

**SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN  
DE HIDRÓGENO A PARTIR DE GLICEROL CRUDO EMPLEANDO  
*Enterobacter sp.***

**STEFANIA MANTILLA PLATA  
NATHALIA ALEJANDRA RANGEL MANTILLA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2017**

**SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN  
DE HIDRÓGENO A PARTIR DE GLICEROL CRUDO EMPLEANDO  
*Enterobacter sp.***

**STEFANIA MANTILLA PLATA  
NATHALIA ALEJANDRA RANGEL MANTILLA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Ingeniero Químico**

**Directora:  
VIVIANA SÁNCHEZ TORRES  
Ingeniera Química, Ph.D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2017**

## **DEDICATORIA**

*Quiero agradecer a Dios por darme sabiduría y entendimiento para emprender cada etapa en el desarrollo de mi carrera profesional. Por darme esa gracia especial, estar siempre a mi lado, ser mi guía y ayudarme en todo momento.*

*A mi mamá, Stella Plata Delgado por motivarme siempre a dar lo mejor de mí. Por enseñarme a ser perseverante, escucharme y ser mi apoyo incondicional.*

*A mi papá, Jairo Fernando Mantilla por sus sabios consejos, enseñarme las cosas que realmente son importantes en la vida e inculcar en mí valores y principios.*

*A mi hermano, Edwin Mantilla por alegrar mis días y enseñarme siempre a ver las cosas de la mejor manera posible.*

*A mi nonita, Rosa Delia Salcedo por ser el angelito que me brindó su amor y su alegría.*

*A mis abuelitos, Elías y Cecilia por tenerme siempre en sus oraciones y darme lo mejor de ellos siempre.*

*A mi familia por haber creído en mí y compartir conmigo cada momento.*

*A mi novio, Sergio Andrés Parra por estar siempre a mi lado y motivarme a seguir construyendo mis sueños a pesar de los obstáculos.*

*A mi amiga, Vanessa Sanabria por querer siempre lo mejor para mí y tener su apoyo siempre.*

**Stefania Mantilla Plata**

## **DEDICATORIA**

*Dedico este proyecto primeramente a Dios, por darme fuerza y guiarme para afrontar el camino paso a paso con paciencia, sabiduría y fortaleza. Ayudándome a discernir en las decisiones tomadas y mantener siempre mi corazón lleno de esperanza para lograr los objetivos propuestos.*

*A mi abuela Rosa Delia Salcedo, por ser ese apoyo incondicional y ser esa luz que iluminó mi camino.*

*A mi tía Nelly Rodríguez y mi abuela Praxedis Rodríguez, por ser esas segundas mamás quienes han inculcado en mí valores y principios con los que he crecido como una persona íntegra.*

*A mi madre Mónica Patricia Mantilla Salcedo, por ser esa gran consejera y apoyarme en todo momento para poder lograr las metas alcanzadas.*

*A mi hermana Silvia Juliana Rangel por escucharme siempre y ser incondicional.*

*A mi familia, por ser tan maravillosa y ser un gran apoyo.*

*A mi mejor amigo Andrés Felipe Villarreal, por escucharme cuando más lo necesité e impulsarme en los momentos difíciles.*

*A mis amigos, por acompañarme en el camino universitario.*

**Nathalia Alejandra Rangel Mantilla**

## **AGRADECIMIENTOS**

A los profesores de la Universidad Industrial de Santander por todos los conocimientos que infundieron en nosotras a lo largo de nuestra vida universitaria.

Al grupo de investigación CINBIN por darnos la oportunidad de realizar las pruebas experimentales de nuestro proyecto de grado.

A nuestra directora la Dr. Viviana Sánchez por orientarnos y compartir con nosotras sus conocimientos. Por su dedicación, entrega y paciencia en cada una de las etapas para la elaboración de nuestro proyecto.

A la bióloga Oriana Danuta Serna por su tiempo y disposición para guiarnos y enseñarnos cada parte de este proceso.

Al Ingeniero Químico Víctor Alexis Lizcano por su colaboración en el análisis de muestras por cromatografía.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO TEORICO	17
1.1 GLICEROL CRUDO EN COLOMBIA	17
1.2 HIDRÓGENO COMO COMBUSTIBLE	17
1.3 FERMENTACIÓN OSCURA	19
1.4 <i>ENTEROBACTER</i>	19
1.5 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR BACTERIAS DEL GÉNERO <i>ENTEROBACTER SP</i>	20
2. METODOLOGÍA	21
2.1 CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO	22
2.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS	23
2.3 INFLUENCIA DEL OXÍGENO	24
2.4 INFLUENCIA DEL TIEMPO	24
2.5 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO	24

2.6 INFLUENCIA DEL pH	25
2.7 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE NH <sub>4</sub> Cl COMO FUENTE DE NITRÓGENO	25
2.8 EFECTO DEL MEDIO DE SOPORTE EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	25
3 RESULTADOS	27
3.1 INFLUENCIA DEL OXÍGENO	27
3.2 INFLUENCIA DEL TIEMPO	28
3.2.1 Curva de pH en medio mínimo de sales	29
3.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO	30
3.3.1 Producción de hidrógeno a diferentes concentraciones de glicerol	30
3.3.2 Crecimiento a diferentes concentraciones de glicerol	31
3.4 INFLUENCIA DEL pH	32
3.5 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE NH <sub>4</sub> Cl COMO FUENTE DE NITRÓGENO	33
3.6 EFECTO DEL MEDIO DE SOPORTE EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	34
3.6.1. Producción de hidrógeno en modo biopelícula vs cultivo en suspensión	34

3.6.2 Crecimiento en modo biopelícula vs cultivo en suspensión	35
3.7 ANÁLISIS DEL CONSUMO DE GLICEROL Y CÁLCULO DE RENDIMIENTOS	36
3.7.1 Consumo de glicerol y rendimientos	36
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39
BIBLIOGRAFIA	44
ANEXOS	49

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Comparación de las 3 principales rutas de producción biológica de hidrógeno.	18
Figura 2. Metodología experimental para determinar las condiciones de cultivo para la producción de hidrógeno con <i>Enterobacter</i> sp.	21
Figura 3. Viales con los diferentes medios de soporte.	26
Figura 4. Prueba de producción de hidrógeno y crecimiento purgando con nitrógeno vs sin purgar.	27
Figura 5. Consumo de glicerol y rendimientos purgando con nitrógeno vs sin purgar.	28
Figura 6. Prueba de producción de hidrógeno y crecimiento a diferentes tiempos.	29
Figura 7. Curvas de pH y crecimiento a diferentes tiempos.	30
Figura 8. Prueba de producción de hidrógeno a diferentes concentraciones de glicerol.	31
Figura 9. Prueba de crecimiento a diferentes concentraciones de glicerol.	32
Figura 10. Prueba de producción de hidrógeno y crecimiento a distintos pH.	33
Figura 11. Prueba de producción de hidrógeno y crecimiento a diferentes concentraciones de $\text{NH}_4\text{Cl}$ .	34
Figura 12. Prueba de producción de hidrógeno en modo biopelícula vs cultivo en suspensión.	35
Figura 13. Prueba de crecimiento en modo biopelícula vs cultivo en suspensión.	36
Figura 14. Consumo de glicerol y rendimiento de producto respecto al sustrato en cada condición.	37

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
Anexo A. Medios de cultivo	49
Anexo B. Curva de calibración	50

## RESUMEN

**TITULO:** SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE GLICEROL CRUDO EMPLEANDO *Enterobacter* sp\*

**AUTORES:** STEFANIA MANTILLA PLATA  
NATHALIA ALEJANDRA RANGEL MANTILLA\*\*

**PALABRAS CLAVES:** *ENTEROBACTER* SP, HIDRÓGENO, GLICEROL, FERMENTACIÓN OSCURA.

### DESCRIPCIÓN

Las necesidades energéticas mundiales crecen exponencialmente; sin embargo, las reservas de combustibles fósiles no renovables se han ido agotando, lo que ha llevado a explorar fuentes de energía alternativas. La producción de biodiesel está aumentando continuamente y genera glicerol crudo como subproducto. Este glicerol tiene un valor comercial inferior debido a su carácter crudo, sin embargo, tiene múltiples aplicaciones industriales, entre ellas, sirve como fuente de carbono para la producción biológica de hidrógeno por medio de la fermentación oscura.

En este proyecto de investigación se estudió la producción de hidrógeno de la *Enterobacter* sp R2B1, género de bacterias Gram negativas, a través de la fermentación oscura y usando como sustrato glicerol crudo. Inicialmente se quiso probar la producción de hidrógeno purgando con nitrógeno vs sin purgar, evidenciando mayor producción en condiciones microaerobias. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizaron 4 pruebas variando tiempo, pH, concentración de glicerol y concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , en donde se midió la producción de hidrógeno y el crecimiento bacteriano. A partir del análisis de estos resultados se buscaron posibles factores que beneficiaran la producción de hidrógeno y se obtuvo que el tiempo y las concentraciones más favorables para la mayor producción de hidrógeno fueron a las 96h con unas concentraciones de 10 g/L de glicerol y 1g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Así mismo al ajustar el pH a 7,0 se favorece la fermentación oscura. Por otra parte, se experimentó el crecimiento en modo biopelícula usando como medio de soportes estropajo, fibra sintética (fibras tipo poliamidas no tejidas) y fibra de carbono, en donde se demostró que emplear un medio de soporte no favorece la producción fermentativa de hidrógeno.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Viviana Sánchez Torres, Ingeniera Química, Ph.D

## ABSTRACT

**TITLE:** SELECTION OF CROP CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF HYDROGEN FROM CRUDE GLYCEROL EMPLOYING *Enterobacter* sp.\*

**AUTHORS:** STEFANIA MANTILLA PLATA  
NATHALIA ALEJANDRA RANGEL MANTILLA\*\*

**KEY WORDS:** *ENTEROBACTER* SP, HIDROGEN, GLYCEROL, DARK FERMENTATION

### DESCRIPTION

Due to global energy consumption non-renewable fossil fuel reserves are rapidly depleting. This rapid depletion of fossil fuel reserves has led to finding alternative sources of energy. Biodiesel production is increasing and generating glycerol as by-product. This glycerol has a lower commercial value due to its crude nature, however, it has multiple industrial applications, among them, it serves as a carbon source for the biological production of hydrogen by means of dark fermentation.

During this project, we studied the production of hydrogen from the *Enterobacter* sp R2B1, genus of gram-negative bacteria, applying dark fermentation and used crude glycerol as substrate. Initially, we wanted to test the hydrogen production by purging nitrogen versus no purging nitrogen showing more production under microaerobic conditions. Taking into account the above, 4 tests were performed varying time, pH, glycerol concentration and NH<sub>4</sub>Cl concentration, where hydrogen production and bacterial growth were measured. From the analysis of these results we looked for possible factors that would benefit the production of hydrogen and it was obtained that the time and the most favorable concentrations for the greater production of hydrogen were at 96h with concentrations of 10 g / L of glycerol and 1g / L NH<sub>4</sub> Cl. Likewise, adjusting the pH to 7.0 favors dark fermentation. On the other hand, the growth was experimented in biofilm mode using as a carrier medium scouring pad, synthetic fiber and carbon fiber, the synthetic fiber (non-woven polyamide fibers) and carbon fiber, where it was shown that using a carrier medium does not favor hydrogen fermentation.

---

\* Bachelor Thesis

\*\* Faculty of Physical-Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Viviana Sánchez Torres, Chemical Engineer, Ph.

## INTRODUCCIÓN

Colombia es el tercer productor de biodiesel en América Latina después de Brasil y Argentina [1]. El biodiesel es un combustible de origen vegetal que puede reemplazar combustibles tradicionales de origen fósil como el diésel o ACPM [2]. Por cada tonelada métrica de biodiesel producido, se producen 100 kg de glicerol crudo como subproducto [3]. La producción de glicerol crudo es superior a la capacidad de la industria química para aprovecharlo [4]. El glicerol crudo además del glicerol contiene impurezas, por lo tanto, es deseable encontrar aplicaciones donde el glicerol crudo pueda usarse directamente sin purificación [5].

Las actuales preocupaciones con respecto a la disponibilidad a largo plazo de los combustibles fósiles y al calentamiento global debido a las emisiones de gases de efecto invernadero, han dado lugar a la búsqueda de un combustible alternativo [6]. Con un alto contenido energético, el hidrógeno es un combustible prometedor para un transporte limpio en el futuro [7]. A diferencia de los combustibles fósiles, el hidrógeno quema limpiamente, sin emitir ningún contaminante ambiental. Además, el hidrógeno posee el mayor contenido de energía por unidad de peso (es decir, 142 kJ/g) que es aproximadamente 2,75 veces mayor que la de los hidrocarburos combustibles [8]. La producción biológica de hidrógeno a través de la fermentación oscura es menos costosa y económicamente amigable [7]. Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo fue seleccionar las condiciones de cultivo utilizando glicerol crudo como sustrato para la producción biológica de hidrógeno, empleando *Enterobacter* sp. y con esto darle un mejor uso al subproducto de la industria del biodiesel.

## **1. MARCO TEORICO**

### **1.1 GLICEROL CRUDO EN COLOMBIA**

Según la Federación Nacional de Biocombustibles de Colombia, hay capacidad instalada para producir 60.700 t de glicerina cruda al año [9]. Los precios del glicerol crudo han caído por el suelo, cayendo cerca de cero e incluso negativos, ya que los productores se ven obligados a pagar para que se los retiren de sus plantas y se los incinere [3]. En la Unión Europea, el glicerol crudo se clasifica como residuo peligroso y su refinado ya no es un proceso rentable [10]. Esto se debe a los contaminantes que se encuentran en el glicerol crudo (con pureza que oscila entre el 55 y 90% del peso), como cenizas, metanol, agua y ácidos grasos [11]. El exceso de metanol presente en el glicerol crudo puede contaminar el agua subterránea. Una alternativa es la explotación del glicerol crudo como materia prima costo-efectiva en la fermentación oscura para la producción de hidrógeno, lo que disminuye el costo de la eliminación de los desechos [12].

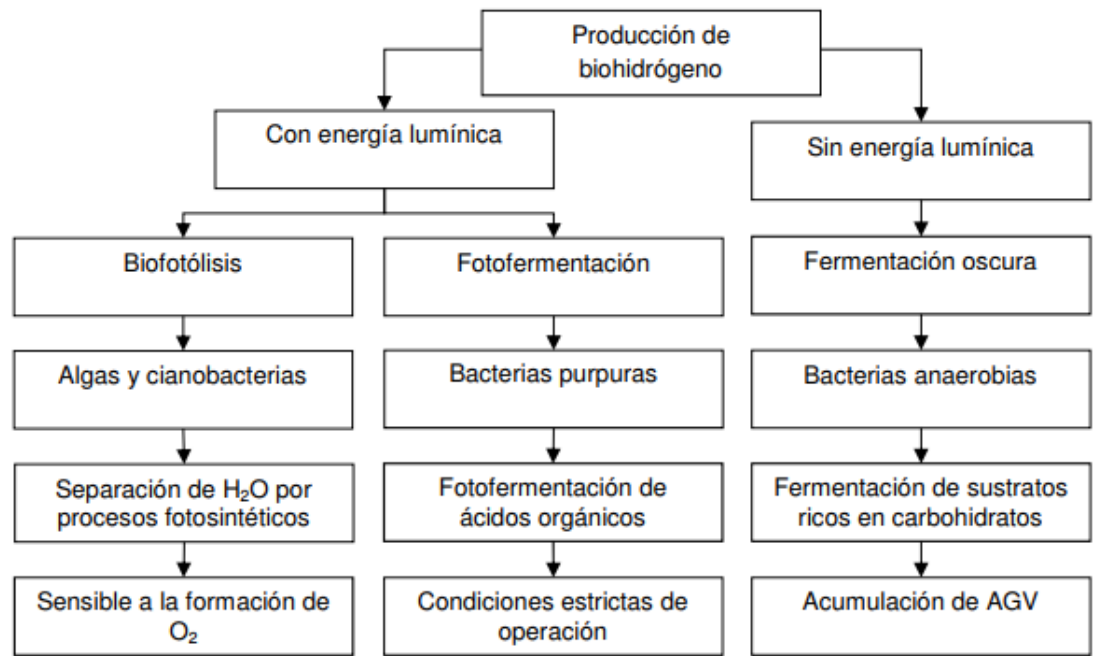
### **1.2 HIDRÓGENO COMO COMBUSTIBLE**

El hidrógeno constituye hoy en día una fuente de energía muy atractiva debido a su alto contenido energético, combustión amigable sin emisiones de CO<sub>2</sub> y fácil utilización para la generación de electricidad a través de pilas de combustible [13].

Los estudios en la producción de hidrógeno biológico se han enfocado principalmente en: biofotólisis de agua empleando algas y cianobacterias, fotofermentación de compuestos orgánicos por bacterias púrpuras fotosintéticas y fermentación oscura de compuestos orgánicos ricos en carbohidratos en condiciones anaerobias (Figura 1). Entre estos mecanismos, la fermentación oscura

podría ser la más favorable dado que se puede generar hidrógeno de forma continua y las tasas de producción son altas en comparación con otros procesos biológicos. [14]

Figura 1. Comparación de las 3 principales rutas de producción biológica de hidrógeno.



Fuente: Blanco Londoño, S. A. (2013). Producción de biohidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos - Revisión crítica. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.

### **1.3 FERMENTACIÓN OSCURA**

La fermentación oscura es un proceso donde intervienen principalmente bacterias anaerobias o anaerobias facultativas que usan sustratos ricos en carbohidratos [15] y obtienen la energía por medio de la fermentación (en ausencia de oxígeno) para producir hidrógeno. La fermentación es un proceso catabólico anaerobio de oxidación-reducción equilibrado en ausencia de un aceptor de electrones externo, cuya función es la síntesis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato [6].

Existe muchas bacterias anaerobias capaces de producir hidrógeno por fermentación oscura (*Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, y *Clostridium sp.*) y cada una tiene sus propias características. De todas estas, la *Enterobacter sp* ha llamado mucho la atención debido a su facilidad de cultivo, alta tasa de crecimiento y variedad de sustratos para utilizar. Las especies del género *Enterobacter* estudiadas para la producción de hidrógeno incluyen *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, etc [16].

Las especies de *Enterobacter* son anaerobias facultativas. La mayoría de estas bacterias utilizan la fermentación oscura para la producción de hidrógeno a través de la degradación de glucosa a piruvato. Los metabolitos finales producidos por el piruvato, a su vez, determinan el rendimiento de hidrógeno [13].

### **1.4 ENTEROBACTER**

Las especies del género *Enterobacter* son Gram-negativas, mesófilas, facultativas y pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* [17]. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 a 40 °C [18].

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo y 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro [19]. Sus miembros se encuentran ampliamente difundidos en el suelo, aguas, plantas (frutas, vegetales, cereales, árboles) y en animales desde insectos al hombre [20].

### **1.5 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR BACTERIAS DEL GÉNERO *ENTEROBACTER SP***

Investigaciones previas han reportado la utilización de desechos como sustratos aptos para la producción de hidrógeno utilizando cepas del género *Enterobacter* como: *Enterobacter asburiae* [21], *Enterobacter cloacae* [22], *Enterobacter aerogenes* [23]. Se reportó producción de hidrógeno por *Enterobacter aerogenes* usando como sustrato glicerol crudo ocurriendo la producción bacteriana solo en condiciones anaerobias con un rendimiento de 0,89 moles de hidrógeno por mol de glicerol [24]. Así mismo se investigó acerca de la producción de hidrógeno a partir de *Enterobacter sp* By-29 en condiciones anaerobias utilizando glucosa como fuente de carbono con un rendimiento de 1,10 mol de hidrógeno por mol de glucosa consumida [25]. Otra investigación estudia la producción de hidrógeno de la *Enterobacter aerogenes* en condiciones aeróbicas y anaeróbicas usando como sustrato glucosa como fuente de carbono, aumentando la evolución de hidrógeno en el cultivo anaeróbico y disminuye en el cultivo aeróbico [18].

Para el metabolismo de la *Enterobacter aerogenes* en la producción de hidrógeno se han reportado dos rutas metabólicas: la ruta del formiato, que depende de la descomposición del formiato-hidrógeno-liasa (FHL) y la ruta dependiente de NADH que involucra la reoxidación de NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) [26].

## 2. METODOLOGÍA

La Figura 2. muestra la metodología utilizada, que consiste en 7 etapas experimentales.

Figura 2. Metodología experimental para determinar las condiciones de cultivo para la producción de hidrógeno con *Enterobacter* sp.



## 2.1 CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO

La cepa empleada fue *Enterobacter* sp R2B1, la cual pertenece al cepario del Grupo de Investigación de Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN). Esta cepa fue aislada de una celda de combustible microbiana y reportada con la capacidad de metabolizar glicerol [27], sin embargo, previamente no se había evaluado su capacidad para producir hidrógeno. La cepa se sembró en cajas Petri con LB (Anexo A, Tabla A.1) agar incubadas por 24 horas a 30 °C. Los precultivos se prepararon con colonias independientes inoculadas en tres erlenmeyers con 25 ml de medio LB líquido en cada uno, agitándose a 150 RPM durante 18 horas a 30 °C.

Para los ensayos se emplearon viales de vidrio con una capacidad de 30 ml, agregándole a cada uno 10 ml de medio mínimo de sales (MSM) con una concentración 10 g/L de glicerol crudo como fuente de carbono (Anexo A, Tabla A.2), obtenido de la empresa Oleoflores S.A., sellados herméticamente con tapones de goma butílica y grafados con tapa redonda de aluminio. Seguidamente se autoclavarón a 121 °C por 20 minutos con el propósito de esterilizarlos y se esperó hasta que los viales estuvieran a temperatura ambiente para inocularlos. Cada vial se inóculo agregando 0,2 ml de precultivo. Para cada una de las siguientes etapas se modificaron algunas de las siguientes variables: concentración de oxígeno, tiempo de incubación, concentración de glicerol, pH, concentración de NH<sub>4</sub>Cl y medio de soporte para el crecimiento.

## 2.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS

El crecimiento microbiano se midió como proporcional a la densidad óptica evaluada a 600 nm (DO) con espectrofotómetro UV-1800 UV-VIS (Shimadzu, Japón). El pH se midió con pHmetro digital Orion 3 Star (Thermo scientific, USA). Para medir la producción de hidrógeno se usó un detector de gases Tetra (Crowcon, UK), cuyo rango de detección es de 0 a 1.000 ppm molar. Teniendo en cuenta que la producción de hidrógeno usualmente se reporta en la literatura como mmol/L, se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mmol } H_2}{L} = \frac{\frac{PV}{RT} * ppm_r}{1000 * V_{liquido}}$$

Donde:

- P: Presión del gas en el vial (Pa)
- V: Volumen del gas en el vial ( $m^3$ )
- R: Constante universal de los gases 8,314472 (Pa. $m^3$ .mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>)
- T: Temperatura del gas en el vial (K)
- $ppm_r$ : Partes por millón reportado por el detector (mmol/mol)
- $V_{liquido}$ : Volumen de cultivo líquido (L)

El glicerol fue cuantificado mediante HPLC en un equipo UltiMate 3000 UHPLC System 1,5 ml de sobrenadante fueron filtrados mediante una membrana PVDF de 0.45  $\mu$ m y llevados a análisis empleando una columna SupelcoGel C610H de intercambio de iones. Se empleó como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a un flujo de 0.6 ml/min y una temperatura en la columna de 60 °C. La detección de glicerol se realizó mediante un detector de índice de refracción con temperatura en la celda de 35°C.

### **2.3 INFLUENCIA DEL OXÍGENO**

Tres viales fueron purgados con nitrógeno durante 5 minutos antes de ser inoculados para remover el oxígeno; por otra parte, se dejaron tres viales sellados sin purgar. Se dejó un vial sin inocular como control negativo en cada condición. Los viales se inocularon e incubaron según las condiciones descritas en la sección 2.1 durante 96 horas, transcurrido este tiempo se midió la producción de hidrógeno, la DO y la concentración de glicerol.

### **2.4 INFLUENCIA DEL TIEMPO**

Los viales se incubaron durante 11, 24, 26, 48, 72 y 96 horas a 150 RPM y a una temperatura de 30°C. Transcurrido este tiempo se midió la producción de hidrógeno, la DO y el pH para cada tiempo. Esta prueba experimental se realizó por triplicado.

### **2.5 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO**

Se utilizaron concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 40 g/L de glicerol crudo. Los viales se incubaron durante 48 y 96 horas a 150 RPM y a una temperatura de 30°C. Transcurrido este tiempo se midió la producción de hidrógeno y la DO. Esta prueba experimental se realizó por triplicado.

## **2.6 INFLUENCIA DEL pH**

El medio de cultivo en los viales se ajustó a pH de: 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0 usando soluciones de NaOH 1M para aumentarlo y HCl 1M para disminuirlo. Los viales se incubaron durante 4 días a 150 RPM y a una temperatura de 30°C. Transcurrido este tiempo se midió la producción de hidrógeno y la DO. Esta prueba experimental se realizó por triplicado.

## **2.7 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE NH<sub>4</sub>Cl COMO FUENTE DE NITRÓGENO**

El medio de cultivo en los viales se preparó con concentraciones de: 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 g/L de NH<sub>4</sub>Cl. Los viales se incubaron durante 96 horas a 150 RPM y a una temperatura de 30°C. Transcurrido este tiempo se midió la producción de hidrógeno y la DO. Esta prueba experimental se realizó por triplicado.

## **2.8 EFECTO DEL MEDIO DE SOPORTE EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

Se utilizaron diferentes medios de soporte dentro de cada vial para favorecer la formación de biopelículas: tela de carbono, estropajo y fibra sintética (fibras tipo poliamidas no tejidas), con 1 cm<sup>2</sup> de área y 8 mm de espesor (Figura 3). Para esta etapa, se ajustaron las mejores condiciones de cada una de las variables medidas anteriormente como tiempo, pH, concentración de glicerol y concentración de NH<sub>4</sub>Cl.

Se dejó un vial sin inocular como control negativo para cada medio de soporte y se evaluaron también viales sin medio de soporte (cultivo en suspensión). Después

del tiempo establecido, se midió la producción de hidrógeno, la DO y el consumo de glicerol para la condición que permitiera obtener la mayor cantidad de hidrógeno.

Figura 3. Viales con los diferentes medios de soporte.



(a)

(b)

(c)

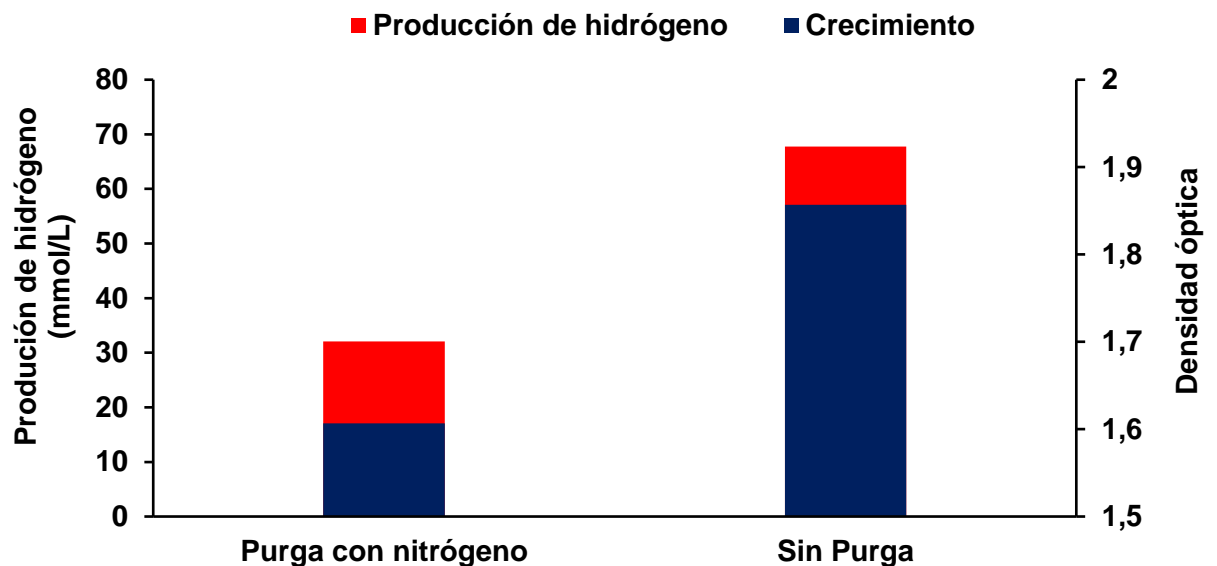
(a) tela de carbono, (b) estropajo, (c) fibras tipo poliamidas no tejidas.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 INFLUENCIA DEL OXÍGENO

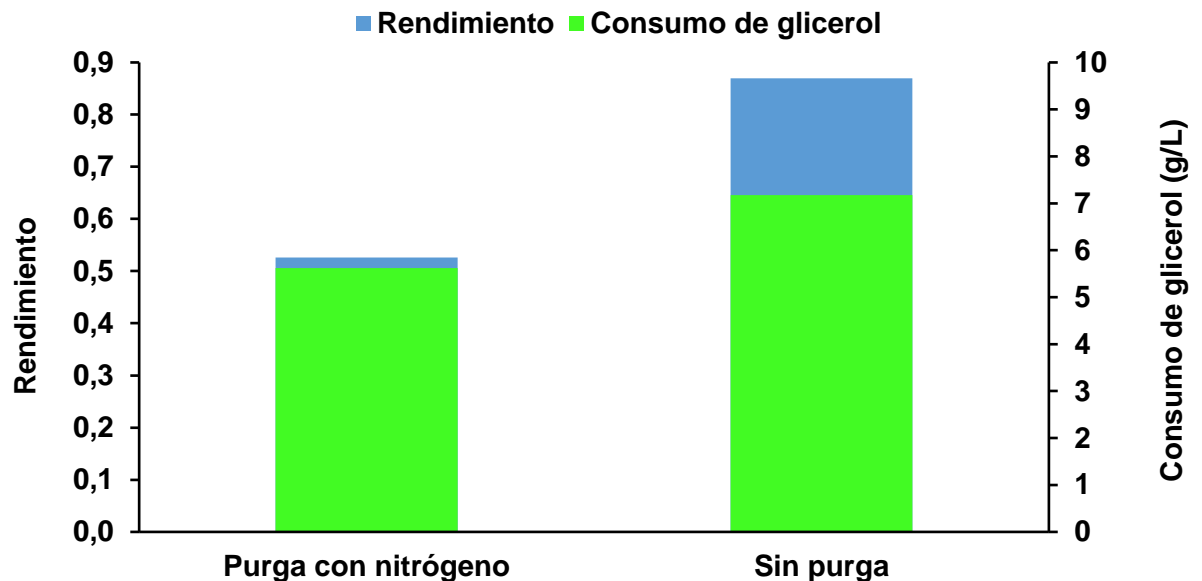
En la Figura 4 se observa una mayor producción de hidrógeno en los viales que no fueron purgados con nitrógeno, presentando también un mayor crecimiento. Por lo tanto, la presencia de oxígeno en el espacio de cabeza permitió un mayor crecimiento de la cepa aumentando así la producción de hidrógeno. Este resultado contradice lo que sucede en la mayoría de casos de fermentación oscura donde son necesarias condiciones estrictamente anaerobias para la producción de hidrógeno [24].

Figura 4. Prueba de producción de hidrógeno y crecimiento purgando con nitrógeno vs sin purgar.



En la Figura 5 se compara el consumo de glicerol y el rendimiento molar de hidrógeno respecto al glicerol consumido en condiciones microaerobias y anaerobias, en donde se evidencia que hay mayor rendimiento con pequeñas cantidades de oxígeno (sin purgar) debido a que hay mayor producción de hidrógeno a pesar de que el consumo de glicerol sin purgar es mayor al consumo de glicerol con purga con nitrógeno.

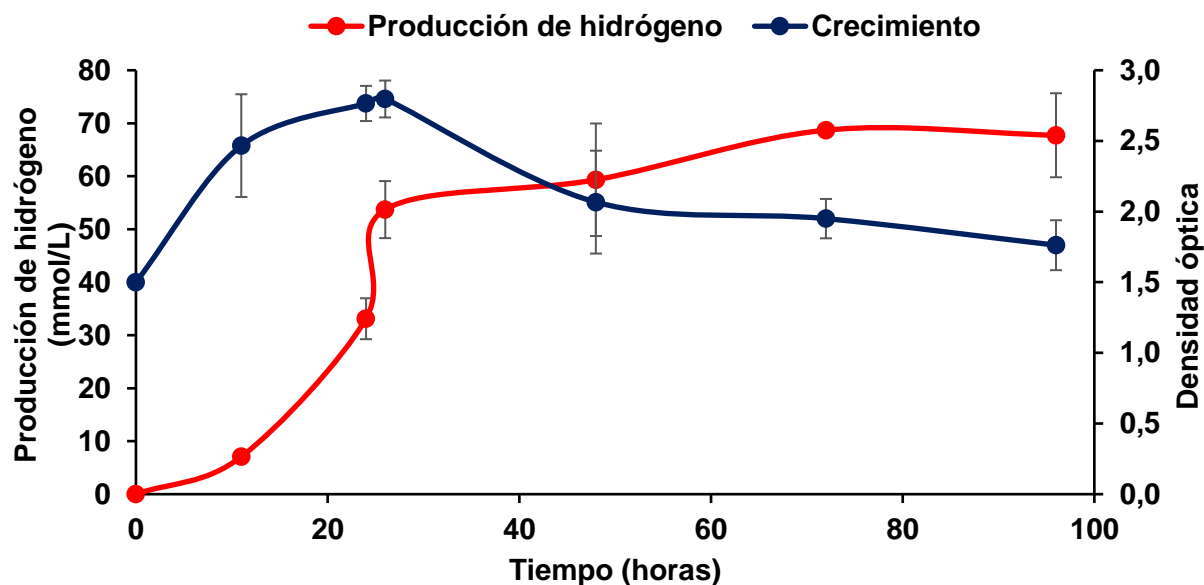
Figura 5. Consumo de glicerol y rendimientos purgando con nitrógeno vs sin purgar.



### 3.2 INFLUENCIA DEL TIEMPO

En la Figura 6 se reporta que la máxima producción de hidrógeno se da en un lapso de tiempo entre las 72 y 96 horas aproximadamente. También se refleja que el hidrógeno es un producto mixto pues se observa producción tanto asociada al crecimiento como cuando el crecimiento está estacionario.

Figura 6. Prueba de producción de hidrógeno y crecimiento a diferentes tiempos.

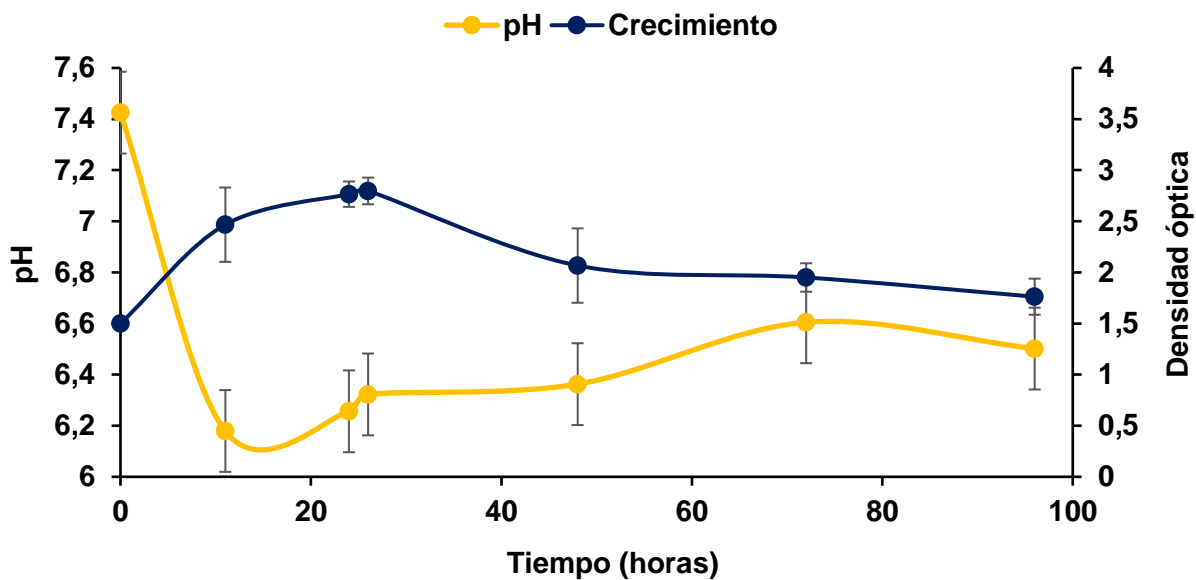


También se puede observar en la gráfica anterior que el valor de la densidad óptica inicial es de 1,5 y al compararla con tiempos posteriores, se evidencia que hubo crecimiento. Además, se puede notar que en las primeras 25 horas aproximadamente hay mayor crecimiento. Después de este tiempo el crecimiento disminuye paulatinamente.

**3.2.1 Curva de pH en medio mínimo de sales** En la Figura 7 se observa que el pH inicial del medio es casi neutro con un valor de 7,4 y a medida que transcurre el tiempo se acidifica el cultivo reduciéndose el pH a 6,3 durante las primeras 24 horas.

También se puede notar que la caída rápida de pH está asociada al crecimiento porque el descenso brusco de pH ocurre en el mismo lapso de tiempo donde el crecimiento incrementa rápidamente

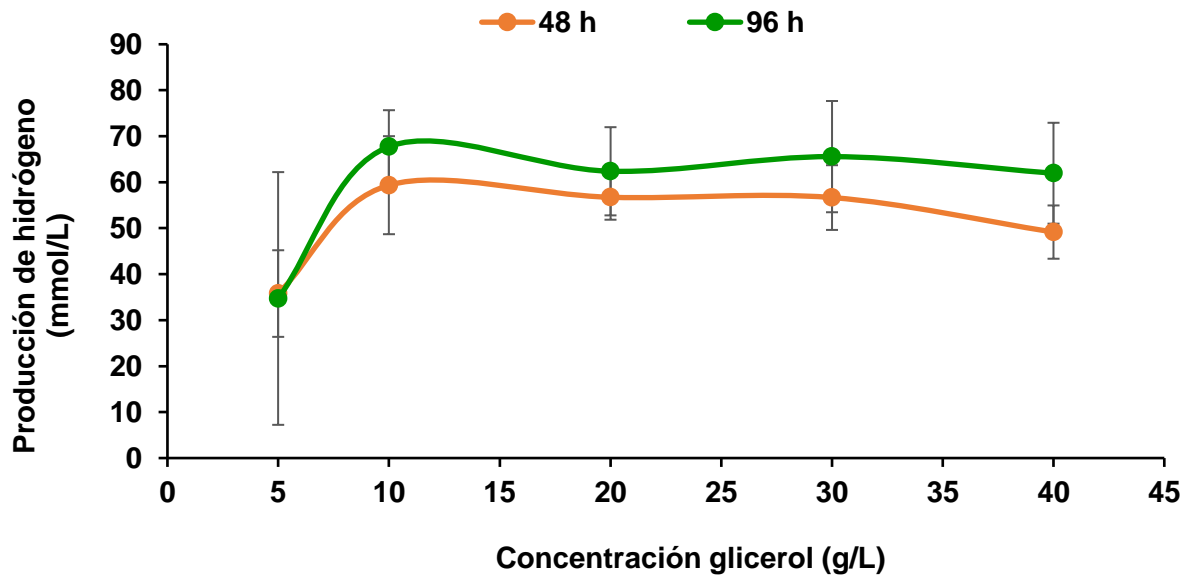
Figura 7. Curvas de pH y crecimiento a diferentes tiempos.



### 3.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO

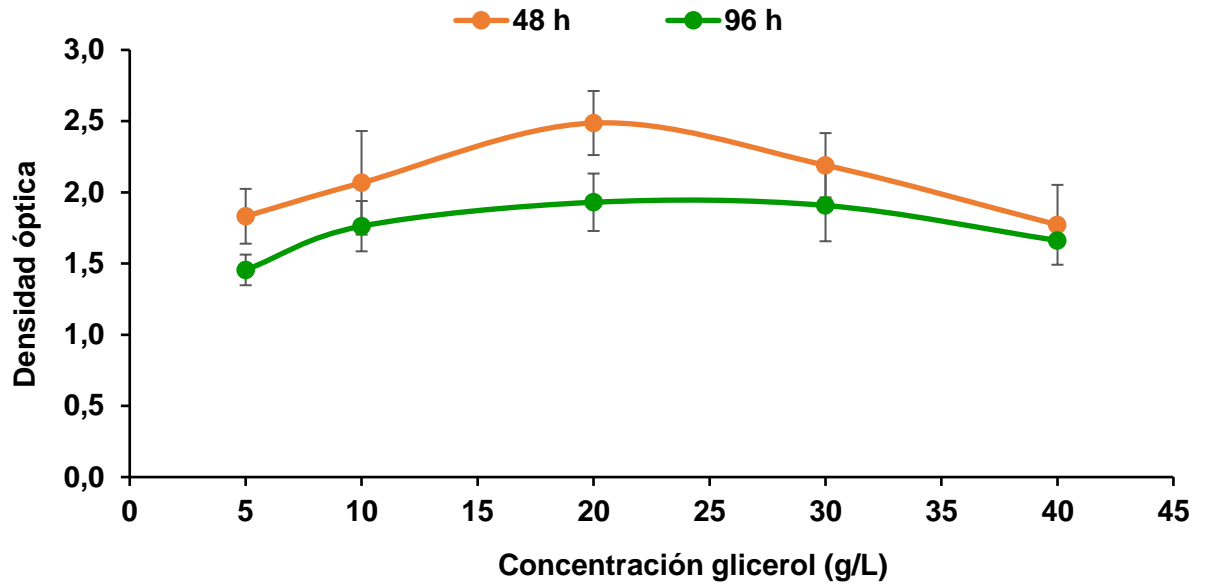
**3.3.1 Producción de hidrógeno a diferentes concentraciones de glicerol** En la Figura 8 se muestran las curvas de producción de hidrógeno para las 48 y 96 horas a diferentes concentraciones de glicerol donde se observa que la producción de hidrógeno es similar para todas las concentraciones por encima de 10 g/L. Por lo tanto, se decidió trabajar con una concentración de 10 g/L dado que es la concentración de glicerol crudo para la cual se produce la mayor cantidad de hidrógeno respecto a la cantidad de sustrato alimentado.

Figura 8. Prueba de producción de hidrógeno a diferentes concentraciones de glicerol.



**3.3.2 Crecimiento a diferentes concentraciones de glicerol** En la Figura 9 se muestran las curvas de crecimiento de *Enterobacter* sp R2B1 a las 48 y 96 horas a diferentes concentraciones de glicerol, evidenciando que en las dos curvas el mayor crecimiento se da una concentración de 20 g/L de glicerol crudo y para concentraciones mayores a ésta el crecimiento es menor.

Figura 9. Prueba de crecimiento a diferentes concentraciones de glicerol.

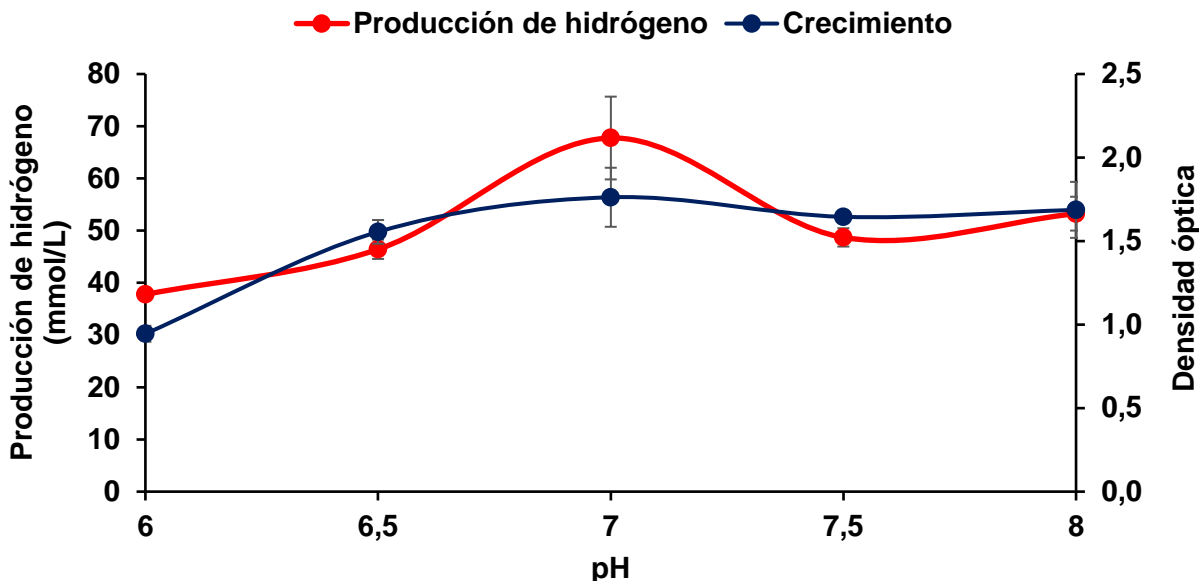


### 3.4 INFLUENCIA DEL pH

En la Figura 10 se puede observar que la mayor producción de hidrógeno (68 mmol/L) se da para un pH de 7, ya que según la gráfica para pH bajos la producción es menor probablemente debido a una reducción de la actividad de la enzima hidrogenasa (cataliza la producción de hidrógeno) como ha sido reportado para otras especies del mismo género [28].

En esta figura también se verifica que el crecimiento de la *Enterobacter* es mayor para pH igual o cercano a 7.0.

Figura 10. Prueba de producción de hidrógeno y crecimiento a distintos pH.

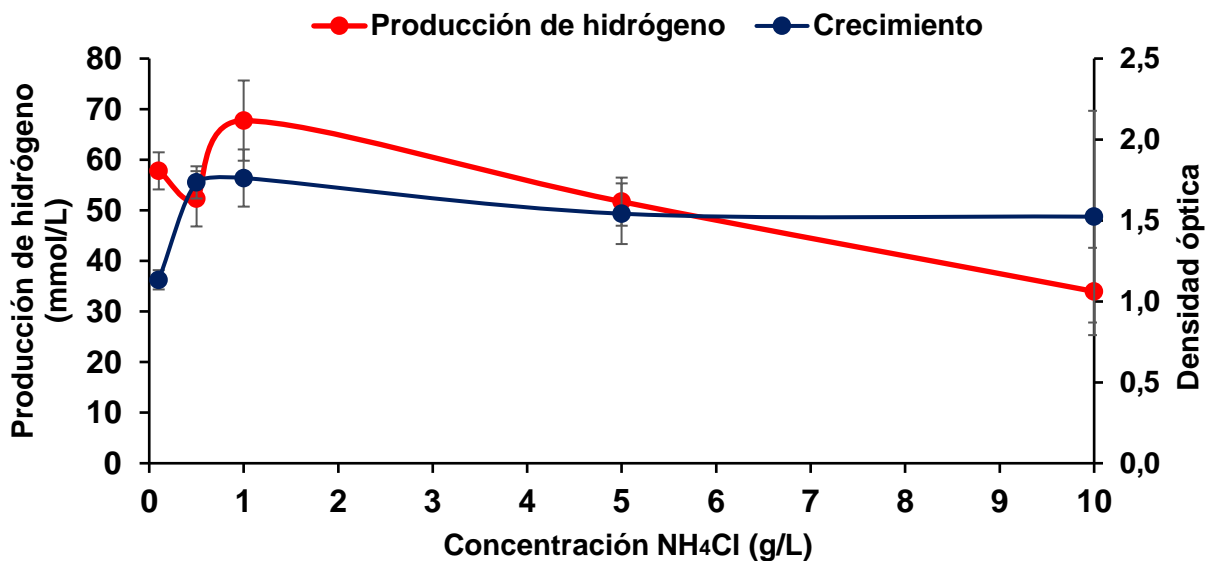


### 3.5 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE $\text{NH}_4\text{Cl}$ COMO FUENTE DE NITRÓGENO

En la Figura 11 se evidencia una mayor producción de hidrógeno de 68 mmol/L a una concentración de 1 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . También se observa que a altas concentraciones de la fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) hay poca producción de hidrógeno.

En esta figura también se observa la curva de crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de la fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) a las 96 horas, evidenciando que el mayor crecimiento se da a una concentración de 1 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y para concentraciones mayores a ésta el crecimiento es menor.

Figura 11. Prueba de producción de hidrógeno y crecimiento a diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

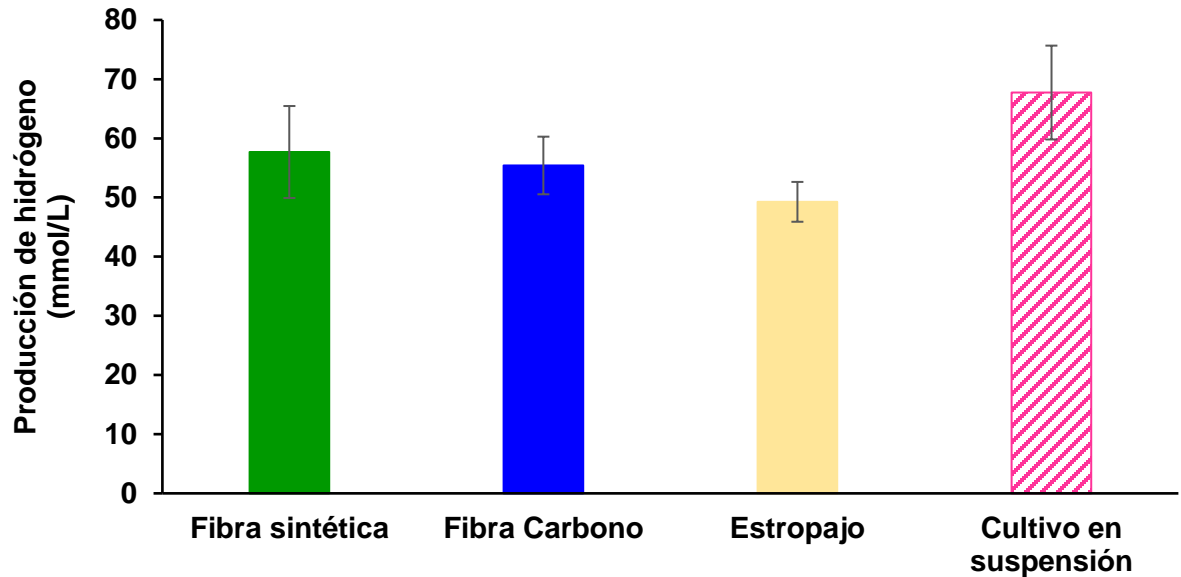


### 3.6 EFECTO DEL MEDIO DE SOPORTE EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

#### 3.6.1. Producción de hidrógeno en modo biopelícula vs cultivo en suspensión

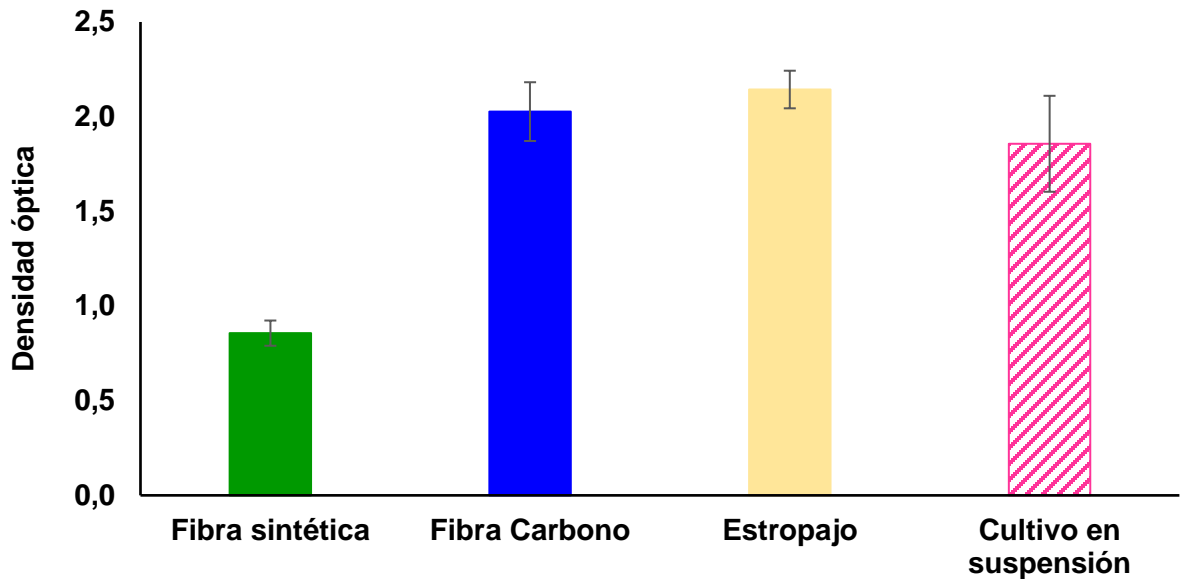
Según la Figura 12 se puede determinar que el mejor medio de soporte es la fibra sintética (fibras tipo poliamidas no tejidas) porque hay mayor producción de hidrógeno en comparación con los demás soportes utilizados. Sin embargo, al compararla con la del medio en suspensión hay menor producción de hidrógeno demostrando que la biopelícula no favorece la producción.

Figura 12. Prueba de producción de hidrógeno en modo biopelícula vs cultivo en suspensión.



**3.6.2 Crecimiento en modo biopelícula vs cultivo en suspensión** En la Figura 13 se puede observar que no existe mucha diferencia en la cantidad de células presentes en el medio de cultivo de la *Enterobacter* para la fibra de carbono, el estropajo y el cultivo en suspensión. Por el contrario, la fibra sintética tiene un menor número de células suspendidas en el medio. Dado que la producción de hidrógeno no fue afectada por la fibra sintética se destaca un efecto inhibitorio causado por este material. Por lo tanto, los resultados sugieren que en la fibra sintética se formó más biopelícula, dado que las células adheridas al medio de soporte no son detectadas al analizar la densidad óptica de una muestra del medio líquido.

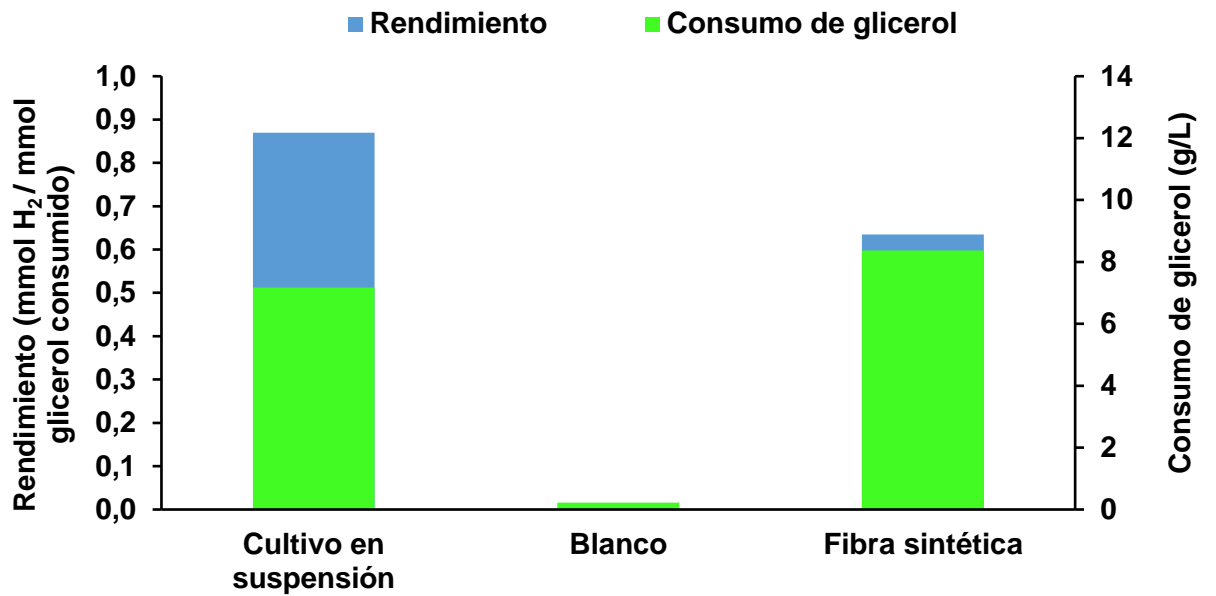
Figura 13. Prueba de crecimiento en modo biopelícula vs cultivo en suspensión.



### 3.7 ANÁLISIS DEL CONSUMO DE GLICEROL Y CÁLCULO DE RENDIMIENTOS

**3.7.1 Consumo de glicerol y rendimientos** En la Figura 14 se compara el consumo de glicerol con el rendimiento que indica la relación molar de hidrógeno producido con respecto al glicerol consumido para el cultivo en suspensión, blanco y fibra sintética, en donde se evidencia que hay mayor rendimiento en el cultivo en suspensión debido a que hay mayor producción de hidrógeno. También se puede ver que la fibra sintética representa el mayor consumo de glicerol posiblemente debido al consumo de las células que crecieron en modo biopelícula o absorción de glicerol en las fibras. Dado que la concentración inicial de glicerol fue 10 g/L el porcentaje de consumo de glicerol de los cultivos en suspensión fue de 72% y de los cultivos soportados en fibra sintética fue de 84%

Figura 14. Consumo de glicerol y rendimiento de producto respecto al sustrato en cada condición.



## CONCLUSIONES

- En condiciones microaerobias (presencia de una pequeña cantidad de oxígeno) hay mayor crecimiento y este crecimiento favorece la producción de hidrógeno.
- El rendimiento en presencia de pequeñas cantidades de oxígeno (sin purgar) es mayor debido a que hay mayor producción de hidrógeno.
- Las mejores condiciones para la producción de hidrógeno con *Enterobacter* sp. R2B1 son: tiempo de 96 horas, concentración de 10g/L de glicerol crudo como fuente de carbono, concentración de 1g/L de NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno y pH de 7,0.
- El medio de soporte no favorece la producción de hidrógeno porque no existe una diferencia significativa entre esta producción y la producción del cultivo en suspensión.
- En la fibra sintética se formó más biopelícula debido a que las células adheridas al medio de soporte no son detectadas al analizar la densidad óptica de la muestra del medio líquido.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

[1] NÚCLEOS PALMEROS. Los biocombustibles en Colombia. Colombia: Federación Nacional de Biocombustibles en Colombia, 2011. No. 469. p. 13.

[2] UNIDAD DE PLANEACIÓN MINERO ENERGÉTICA. Biocombustibles en Colombia. Bogotá D.C.: Ministerio de Minas y Energía, 2009. p. 8.

[3] LINES, Sam. An Exploding Market? Utilizing Waste Glycerol from the Biodiesel Production Process. [En línea]. Biofuels and Bio-Based Carbon Mitigation. 2009. (Recuperado el 25 Julio de 2017.) Disponible en: <https://snrecmitigation.wordpress.com/2009/04/19/an-exploding-market-utilizing-waste-glycerol-from-the-biodiesel-production-process/>

[4] SUÁREZ PALACIOS, Oscar Yesid. Producción y modelamiento de gliceril-ésteres como plastificantes para PVC. Tesis de doctorado en ingeniería. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería, 2011, 35p.

[5] ECHEVERRY, David; CARDEÑO, Fernando; RIOS, Luis. Glycerolysis of Soybean Oil with Crude Glycerol Containing Residual Alkaline Catalysts from Biodiesel Production. Springer, 2010, vol. 88, p. 551-557.

[6] REDONDAS MONTESERÍN, Vanessa. Obtención de hidrógeno mediante la fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero. Tesis de doctorado en ingeniería. España: Universidad de León. Área de Ingeniería Química, 2013, 15p.

[7] PACHAPUR, Vinayak, *et al.* Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and Apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. Elsevier, 2015, vol. 193, p. 297-306.

[8] MARU, B, *et al.* Dark fermentative hydrogen and ethanol production from biodiesel waste glycerol using a co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter* sp. Elsevier, 2016, vol. 186, p. 375-384.

[9] ORDOÑEZ GÓMEZ, Ciro. Evaluación nutricional de la glicerina cruda proveniente del biodiesel de aceite de palma en cerdos. Tesis de maestría en producción animal. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 2014, 5p.

[10] POTT, Robert; HOWE, Christopher; DENNIS, John. The purification of crude glycerol derived from biodiesel manufacture and its use as a substrate by *Rhodospseudomonas palustris* to produce hydrogen. Elsevier, 2014, vol. 152, p. 464-470.

[11] MONTOYA CASTAÑO, Dolly; ARAGÓN CAYCEDO, Oscar. Bioprocesos aplicados a la valoración del glicerol residual en la producción de biodiesel. Palmas, 2010, vol. 31, p. 126-135.

[12] SARMA, Saurabh, *et al.* Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glicerol: A review. Elsevier, 2012, vol. 37, p. 6473-6490.

[13] MISHRA, Preeti; DAS, Debabrata. Biohydrogen production from *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using distillery effluent. Elsevier, 2013, vol. 39, p. 7496-7507.

[14] BLANCO LONDOÑO, Sergio. Producción de biohidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos – Revisión crítica. Tesis de maestría en ingeniería. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería, 2013, 12-13p.

[15] BEDOYA, Andrea, *et al.* Producción biológica de hidrógeno: Una aproximación al estado del arte. Dyna, 2008, vol. 75, p. 137-157.

[16] ZHANG, Chong; XIANG, Feng; XING, Xin-Hui. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. Elsevier, 2011, vol. 102, p. 8344-8349.

[17] BLAKE, Stephanie. *Enterobacter*. Salem Press Encyclopedia of Health, 2016.

[18] TANISHO, Shigeharu. Hydrogen production by facultative anaerobe *Enterobacter aerogenes*. Springer, 1998, p. 273-279.

- [19] PUERTA GARCÍA, A; MATEOS RODRÍGUEZ, F. Enterobacterias. *Medicine*, 2010, vol. 10, p. 3426-3431.
- [20] DALET, Fernando; DEL RIO, Gerardo. Infecciones urinarias. España: Médica Panamericana, 1998. p. 35. ISBN: 84-7903-409-2.
- [21] SHIN, Jong, *et al.* Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. *Elsevier*, 2007, vol. 32, p. 192-199.
- [22] MANDAL, Biswajit; NATH, Kaushik; DAS, Debabrata. Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H<sub>2</sub> by *Enterobacter cloacae*. *Springer*, 2006, vol. 28, p. 831-835.
- [23] TANISHO, Shigeharu; KOSAKO, Yoshimasa; WAKAO, Noriaki. Hydrogen production by *Enterobacter cloacae*. *SCEJ*, 2006, vol. 16, p. 529-530.
- [24] MARKOV, Sergei; AVERITT, Jared; WALDRON, Barbara. Bioreactor for glycerol conversion into H<sub>2</sub> by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Elsevier*, 2011, vol. 36, p. 262-266.
- [25] YOKIO, Haruhiko, *et al.* Simultaneous production of hydrogen and bioflocculant by *Enterobacter* sp. BY-29. *World Journal for Mycrobiology and Biotechnology* , 2001, vol. 17, p. 609-613.

[26] PI, Jian, *et al.* Mutational analysis of the hyc-operon determining the relationship between hydrogenase-3 and NADH pathway in *Enterobacter aerogenes*. *Enzyme and Microbial Technology*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.08.011>

[27] FENG, Cuijie, *et al.* Characterization of Exoelectrogenic Bacteria *Enterobacter* Strains Isolated from a Microbial Fuel Cell Exposed to Copper Shock Load. *Plos*, 2014.

[28] PATHAK, Vinayak, *et al.* Deployment of Fermentative Biohydrogen Production for Sustainable Economy in Indian Scenario: Practical and Policy Barriers with Recent Progresses. Springer, 2016, vol. 3, p. 101-107.

## BIBLIOGRAFIA

BEDOYA, Andrea, *et al.* Producción biológica de hidrógeno: Una aproximación al estado del arte. *Dyna*, 2008, vol. 75, p. 137-157.

BLAKE, Stephanie. *Enterobacter*. Salem Press Encyclopedia of Health, 2016.

BLANCO LONDOÑO, Sergio. Producción de biohidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos – Revisión crítica. Tesis de maestría en ingeniería. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería, 2013, 12-13p.

DALET, Fernando; DEL RIO, Gerardo. Infecciones urinarias. España: Médica Panamericana, 1998. p. 35. ISBN: 84-7903-409-2.

ECHEVERRY, David; CARDEÑO, Fernando; RIOS, Luis. Glycerolysis of Soybean Oil with Crude Glycerol Containing Residual Alkaline Catalysts from Biodiesel Production. *Springer*, 2010, vol. 88, p. 551-557.

FENG, Cuijie, *et al.* Characterization of Exoelectrogenic Bacteria *Enterobacter* Strains Isolated from a Microbial Fuel Cell Exposed to Copper Shock Load. *Plos*, 2014.

LINES, Sam. An Exploding Market? Utilizing Waste Glycerol from the Biodiesel Production Process. [En línea]. Biofuels and Bio-Based Carbon Mitigation. 2009. (Recuperado el 25 Julio de 2017.) Disponible en: <https://snrecmitigation.wordpress.com/2009/04/19/an-exploding-market-utilizing-waste-glycerol-from-the-biodiesel-production-process/>

MANDAL, Biswajit; NATH, Kaushik; DAS, Debabrata. Improvement of Biohydrogen Production Under Decreased Partial Pressure of H<sub>2</sub> by *Enterobacter cloacae*. Springer, 2006, vol. 28, p. 831-835.

MARKOV, Sergei; AVERITT, Jared; WALDRON, Barbara. Bioreactor for glycerol conversion into H<sub>2</sub> by bacterium *Enterobacter aerogenes*. Elsevier, 2011, vol. 36, p. 262-266.

MARU, B, *et al.* Dark fermentative hydrogen and ethanol production from biodiesel waste glycerol using a co-culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter sp.* Elsevier, 2016, vol. 186, p. 375-384.

MISHRA, Preeti; DAS, Debabrata. Biohydrogen production from *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using distillery effluent. Elsevier, 2013, vol. 39, p. 7496-7507.

MONTOYA CASTAÑO, Dolly; ARAGÓN CAYCEDO, Oscar. Bioprocesos aplicados a la valoración del glicerol residual en la producción de biodiesel. Palmas, 2010, vol. 31, p. 126-135.

NÚCLEOS PALMEROS. Los biocombustibles en Colombia. Colombia: Federación Nacional de Biocombustibles en Colombia, 2011. No. 469. p. 13.

ORDOÑEZ GÓMEZ, Ciro. Evaluación nutricional de la glicerina cruda proveniente del biodiesel de aceite de palma en cerdos. Tesis de maestría en producción animal. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 2014, 5p.

PACHAPUR, Vinayak, *et al.* Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and Apple pomace hydrolysate using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. Elsevier, 2015, vol. 193, p. 297-306.

PATHAK, Vinayak, *et al.* Deployment of Fermentative Biohydrogen Production for Sustainable Economy in Indian Scenario: Practical and Policy Barriers with Recent Progresses. Springer, 2016, vol. 3, p. 101-107.

PI, Jian, *et al.* Mutational analysis of the hyc-operon determining the relationship between hydrogenase-3 and NADH pathway in *Enterobacter aerogenes*. Enzyme and Microbial Technology. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.08.011>

POTT, Robert; HOWE, Christopher; DENNIS, John. The purification of crude glycerol derived from biodiesel manufacture and its use as a substrate by

Rhodopseudomonas palustris to produce hydrogen. Elsevier, 2014, vol. 152, p. 464-470.

PUERTA GARCÍA, A; MATEOS RODRÍGUEZ, F. Enterobacterias. Medicine, 2010, vol. 10, p. 3426-3431.

REDONDAS MONTESERÍN, Vanessa. Obtención de hidrógeno mediante la fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero. Tesis de doctorado en ingeniería. España: Universidad de León. Área de Ingeniería Química, 2013, 15p.

SARMA, Saurabh, *et al.* Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. Elsevier, 2012, vol. 37, p. 6473-6490.

SHIN, Jong, *et al.* Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Enterobacter asburiae* SNU-1. Elsevier, 2007, vol. 32, p. 192-199.

SUÁREZ PALACIOS, Oscar Yesid. Producción y modelamiento de gliceril-ésteres como plastificantes para PVC. Tesis de doctorado en ingeniería. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería, 2011, 35p.

TANISHO, Shigeharu. Hydrogen production by facultative anaerobe *Enterobacter aerogenes*. Springer, 1998, p. 273-279.

TANISHO, Shigeharu; KOSAKO, Yoshimasa; WAKAO, Noriaki. Hydrogen production by *Enterobacter cloacae*. SCEJ, 2006, vol. 16, p. 529-530.

UNIDAD DE PLANEACIÓN MINERO ENERGÉTICA. Biocombustibles en Colombia. Bogotá D.C.: Ministerio de Minas y Energía, 2009. p. 8.

YOKIO, Haruhiko, *et al.* Simultaneous production of hydrogen and bioflocculant by *Enterobacter* sp. BY-29. World Journal for Mycrobiology and Biotechnology , 2001, vol. 17, p. 609-613.

ZHANG, Chong; XIANG, Feng; XING, Xin-Hui. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. Elsevier, 2011, vol. 102, p. 8344-8349.

## ANEXOS

### Anexo A. Medios de cultivo

Tabla A.1 Medio LB sólido

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Agar	15

Tabla A.2 Medio mínimo de sales

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Glicerol	10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	8,95
NaCl	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
NH <sub>4</sub> Cl	1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,2
Trasas	1 ml

Anexo B. Curva de calibración

