microbiol 65 5124-5133 (1999)].

40 Un ejemplo preferido como inóculo es *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* y preferentemente la cepa DSM 8903. Esta cepa y otras cepas que poseen propiedades similares se pueden usar para la intensificación de la producción de biogás. El tamaño del inóculo es por lo general 5-10% del volumen total del fermentador si se usa un cultivo creciente.

En la práctica el método de la invención se puede llevar a cabo como sigue:

45 Se produce un cultivo bacteriano en crecimiento usando el medio apropiado, a 40-70°C.

El sustrato de la biomasa se llena en el fermentador y se inicia la producción de biogás usando cualquiera de los procedimientos conocidos y un sistema de producción de biogás se desarrolla usando consorcios naturales de microorganismos. El fermentador que produce biogás se inocula con el monocultivo cultivado de la bacteria seleccionada, por ejemplo, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. si es necesario se repite la inoculación según progresa la fermentación.

50 En la fase de puesta en marcha del proceso de biogás un requisito mínimo es mantener el sistema a la temperatura apropiada y en condiciones anaerobias. La degradación anaerobia de la mayoría de las fuentes de biomasa se desarrolla de forma espontánea, aunque en determinados casos la fase de puesta en marcha puede necesitar un tiempo considerable. El pH apropiado, que es por lo general cercano al neutro, se debe mantener cuando algunas fuentes de biomasa se fermentan, por ejemplo, la biomasa de origen vegetal; en otros casos (por ejemplo, barro de agua residual, excremento animal), el pH se estabiliza sin añadir ninguna sustancia también.

60 La fase de puesta en marcha se puede acortar usando inóculos, por ejemplo, de una instalación de tratamiento anaerobio de barro de agua residual. Los inóculos se pueden obtener de cualquier digestor anaerobio termofílico o se pueden preparar por separado usando excremento animal o barro de agua residual e incubándolo bajo condiciones anaerobias a temperatura termofílica e incubándolo hasta que se inicia la fermentación.

65 Uno puede usar también el inóculo a partir de un digestor mesofílico, pero en este caso el consorcio microbiano se debe adaptar a la temperatura termofílica, elevando lentamente la temperatura.

El recipiente experimental preferido es un fermentador anaerobio de un solo espacio capaz de realizar los modos operativos continuo o semi-continuo.

5 Aproximadamente 10-20% de la biomasa digerida (fermentada) se sustituye de forma continua o en intervalos de tiempo especificados y regulares añadiendo biomasa fresca al sistema a través de un sistema anaerobio cerrado.

El biogás producido se transfiere de vez en cuando o, preferentemente, de forma continua y se usa para la producción de energía. El biogás se puede utilizar cerca del sitio de su producción.

10 Es una observación común que mientras mayor sea el volumen del fermentador más lenta es la fase de puesta en marcha, sin embargo, el sistema alcanza un rendimiento operacional estable después de algún tiempo en todos los casos probados.

15 Para facilitar la producción a gran escala continua y económicamente factible del(de los) microorganismo(s) intensificador(es) seleccionado(s), se desarrolló una tecnología de fermentación nueva y simplificada y está siendo practicada en la instalación de fermentación Corax-Bioner Inc. La instalación tiene un volumen total de trabajo de 80 m³.

Ejemplos

Ejemplo 1

Selección y prueba de la bacteria productora de hidrógeno adecuada

25 Seleccionamos una bacteria acetogénica anaerobia que crece bien entre 45-70°C y preferentemente a 50-60°C.

La actividad productora de hidrógeno de la(s) cepa(s) seleccionada(s) se puede probar usando el método siguiente:

30 Un método directo para medir la actividad productora de hidrógeno usa la cromatografía de gases. La bacterias se cultivan en un recipiente de vidrio sellado de 50-150 ml en su medio de cultivo preferido bajo condiciones anaerobias. Cuando la densidad óptica del cultivo alcanza al menos 0,4/cm a 600 nm, una muestra de gas se extrae anaerómicamente del espacio de cabeza del recipiente y se inyecta directamente en el cromatógrafo de gases. El pico de hidrógeno, que se identifica usando una mezcla de gases de composición conocida, indica la actividad de la bacteria productora de hidrógeno.

35 Es usual tamizar diversas cepas bacterianas, cultivadas independientemente y aplicar en el método de la invención aquella que muestra la actividad productora de hidrógeno más alta.

Prueba de la capacidad de degradación de polímeros de la cepa productora de hidrógeno

40 De acuerdo con un método preferido se tamizan las cepas degradantes de polisacáridos. Un ejemplo de cómo esto se puede probar es el siguiente:

45 El reactivo usado para probar la actividad de degradación del polisacárido es el ácido dinitrosalicílico. El polisacárido se mezcla con agua y se adiciona una cantidad conocida del sobrenadante de las bacterias precultivadas. El pH se ajusta a 4,8 usando el tampón de citrato. Después de un período de incubación de generalmente 30 min a 50°C la reacción se termina adicionando ácido dinitrosalicílico. La absorbancia óptica se determina a 550 nm. Si el valor medido excede el de la muestra control, la bacteria produce la(s) enzima(s) extracelular(es) que degradan el polisacárido.

50 La actividad de degradación de la proteína se determina también usando un espectrofotómetro. El sobrenadante de la cepa bacteriana precultivada se adiciona a la muestra de proteína y el pH se ajusta a 7,0 con tampón de fosfato. La absorbancia de la muestra se mide a 280 nm. Una disminución en la absorbancia indica actividad de degradación de proteína.

Mantenimiento y cultivo de bacterias

Las dos cepas siguientes se usaron en los experimentos siguientes:

- 60 - Productor mesofílico de hidrógeno: *Enterobacter cloacae* DSM 3264 [DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Mascheroder Weg 1 b 38124 Braunschweig ALEMANIA, <http://www.dsmz.de/strains/no003264.htm>]; Gram(-), que puede crecer tanto aerómicamente como anaerómicamente entre 20-40°C.
- Productor termofílico de hidrógeno: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 [DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares),

Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig ALEMANIA, <http://www.dsmz.de/strains/no008903.htm>]: bacteria anaeróbica Gram(+), cultivada entre 40 y 80°C.

El mantenimiento de las cepas se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Ambas cepas se almacenaron a -70°C en un estado de congelación, se cultivaron en el medio DSM respectivo y específico, es decir, DSM-1 para *Enterobacter* y DSM 640 para *Caldicellulosiruptor*. El inóculo se cultivó de manera rutinaria en recipientes de vidrio estériles de 150 ml bajo condiciones de gas nitrógeno libre de oxígeno para garantizar el medio ambiente anaerobio.

Debido a la dispersión de la luz, el crecimiento fue seguido de la medición de la densidad óptica en un espectrofotómetro GENESYS6.

Ejemplo 2

Experimento preliminar para producir biogás a partir del estiércol de cerdo.

El estiércol de cerdo se usó en este experimento preliminar. El sustrato de barro se dispensó en alícuotas de 50 ml en recipientes de vidrio de volumen de 100 ml y selló hermético. Algunos de los recipientes se inocularon con 5ml del cultivo puro de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. El espacio vacío se sustituyó con gas nitrógeno. La incubación se llevó a cabo a 55°C. Una muestra de gas se extrajo cada día anaeróticamente del espacio de cabeza y el gas se sometió a análisis cualitativo y cuantitativo. Los resultados se presentan en la Fig. 1.

El eje x del gráfico indica los días posteriores al inicio del experimento, el eje y muestra la cantidad del biogás en unidades GC. Cuando se compararon con las muestras controles, los inoculados mostraron claramente que la producción de metano se inicia rápido y la generación global de biogás produce más gas que en los controles.

Este ejemplo ilustra que aumenta la velocidad de producción de biogás y aumenta también el volumen de biogás producido después de la adición de la cepa productora de hidrógeno seleccionada.

Degradación anaerobia de excremento de cerdo y aditivos seleccionados

En el próximo ejemplo el sustrato básico para la producción de biogás fue nuevamente el estiércol de cerdo, pero se trató en fermentadores de 50 litros y los aditivos se probaron por su capacidad para incrementar la producción de biogás. Los aditivos examinados fueron barro de agua residual, azúcar (sacarosa) y astillas de madera. El barro activado de agua residual contiene principalmente microorganismos y algún material orgánico sin digerir, el azúcar es una fuente de carbono preferida para la mayoría de los microbios y la astilla de madera aumenta la superficie disponible para los microbios. La Figura 2 muestra que en la presencia de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* la producción de biogás se inició muy rápidamente y el volumen global de producción de gas excede claramente el del control. Cuando el azúcar se adicionó al sistema, se observó la inhibición del sustrato.

Este ejemplo proporciona evidencia adicional para la producción intensificada de biogás cuando el proceso se escala y demuestra qué aditivos determinados son beneficiosos para la producción de biogás.

Ejemplo 3

Biogás a partir de bagazo

La biomasa seca se usó a diversas concentraciones, en el intervalo de 1-10VN%. Las pruebas se llevaron a cabo en recipientes de vidrio sellados de 100 ml de volumen. Los experimentos tuvieron la intención de determinar las condiciones de intensificación usando la bacteria centrifugada (Fig. 3) y la misma bacteria inmovilizada en toba riolítica (perlita) (Fig. 4).

El ejemplo demuestra que la producción de biogás se puede intensificar aún cuando el sustrato es predominantemente un material rico en celulosa, de bajo rendimiento en biogás, es decir un pasto energético. Se concluyó también que la concentración de las bacterias mediante centrifugación y más ventajoso aún a través de la inmovilización en un material barato portador de mineral pueden mejorar adicionalmente la producción de biogás. Varios materiales portadores de superficie altamente específica se pueden usar para la inmovilización de las bacterias productoras de hidrógeno; la perlita, un material de bajo costo y abundante, es uno de ellos.

Ejemplo 4

Estudio de la producción de metano por degradación del estiércol de cerdo

En este ejemplo, como un primer experimento, se investigó la formación de biogás a partir de estiércol de cerdo. El objetivo del experimento fue determinar la cantidad de biogás producida a partir de este sustrato. Estos datos obtenidos aquí se usaron como valores controles en los experimentos posteriores, para comparar los resultados obtenidos después.

5

La Fig. 5 muestra la producción diaria de metano, medida al tomar las muestras de alícuotas. Los números indican la producción acumulativa de biogás medida en el espacio de cabeza de los recipientes de vidrios. El valor obtenido en el día 14 se consideró 100% durante las comparaciones. Como se observa en la figura, la producción de metano se inicia en el día 7 u 8. Los recipientes se incubaron a 55°C, la que fue significativamente más alta que la temperatura inicial de la biomasa. Es concebible que los microbios presentes en el estiércol se deben elegir en las condiciones termófilas y tomar el tiempo para desarrollar un consorcio termófilico estable. Esto explica por qué la producción de biogás se inicia sólo después de un período prolongado de tiempo (días 7 u 8); realmente en este tiempo se desarrollaron los metanógenos, que inician una producción intensiva de metano.

10

15

En el experimento siguiente se examinó el barro de agua residual rico en lípido de un matadero. Las condiciones experimentales fueron idénticas a aquellas descritas anteriormente, es decir, 50 ml de sustrato dispensado en recipientes de 150 ml y la incubación anaerobia ocurrió a 55°C en una cámara termostática.

20

La Fig. 6 muestra el volumen de biogás acumulado en los recipientes, día a día. El experimento se terminó en el día 14 y la cantidad total generada en este tiempo se consideró como 100%. La formación intensiva de metano se observó a partir del día 5 ó 6 y la producción de biogás disminuyó después del día 12. El experimento demostró que el barro de agua residual es un sustrato adecuado para la producción de biogás.

25

En el experimento siguiente, se probó una mezcla 1:1 (por volumen) de estiércol de cerdo y el mismo barro de agua residual. La Figura 7 presenta los datos, que demuestran que, de forma similar a los resultados descritos anteriormente, el inicio de la producción de biogás sucedió después de unos pocos días y la intensidad de la producción se disminuye después del día 12.

30

La Fig. 8 muestra la comparación de las producciones acumulativas de biogás usando diversos de estos sustratos.

Las principales conclusiones de estos experimentos son:

- el barro de agua residual rico en lípidos es adecuado para la producción de biogás, y
- el uso de esta sustancia adicionada en aproximadamente un 45% se puede producir más de biogás en comparación con el estiércol de cerdo sólo.

35

Se reconoce que el contenido orgánico digerible superior en el barro de agua residual rico en lípidos es responsable de la productividad elevada de biogás.

40

Cuando se empleó una mezcla de dos sustratos el aumento de la producción de biogás fue sólo de 28%, que es más abajo que el valor obtenido usando el barro sólo. El contenido orgánico sólido del estiércol de cerdo usado en estos experimentos fue inferior que el del barro, así el efecto de dilución puede explicar el rendimiento inferior del excremento de cerdo y su mezcla con el barro.

Ejemplo 5

45

Diversos sustratos de biomasa de origen vegetal

Adicionalmente al bagazo, se probaron también otros sustratos de biomasa vegetal durante la aplicabilidad de la intensificación biotecnológica de la producción de biogás. El experimento siguiente investigó el uso de la alcachofa de Jerusalén como planta de energía y pretendió probar si se podía observar el efecto beneficioso de la presencia de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. El bulbo de alcachofa de Jerusalén, que contiene la mayoría de los azúcares almacenados y se encuentra en las raíces se cortó primero en pedazos. La Fig. 9 muestra los resultados cuando la biomasa se trató con el cultivo bacteriano en crecimiento (es decir, una pequeña fracción de medio de crecimiento se adicionó también en la mezcla de reacción) y la Fig. 10 presenta datos similares con células centrifugadas.

55

La principal conclusión de este experimento es que la alcachofa de Jerusalén es una fuente de biomasa particularmente adecuada para la producción de biogás. Esta planta se puede cultivar usando tecnología barata y produce alta concentración de biomasa. Se concluye también que el proceso descrito aquí puede ser igualmente útil con otras plantas de energía.

60

En los ejemplos 3-5 demostramos que la producción de biogás se puede intensificar como resultado de la adición de una bacteria adecuadamente seleccionada (que fue *C. saccharolyticus* en estos ejemplos pero igualmente puede ser otra cepa), y existe una relación directa causa-efecto que acompaña la adición de las bacterias en varias formas.

65

Ejemplo 6

Comparación de los sistemas mesofílicos y termofílicos utilizando diversos sustratos

Los experimentos que se reportan más abajo se basaron en los resultados obtenidos durante la fase previa del trabajo de desarrollo y sirvieron para comparar la productividad del biogás de los sistemas mesofílicos y termofílicos.

5

Los sustratos se usaron en cantidades de 10-15 g y el contenido de materia seca se determinó de manera precisa. Después, se preparó una suspensión mediante la adición de agua o solución tampón. El volumen de reacción se estandarizó de modo que cada gramo de materia seca se dispersó en 40 ml de agua o solución acuosa, y como consecuencia se aumentó el volumen de sustrato. Así el volumen final fue alrededor de 400 ml en cada experimento. Cuando se estudiaron los sustratos de origen vegetal, se suspendió en tampón de fosfato (pH7).

10

Se usaron recipientes de vidrio sellables de volumen 500 ml, inmediatamente después de llenar los recipientes con el sustrato se sellaron herméticamente y el espacio vacío se hizo anaerobio purgándolo con gas nitrógeno de alta pureza. Los recipientes de reacción se conectaron a los envases llenos con solución salina saturada y el volumen de biogás producido se determinó midiendo la cantidad de solución salina desplazada por el biogás.

15

Los valores medidos se normalizaron con el volumen de gas a 30°C para asegurar que los datos no contuvieran error sistemático debido a la dependencia de la temperatura de expansión del gas. Para la comparación los valores de productividad se expresan como ml de biogás por 1 g de sólido orgánico.

20

La composición del gas del biogás (por ejemplo, metano y dióxido de carbono) se siguió usando un cromatógrafo de gases (SRI 8610C) equipado con una columna PorapackQ y detector de conductividad térmica. El cromatógrafo de gases se calibró usando métodos estándares y mezclas de gases.

25

El contenido de metano del biogás osciló entre el 50-60% en los experimentos. Las figuras muestran la producción total de biogás.

Las bacterias productoras de hidrógeno se cultivaron por separado como se describió en el Ejemplo 1 y los cultivos frescos se adicionaron a los recipientes en concentración de 5-20%v/v (preferentemente en 10%v/v).

30

Según se especificó anteriormente, *Enterobacter cloacae* DSM 3264 se usó como productor mesofílico de hidrógeno a 30°C y *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 se empleó como productor termofílico de hidrógeno a 55°C.

Los controles se suplementaron con igual volumen de medios frescos, sin bacterias.

35

La formación de biogás se midió diariamente y representó como se observa en las figuras. La producción de biogás acumulativa se estimó después de normalizar los volúmenes de gases y tener en cuenta los valores parciales. El biogás total generado (normalizado para 1 g de sólido orgánico y para 30°C de temperatura) se comparó con los mismos números obtenidos con los controles y su relación se definió como el grado de intensificación.

40

Los datos para el sorgo dulce se presentan en las figuras 11 a y 11b y los datos correspondientes para el barro de agua residual, bagazo y alcachofa de Jerusalén se resumen en las tablas más abajo.

Los valores reales de los diversos sustratos se obtuvieron de la siguiente manera:

Bagazo

45

Mesofílico (30°C)

masa de la biomasa tratada(g):		10
contenido de material seco (%)		92,03
material seco/experimento (g):		9,203
Resultados	control	<i>E. cloacae</i> :
Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	49,2	88,0
Grado de intensificación (%):	100	178,8

Termofílico (55°C)

masa de la biomasa tratada(g):		10
contenido de material seco (%)		92,03
material seco/experimento (g):		9,203
Resultados	control	<i>C. saccharolyticus</i> :
Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	96,2	169,2
Grado de intensificación (%):	100	175,9

50

Sorgo dulce (Figs. 11.a. y 11.b.)

ES 2 390 347 T3

Mesofílico (30°C)

masa de la biomasa tratada(g):		15
contenido de material seco (%)		80
material seco/experimento (g):		12
Resultados	control	<i>E. cloacae</i> :
Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	47,9	75
Grado de intensificación (%):	100	156,5

Termofílico (55°C)

masa de la biomasa tratada(g):		15
contenido de material seco (%)		68,33
material seco/experimento (g):		10,25
Resultados	control	<i>C. saccharolyticus</i> :
Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	118,1	205,5
Grado de intensificación (%):	100	174,0

5 Alcachofa de Jerusalén, biomasa verde

Mesofílico (30°C)

masa de la biomasa tratada(g):		10
contenido de material seco (%)		94,6
material seco/experimento (g):		9,46
Resultados	control	<i>E. cloacae</i> :
Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	42,1	70,71
Grado de intensificación (%):	100	168,1

Termofílico (55°C)

masa de la biomasa tratada(g):		10
contenido de material seco (%)		91,9
material seco/experimento (g):		9,19
Resultados	control	<i>C. saccharolyticus</i> :
Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	84,8	119,5
Grado de intensificación (%):	100	140,9

10

Alcachofa de Jerusalén, tubérculo

Mesofílico (30°C)

masa de la biomasa tratada(g):		28
contenido de material seco (%)		36,8
material seco/experimento (g):		10,3
Resultados	control	<i>E. cloacae</i> :
Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	74,0	109,0
Grado de intensificación (%):	100	147,2

Termofílico (55°C)

masa de la biomasa tratada(g):		28
contenido de material seco (%)		21,14
material seco/experimento (g):		5,9192
Resultados	control	<i>C. saccharolyticus</i> :
Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	142,5	222,7
Grado de intensificación (%):	100%	156,1

15

Barro de agua residual

Mesofílico (30°C)

	control	<i>E. cloacae</i> :
masa de la biomasa tratada(g):	400	400
contenido de material seco (%)	6,8	6,7

ES 2 390 347 T3

	material seco/experimento (g):	27,2	26,8
	Resultados	control	<i>E. cloacae</i> :
	Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	47,6 47,5	70,6 65,1
	Promedio	47,55	67,85
	Grado de intensificación (%):	100	143
Termofílico (55°C)			
	masa de la biomasa tratada(g):	control 400	<i>C. saccharolyticus</i> : 400
	contenido de material seco (%)	4,1	4,1
	material seco/experimento (g):	16,4	16,4
	Resultados	control	<i>C. saccharolyticus</i> :
	Volumen total de gas a 30°C por 1 g de materia seca (ml):	68,4 65,7	104,6 114,6
	Promedio	67,05	109,6
	Grado de intensificación (%):	100	163,5

5 En la Tabla I más abajo se resumen los resultados de este experimento. Uno puede reconocer fácilmente que bajo condiciones termofílicas y después de adicionar la bacteria productora de hidrógeno la producción de biogás se intensificó ampliamente todos los casos investigados.

Tabla I

Tabla resumen de los resultados			
Sustrato	Hőmérséklet (°C)	Nota	volumen total de gas a 30° por 1 g de materia seca (ml)
Bagazo	30	Control	49
Bagazo	30	Entero	88
Bagazo	55	Control	96
Bagazo	55	Caldi	169
Sorgo dulce	30	Control	48
Sorgo dulce	30	Entero	75
Sorgo dulce	55	Control	118
Sorgo dulce	55	Caldi	205
alcachofa de Jerusalén, tubérculo	30	Control	74
alcachofa de Jerusalén, tubérculo	30	Entero	109
alcachofa de Jerusalén, tubérculo	55	Control	143
alcachofa de Jerusalén, tubérculo	55	Caldi	223
alcachofa de Jerusalén,			
biomasa verde	30	Control	42
alcachofa de Jerusalén,			
biomasa verde	30	Entero	71
alcachofa de Jerusalén,			
biomasa verde	55	Control	85
alcachofa de Jerusalén,			
biomasa verde	55	Caldi	119
Barro de agua residual	30	Control	47
Barro de agua residual	30	Entero	68
Barro de agua residual	55	Control	67
Barro de agua residual	55	Caldi	110

Ejemplo 8**Experimento de campo en un fermentador a pequeña escala**

5 El efecto beneficioso de la adición de un productor de hidrógeno termófilico, anaerobio, se demostró en un experimento presentado. El fermentador se erigió en una granja de cerdos que tiene aproximadamente 12000 cerdos. La unidad principal del sistema es el fermentador, que es un fermentador anaerobio, de un solo espacio reactor, que tiene un volumen total de 115 m³. La temperatura operativa fue de 55°C, esta se mantuvo con la ayuda de una bobina de calentamiento incorporada en la que se circuló el agua caliente. El fermentador completamente agitado se llenó con 6 m³ de estiércol de cerdo.

10 En experimentos previos y en este, la degradación anaerobia se inició mediante la adición de un volumen pequeño y constante de barro de agua residual gastado, el efluente del fermentador anaerobio que funciona en la Regional de "Bacsviz" y en la instalación para el tratamiento de agua residual doméstica de la ciudad de Kecskemet (6000 Mindszenti krt. 36 Kecskemet, Hungría). Se debe señalar que la producción de biogás se inicia sin la adición del barro gastado, solamente más tarde.

20 El fermentador funciona en un modo semi-continuo de operación, todos los días se sustituye el 10% del volumen del fermentador con sustrato fresco. Un envase para el almacenamiento de gas mantiene el biogás y evita el reflujó potencialmente peligroso de gas y/o sustrato. El biogás después, pasa a través de un dispositivo que elimina el vapor de agua (dedo frío) antes de que pase a través de un dispositivo de medición de volumen de gas que registra la producción de biogás de una manera continua. Las muestras de gases se recogen en este punto para seguir los cambios en la composición de gas. Un soplete de gas vaporiza después el biogás por razones de seguridad, para evitar el riesgo de explosión.

25 El fermentador es hermético al aire y establece y mantiene así las condiciones anaerobias. El biogás generado en el inicio del proceso sustituye el aire en el fermentador por encima de la fase líquida. Como alternativa, se puede establecer la capacidad anaerobia purgando el fermentador con los gases dióxido de carbono o nitrógeno. En la puesta en marcha de la operación, el fermentador se llenó casi por completo con estiércol de cerdo cuyo volumen se reduce continuamente a un nivel de 6 m³.

35 Durante el período inicial, el control o producción de biogás basal se registró hasta que se estableció el funcionamiento estable. El tratamiento anaerobio se inició el 10 de septiembre de 2005, la producción de gas se estabilizó 6 días después indicando que la estrategia de puesta en marcha fue muy bien realizada. Unos pocos días es un período de tiempo usual para alcanzar a un nivel aproximadamente constante de la producción de gas en los fermentadores. Después que se alcanzó el funcionamiento estable, el rendimiento del fermentador se registró durante 31 días más para asegurarse de que la "línea base" espontánea de la producción de biogás se puede mantener en el mismo nivel. En el día 31 el fermentador se inoculó con un cultivo precultivado de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* a una concentración volumétrica de 10 %v/v. Un volumen igual de sustrato se extrae del fermentador antes de la inoculación de modo que el mismo volumen fermentado se mantuvo en el fermentador. La Figura 12 muestra que la producción de biogás aumentó significativamente después de la inoculación y estuvo estable en este nivel elevado durante al menos dos meses (al menos hasta el 26 de noviembre de 2005). El experimento está todavía en curso de determinar la longitud de la intensificación en el tiempo después de la inoculación.

45 Algunas de las características esenciales y efectos beneficiosos de la tecnología biotecnológica de intensificación de biogás de la invención se resumen más abajo.

50 La invención ofrece modificaciones en las tecnologías de tratamiento anaerobio de biomasa, lo que aumenta la eficacia de las plantas de biogás ya existentes y acorta el período de pago de las recién establecidas mediante la aplicación de un proceso relativamente sencillo. En la solución se explotan las propiedades ventajosas recientemente reconocidas de los microorganismos que participan.

55 La tecnología convierte los residuos orgánicos y subproductos de la agricultura y la industria de producción de alimentos y los residuos orgánicos comunales en biogás y biofertilizante mediante un proceso cerrado. Como resultado, la biomasa orgánica peligrosa para el ambiente, que se considera frecuentemente como "desperdicio" se recicla sin la producción de otras sustancias contaminantes. Los productos de la tecnología de tratamiento anaerobio son útiles para un portador de energía renovable y como fertilizante.

60 La tecnología se puede adoptar para cada uno de los procesos de tratamiento biológico anaerobio conocidos y utilizados en la actualidad. Es particularmente beneficioso en las granjas de animales que se ocupan de al menos 200 animales que tienen un tamaño unitario de 500 kg cada una o equivalente al ganado más reducido. La tecnología da excelentes resultados con excremento o barro animal, otros residuos orgánicos sólidos, mezclados o líquidos, residuos sólidos comunitarios, barro de aguas residuales, y diversos residuos de la agricultura e industria de alimentos.

Las ventajas de usar la nueva tecnología, como se describió en la presente solicitud son las de ofrecer los siguientes beneficios para los procesos de tratamiento anaerobio.

1. El biogás que se forma en cantidades en exceso es un valioso portador de energía renovable. Se puede usar en la calefacción, así como en la generación de electricidad.

2. El efluente del fermentador es un excelente fertilizante natural que es mucho mejor que la aplicación directa del excremento animal debido a:

- el contenido valioso de nitrógeno se preserva durante la fermentación anaerobia;

- la acidez del material disminuye, su pH aumenta generalmente de pH=7 a pH=8.

- la relación C/N disminuye en 30-50%, lo que hace el efluente adecuado para la aplicación directa en los cultivos agrícolas;

- el contenido importante de fósforo y potasio se convierte en formas que son fácilmente absorbidas por las plantas;

- las semillas de las malas hierbas se dañan durante el tratamiento anaerobio, por lo tanto, una cantidad reducida de semillas viables de malas hierbas se encuentra en el efluente;

- el producto presenta significativamente menos molestias de olor y se puede deshidratar más fácil que el excremento fresco.

3. El efluente de un fermentador anaerobio disminuye los problemas de salud pública relacionados con la eliminación de residuos debido a:

- la mayor parte de los patógenos humanos se mueren durante el tratamiento anaerobio;

- el volumen de la biomasa disminuye por lo tanto es más fácil depositar el efluente;

- la concentración de los componentes peligrosos para el ambiente, por ejemplo, el BOI es inferior en 60-70% y el COI disminuye en 50-60% después de la fermentación anaerobia;

4. La tecnología tal como se describe en la presente invención facilita el funcionamiento económicamente factible y tecnológicamente estable de los sistemas de reactores únicos sencillos. Los costos de inversión iniciales se mantienen a bajo nivel, lo que hace la tecnología productora de biogás económicamente accesible también para las entidades más pequeñas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica, para aumentar la producción de metano en un sistema productor de biogás, en donde la biomasa se fermenta en condiciones anaerobias y termofílicas por un consorcio que comprende los microorganismos degradantes de polímeros, microorganismos acetogénicos y microorganismos metanogénicos.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en donde el sistema productor de biogás se inocula por un cultivo de la bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica durante el período de puesta en marcha o durante el período operativo del sistema de fermentación de biogás.
- 15 3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica pertenece al género *Thermotoga*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Clostridium*, *Ruminococcus* o *Caldicellulosiruptor*, preferentemente la bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica es *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*.
- 20 4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la biomasa es
 - excremento líquido,
 - barro de agua residual o
 - desperdicio vegetal, preferentemente desperdicio vegetal a partir de plantas de alta energía, o cualquier mezcla de éstos.
- 25 5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica se usa junto con un aditivo, preferentemente un material utilizable como un nutriente por cualquiera de los microorganismos y/o un material de área de superficie aumentada.
- 30 6. El uso de la reivindicación 5 en donde las células de la bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica se sedimentan o se unen a un portador, preferentemente un portador inerte, de alta superficie específica, por ejemplo, perlita.
- 35 7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la biomasa se fermenta en un fermentador que tiene un recipiente de reactor único o un espacio de reactor único.
- 40 8. El uso de la reivindicación 7, en donde la bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica se usa en un método en donde la biomasa se fermenta en un sistema de operación continua, en donde el biogás producido y o la biomasa fermentada producida se extrae continuamente o múltiples veces, preferentemente en períodos de tiempo determinados, y la bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica se alimenta al fermentador continuamente o múltiples veces, preferentemente en períodos de tiempo determinado.
- 45 9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la bacteria tiene una actividad degradante de polímeros, preferentemente degradante de carbohidratos.
- 50 10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica se usa en un método que comprende las etapas de
 - iniciar la fermentación de la biomasa fijando su temperatura a 45-70°C, preferentemente a 50-60°C, e inocular opcionalmente la biomasa con un inóculo que comprende microorganismos degradantes de polímeros, microorganismos acetogénicos y/o metanogénicos,
 - proporcionar condiciones anaerobias para la fermentación,
 - antes del inicio de la fermentación o durante la fermentación, inocular el sistema productor de biogás con un cultivo de bacteria productora de hidrógeno, termofílica, anaerobia, acetogénica,
 - continuar la fermentación a 45-70°C, preferentemente a 50-60°C, bajo condiciones anaerobias,
 - 55 - recoger o utilizar el biogás que contiene metano producido.

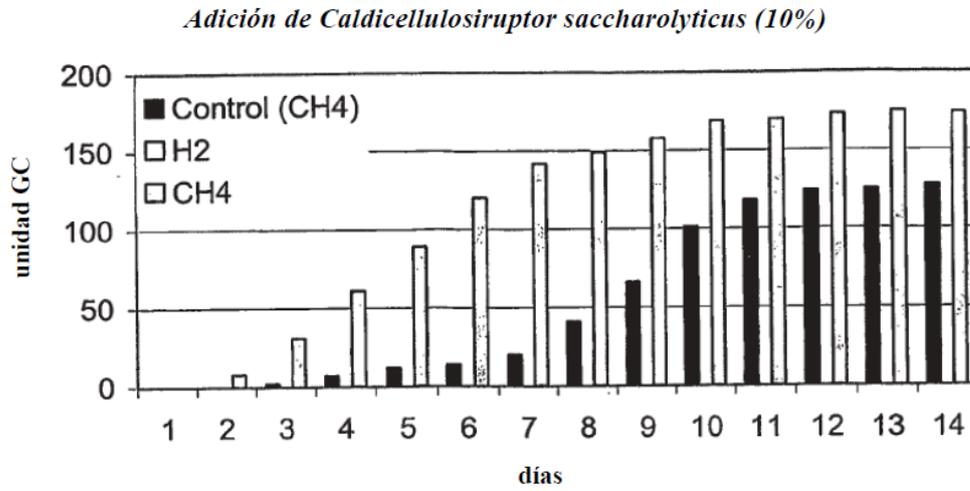


Figura 1

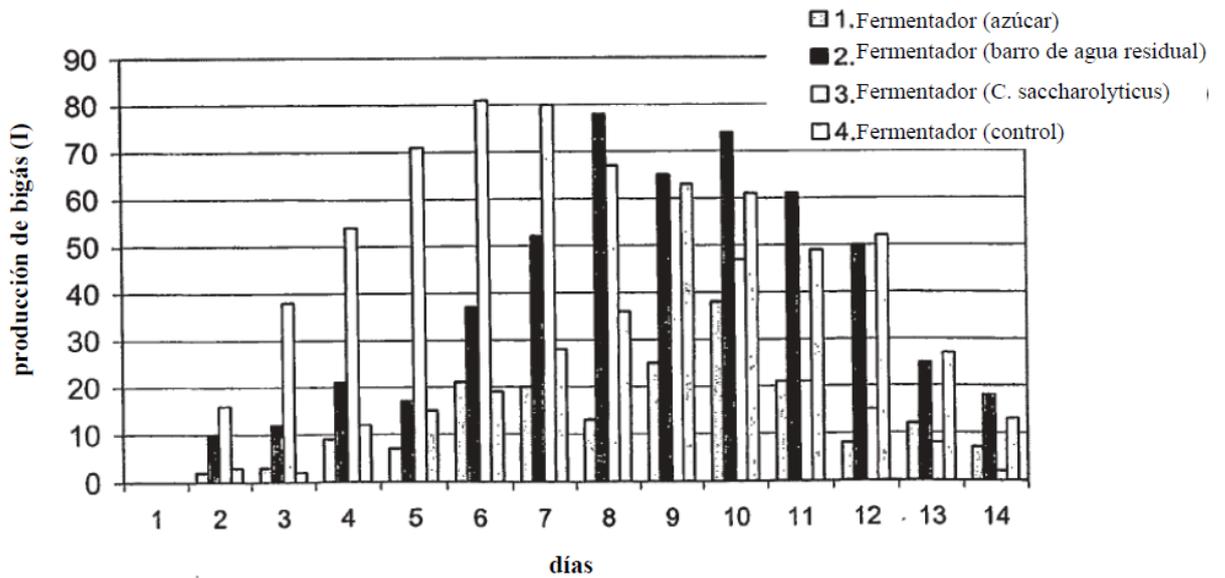


Figura 2

Centrifugación (10x)

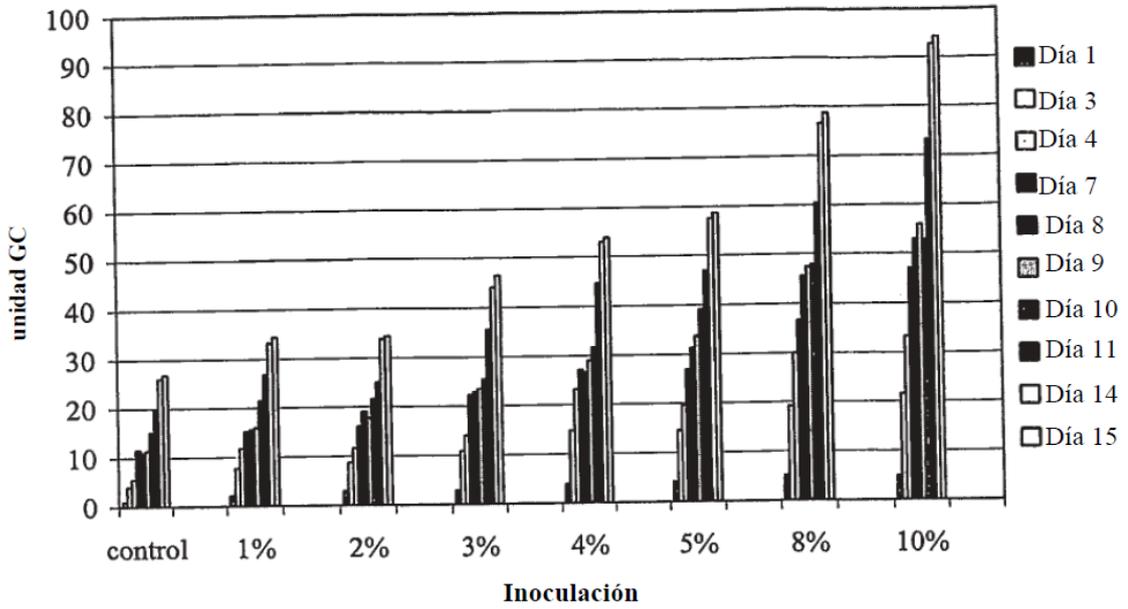


Figura 3

Inmovilización

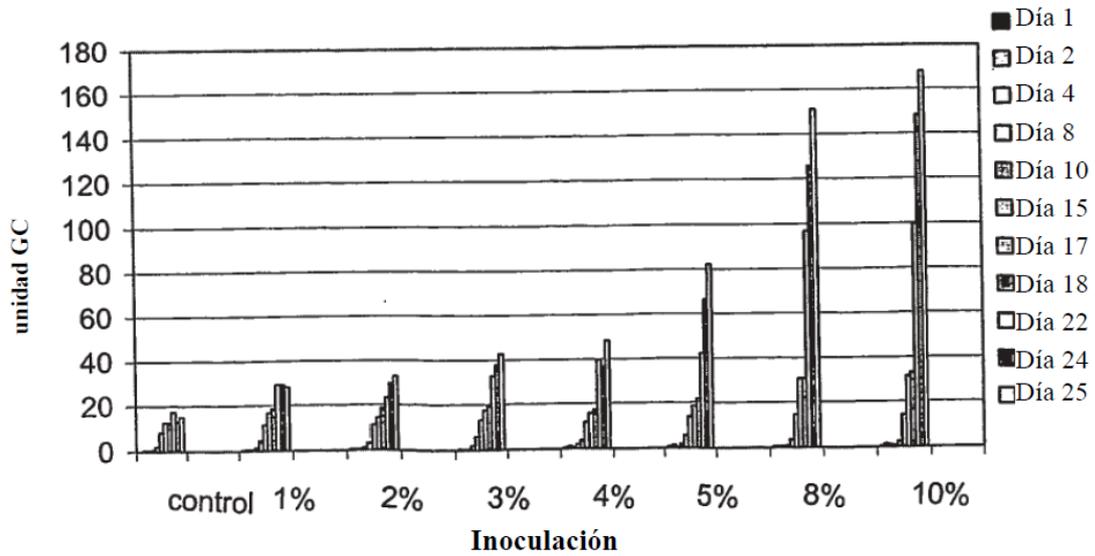


Figura 4

Producción de biogás a partir de estiércol de cerdo

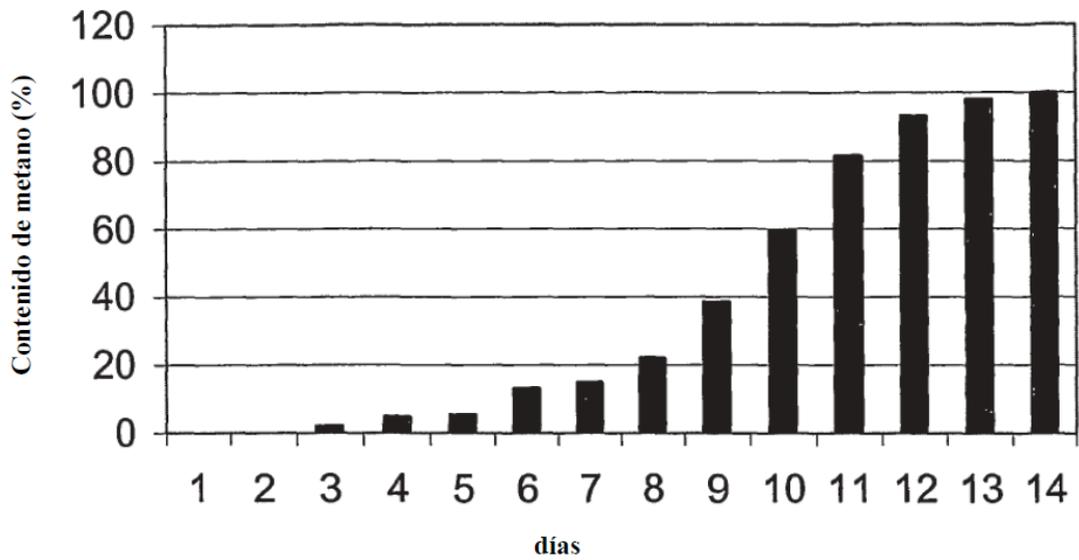


Figura 5

Producción de metano a partir de barro de agua residual rico en lípidos

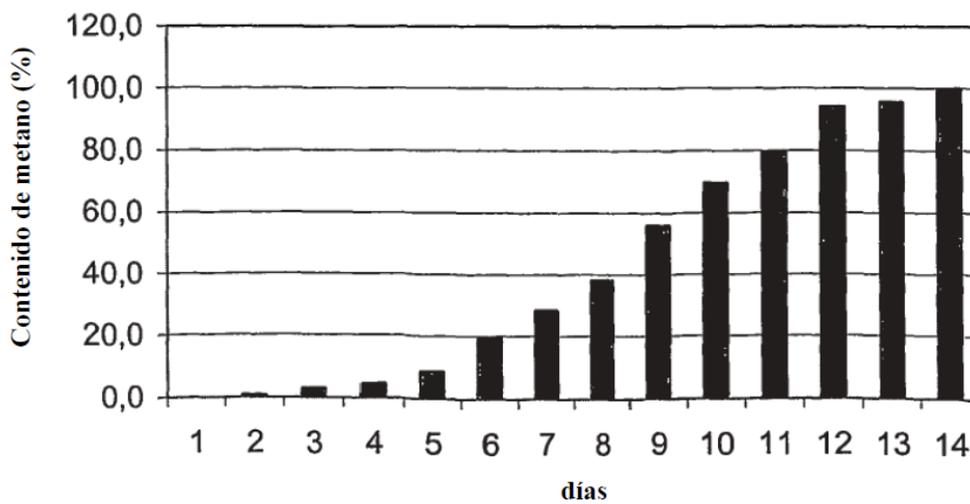


Figura 6

Producción de metano a partir de barro de agua residual rico en lípidos y estiércol de cerdo

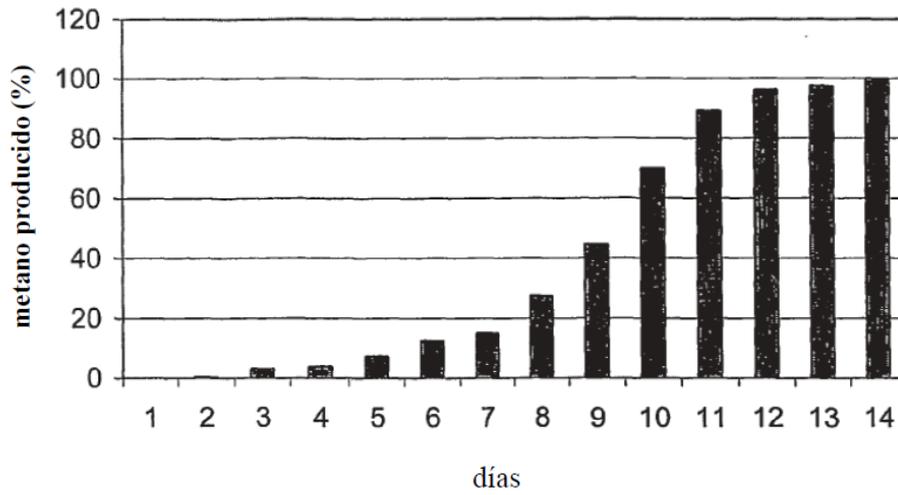


Figura 7

Cantidad relativa de metano producido en varios sustratos orgánicos

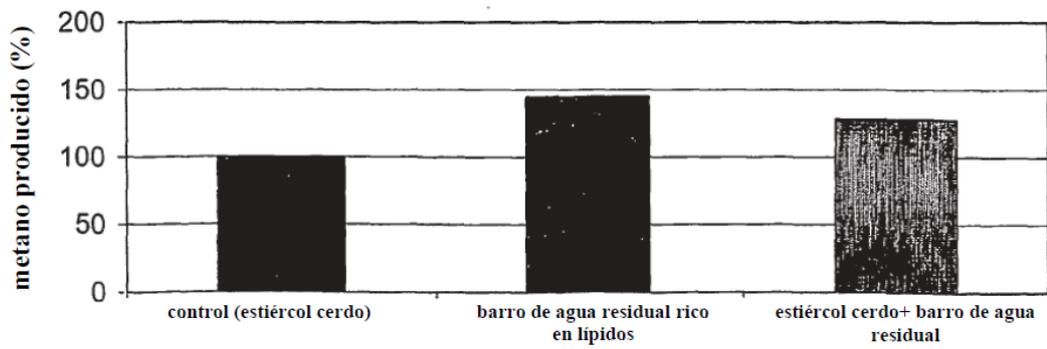


Figura 8

Uso de alcachofa de Jerusalén como un sustrato

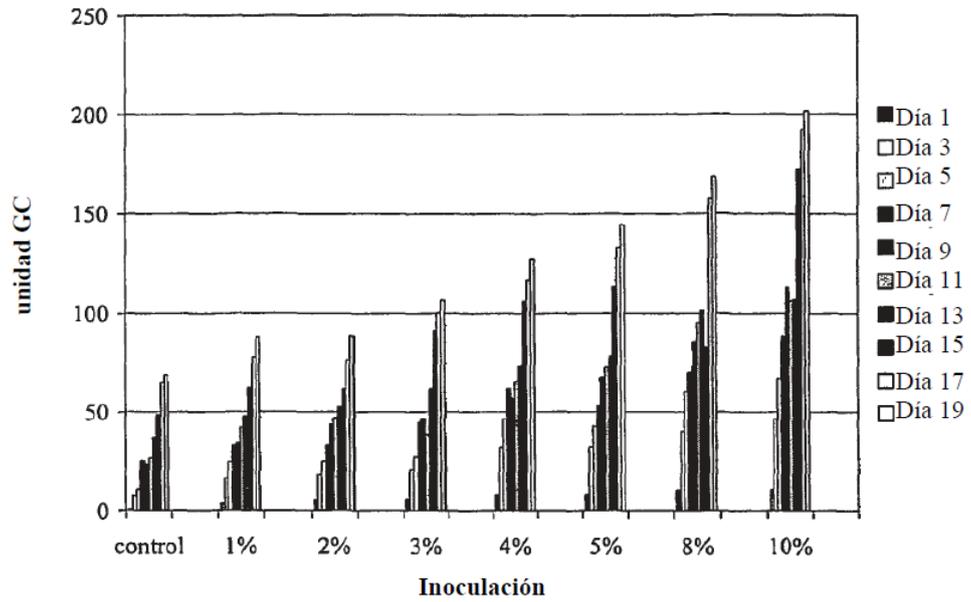


Figura 9

Uso de alcachofa de Jerusalén como un sustrato

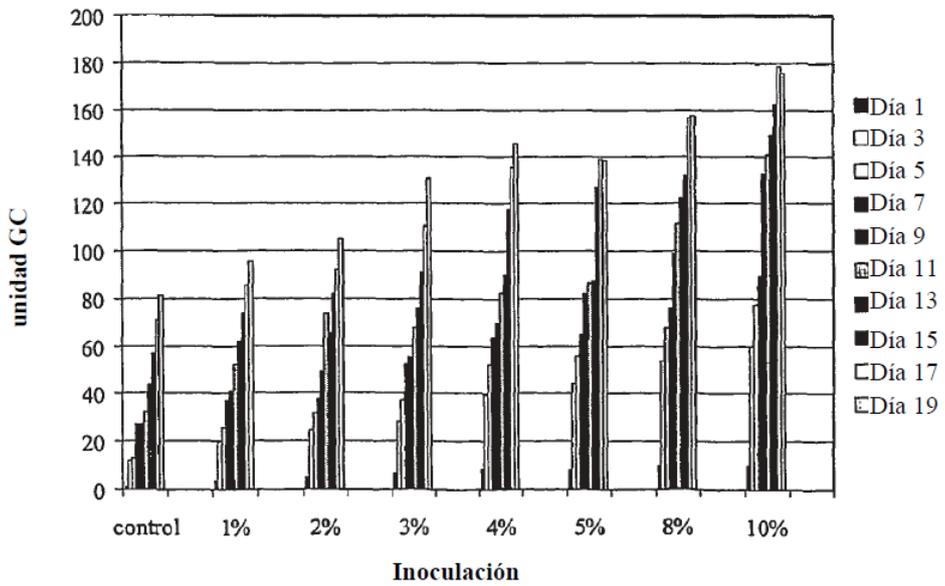


Figura 10

Sorgo dulce

30°C

Producción de biogás/1g materia seca

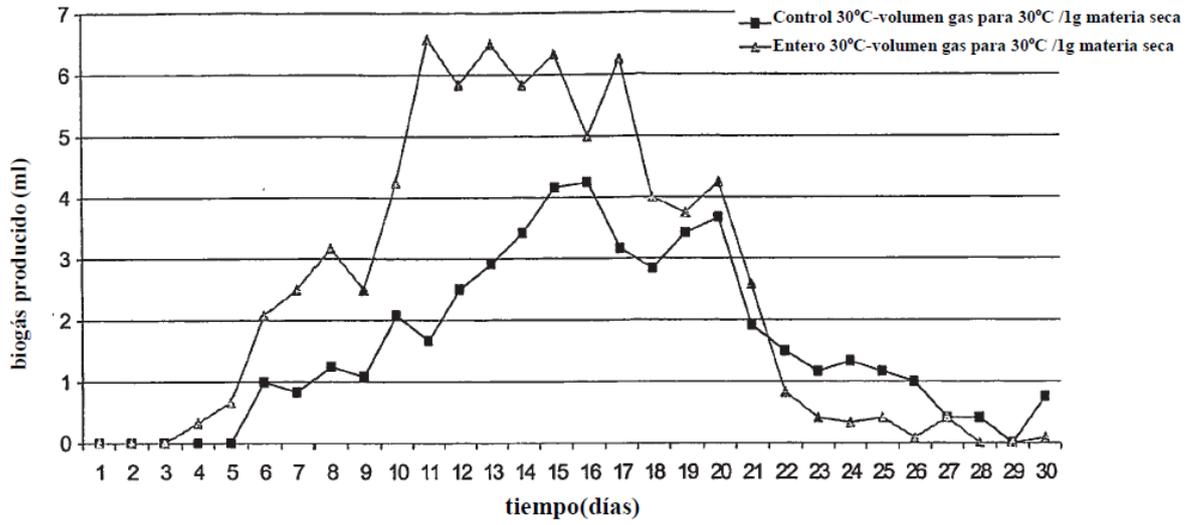


Figura 11 a

55°C

Producción de biogás/1g materia seca

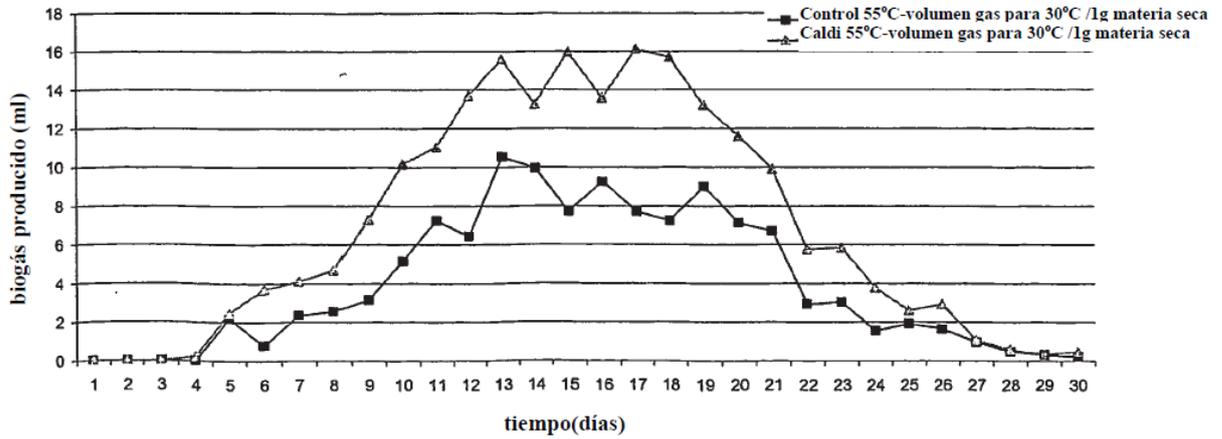


Figura 11 b

Producción de gas de un fermentador industrial a pequeña escala

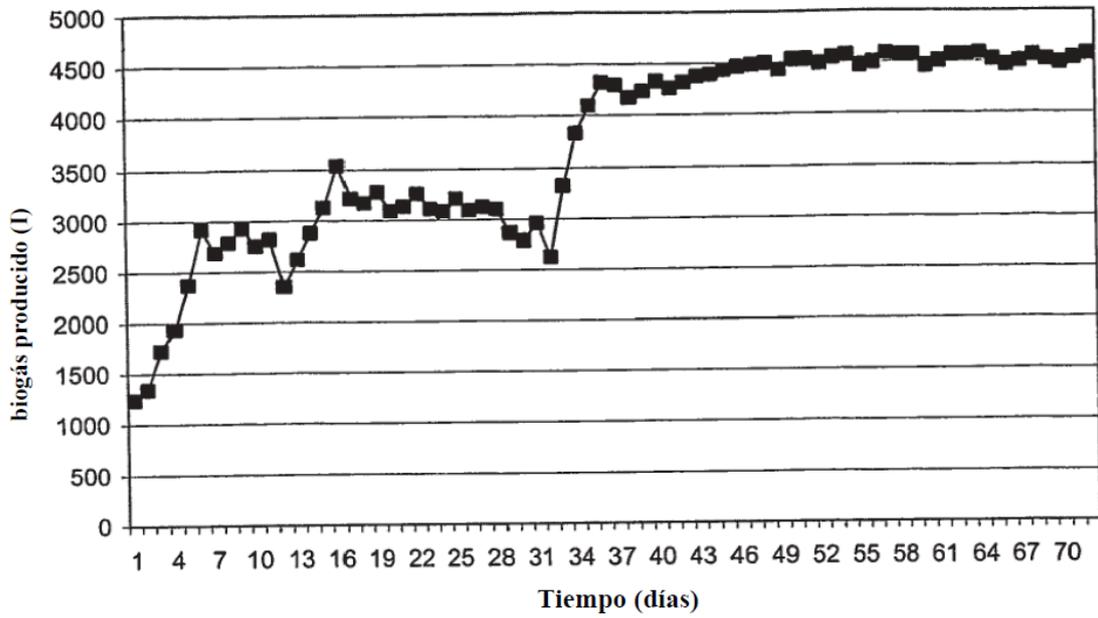


Figura 12