

**ENRIQUECIMIENTO DE CONSORCIOS MICROBIANOS NATIVOS PARA EL
AISLAMIENTO DE ACTINOMYCETOS PRODUCTORES DE HIDRÓGENO**

ADOLFO ERLAI RODRIGUEZ

NINI JOHANNA OSPINA CHINCHILLA

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

2015

**ENRIQUECIMIENTO DE CONSORCIOS MICROBIANOS NATIVOS PARA EL
AISLAMIENTO DE ACTINOMYCETOS PRODUCTORES DE HIDRÓGENO**

**ADOLFO ERLAI RODRIGUEZ
NINI JOHANNA OSPINA CHINCHILLA**

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

**Directora
VIVIANA SÁNCHEZ TORRES
Ingeniera química, Ph.D**

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

2015

DEDICATORIA

Agradecerle primero a Dios persona, él es lo mejor del planeta, esto se lo debo a él que me ha dado la fuerza, la alegría, las ganas de seguir luchando en ésta que sin temor a equivocarme es una de las experiencias más inolvidables de mi vida.

A mis chicas superpoderosas mi abuela Ana Rosa Martínez Valbuena, mi mamá Yasmine Rodríguez y mi hermana María Fernanda Correa, ellas que día a día me daban y me siguen dando la motivación suficiente para no desfallecer, no solo con palabras si no con acciones llenas de mucho amor, hacia ellas lo que tengo que decir es GRATITUD ETERNA porque han puesto todo de ellas para sacar este hombre adelante.

Mis amiguitas del colegio Laura y Mile las quiero mucho, ustedes se han convertido como en mis hermanas mayores, y supieron apoyar en la distancia con mi proyecto de vida.

La familia no es una cuestión de sangre es algo más allá que eso, y si algo me dejó esta experiencia es que nuestros amigos hacen parte de nuestra familia, mis compañeros de la Parroquia el Señor de los Milagros que con sus oraciones me ayudaban a que Dios estuviera presente en este viaje, a una pareja de esposos Alex y Ruth los amigos que nunca dudaron de mí, y me dieron sus palabras de aliento, hoy más que nunca las tengo presentes, gracias por su cariño y les aseguro no los decepcionaré.

Adolfo Erlai Rodríguez

DEDICATORIA

Gracias a ti Padre celestial por amarme tanto, por estar presente en todo momento, por darme la fortaleza y sabiduría necesarias para saber afrontar cada situación, gracias por mi familia, mis amigos, profesores, mi universidad y mi carrera profesional, ¡Gracias por tanto Papá!

Agradezco especialmente a mi mamá por estar SIEMPRE para mí, a mi abuela por las enseñanzas, el ejemplo y por quererme tanto, a mis tíos por la ayuda incondicional, a mi papá por apoyarme en esta etapa tan importante y por supuesto a mi hermanita por creer en mí todo el tiempo y ser un ejemplo de tenacidad en mi vida. Gracias a mis compañeros y amigos por los momentos compartidos, por la paciencia, la tolerancia y el cariño que me brindaron. Agradezco a mi amigo y compañero de tesis por su comprensión, ayuda y cariño.

Muchas gracias a todas las personas que contribuyeron en el cumplimiento de esta meta. Doy mil gracias a Dios por ustedes y a ustedes por permitirme ser parte de sus vidas y por aportar tanto de ustedes en mi vida.

Nini Johanna Ospina Chinchilla

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander por la formación en Ingeniería Química y la oportunidad de conocer personas que aportaron a nuestro crecimiento personal y profesional.

Al grupo de investigación CINBIN habernos acogido y brindado las herramientas para el desarrollo de este proyecto.

A la doctora Viviana Sánchez Torres por haber confiado en nosotros y permitirnos hacer parte de este proyecto de investigación, brindándonos su conocimiento, tiempo y dirección.

A la bióloga Oriana Serna Danuta por su orientación y apoyo en todas las etapas del proyecto.

Al ingeniero Guillermo Aceros del laboratorio del Centro Integrado de Laboratorios de Ingeniería Química (CLIQ), por su colaboración.

A los doctores Maria Paola Maradei y Julio A. Pedraza Avella que nos facilitaron los medidores de H₂.

Al grupo de investigación en corrosión (CIC).

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEÓRICO	19
1.1 ACTINOMYCETOS.....	19
1.2 PRODUCCIÓN DE H ₂ POR FERMENTACIÓN OSCURA	19
1.3 EVOLUCIÓN ADAPTATIVA.....	20
2. METODOLOGIA	21
2.1 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN	21
2.1.1 Requerimiento de condiciones anaerobias y tamaño de vial	22
2.1.2 Tiempo de producción de H ₂	22
2.2 EVOLUCIÓN DE LOS CONSORCIOS.	23
2.3 AISLAMINETO DE CEPAS PURAS PRODUCTORAS DE H ₂	23
2.3.1 Inoculaciones con la muestra criopreservada	23
2.3.2 Diluciones seriadas.....	24
2.3.3 Medición de H ₂ con las cepas puras encontradas.....	24
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	25
3.1 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN.....	25
3.1.1 Requerimiento de condiciones anaerobias y tamaño de vial	25
3.1.2 Tiempo de producción H ₂	26
3.1.2.1 Crecimiento de los inóculos	26
3.1.2.2 Mediciones de H ₂ en los inóculos	27
3.2 EVOLUCIÓN DE LOS CONSORCIOS.	30
3.2.1 Crecimiento de los inóculos	30

3.2.2	Mediciones de H ₂ en los inóculos en DO ₆₀₀ inicial ≈ 0,1	31
3.3	AISLAMIENTO DE CEPAS PURAS PRODUCTORAS DE H ₂	33
3.3.1	Inoculaciones con la muestra criopreservada.....	33
3.3.2	Diluciones seriadas.....	34
3.3.3	Mediciones de H ₂ con las cepas puras encontradas.....	36
4.	CONCLUSIONES.....	37
	CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
	BIBLIOGRAFÍA.....	41
	ANEXOS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metodología experimental para el enriquecimiento de consorcios microbianos nativos y el aislamiento de actinomicetos productores de H ₂	21
Figura 2. Requerimiento de condición anaerobia.....	25
Figura 3, Crecimiento de los inóculos.....	26
Figura 4. Producción total de H ₂	27
Figura 5. Cambio de pH total en los inóculos	28
Figura 6. Producción total de H ₂ Normalizada	29
Figura 7. Crecimiento de los inóculos en DO ₆₀₀ inicial ≈ 0,1	30
Figura 8. Producción total de H ₂ en la evolución.....	31
Figura 9. Producción total de H ₂ Normalizada en la evolución	32
Figura 10. Cepa R1V1.10 ⁻³	34
Figura 11. Cepa R1V1.10 ⁻⁴	34
Figura 12. Cepa R1.10 ⁻⁴ (a).....	35
Figura 13. Cepa R2.10 ⁻⁴ (a).....	35
Figura 14. Cepa R2.10 ⁻⁴ (b).....	35
Figura 15. Cepa R3.10 ⁻⁴ (a).....	35
Figura 16. Producción de H ₂ en cepas de actinomicetos	36
Figura 17. Control positivo con <i>E. coli</i> con el medidor mpT3.....	46
Figura 18. Control positivo con <i>E. coli</i> con el medidor personal de gases	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Producción de H ₂ con la inoculación de la muestra criopreservada.....	33
Tabla 2. CZAPEK (medio liquido)	44
Tabla 3. Luria Bertani (LB), (medio liquido).	44
Tabla 4. Czapek- Agar (medio solido)	44

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Receta de medio de cultivos.....	44
Anexo B: Protocolo de medición de H ₂ con el (mpT3).....	45
Anexo C: Controles positivo con <i>E. coli</i>	46

ABREVIATURAS

LB	Luria Bertani
H₂	Hidrógeno
O₂	Oxígeno
N₂	Nitrógeno
mpT3	Detector multigas personal Tetra 3
DO₆₀₀	Densidad Óptica a 600 nm

RESUMEN

TÍTULO: Enriquecimiento de consorcios microbianos nativos para el aislamiento de actinomicetos productores de hidrógeno*

AUTOR: ERLAI RODRÍGUEZ Adolfo y OSPINA CHINCHILLA Nini Johanna **

PALABRAS CLAVES: actinomicetos, hidrógeno, biocombustibles

DESCRIPCIÓN

El hidrógeno (H_2) es considerado una fuente de energía atractiva debido a que tiene un alto contenido de energía por unidad de masa y su combustión no genera emisiones contaminantes. Para que sea viable la utilización del H_2 es necesario que éste se produzca en forma renovable y con tecnologías de bajo costo. Una alternativa promisoría es la producción biológica de H_2 .

En esta investigación se enriquecieron consorcios microbianos nativos con el fin de aislar actinomicetos productores de H_2 , usando muestras de agua de la laguna, mucílago de café (fresco y fermentado) de la hacienda el Roble en la Mesa de los santos, con las cuales se realizaron pruebas preliminares obteniendo como condiciones de operación un tiempo óptimo de producción de 3 días y pH de 9. Seguido a esto se realizó un proceso de evolución de consorcios a las condiciones descritas anteriormente, esta etapa consistió en 4 ciclos cada uno de 3 días en donde se hicieron reinoculaciones teniendo en cuenta la densidad óptica (DO_{600}) tomando como referencia un DO_{600} inicial $\approx 0,1$ para iniciar con la misma cantidad de células en cada ciclo, al terminar los ciclos se criopreservaron los viales con mayor producción de H_2 : 8 muestras de agua de la laguna. Se aisló el consorcio mejor adaptado en la etapa de evolución (muestra: 12.9.1.2) empleando dos estrategias: inoculaciones y diluciones seriadas a partir de la muestra criopreservada, se obtuvieron 5 cepas que registraron valores entre 1623 y 938 ppm de H_2 .

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Ph.D. Viviana Sánchez Torres.

ABSTRACT

TITLE: Enrichment of native microbial consortia for the isolation of hydrogen producing actinomycetes. *

AUTHOR: ERLAI RODRÍGUEZ Adolfo and OSPINA CHINCHILLA Nini Johanna **

KEYWORDS: actinomycetes, hydrogen, biofuels

DESCRIPTION

Hydrogen (H₂) is considered an attractive energy source because it has a high energy content per unit mass and generates no polluting emissions combustion. To be viable the use of H₂ is necessary that this occurs in renewable and low-cost technologies. A promising alternative is the biological production of H₂.

In this investigation native enriched microbial consortia in order to isolate actinomycetes producing H₂ using water samples from the lake, mucilage coffee (fresh and fermented) of the state El Roble Mesa de los Santos, with which preliminary evidence obtained as optimal operating conditions production time 3 days and pH 9. Following this process of evolution of consortia to the conditions described above was performed, were performed this stage consisted of 4 cycles each 3 days where reinoculations were made taking into account the optical density (DO₆₀₀) by reference to an initial DO₆₀₀ ≈ 0.1 to start with the same amount of cells in each cycle, the end of the cycles the vials were cryopreserved with increased production of H₂: eight samples of pond water. The consortium better adapted to the stage of evolution (sample 12.9.1.2) was isolated using two strategies: inoculations and serial dilutions, from the cryopreserved sample, 5 strains were obtained which recorded values between 1623 and 938 ppm of H₂.

* Work Degree

** Faculty of Engineering Physicochemical. School of Chemical Engineering. Director: Ph.D. Viviana Sanchez Torres.

INTRODUCCIÓN

La problemática ambiental que se vive a nivel mundial es una consecuencia directa de acciones humanas entre las que se encuentra el uso de recursos no renovables como los combustibles fósiles, En Colombia, particularmente se registra un porcentaje de uso superior al 72% de combustibles fósiles donde el principal es el petróleo [1]. La quema de combustibles fósiles ocasiona contaminación atmosférica, emisión de gases de efecto invernadero y lluvia ácida contribuyendo al calentamiento global, la generación de gases de efecto invernadero es la causa principal del calentamiento global.

De este modo las fuentes de energía renovables deberán desempeñar un rol central para conducir al mundo hacia un entorno energético más seguro. [2] El potencial que tiene el uso de fuentes de energía alternativa es amplio, sin embargo la rapidez con que aumente su desarrollo para cubrir la demanda energética mundial depende del apoyo gubernamental que se brinde a iniciativas de investigación y proyectos de implementación que busquen hacerla competitiva en costo y calidad con respecto a los combustibles fósiles.

El hidrógeno (H_2) se considera dadas sus propiedades físicas y químicas, como un importante combustible para el futuro, esto se basa en sus características de ser renovable y no contaminante, lo que lo convierte en un combustible ideal. El H_2 se considera un combustible limpio, pues el producto de su combustión es vapor de agua. Desde el punto de vista energético, el H_2 es, de todos los combustibles, el que tiene la máxima relación energía/peso (142 MJ/kg) [3].

El H_2 puede producirse a partir de procesos convencionales como reformado de gas, gasificación, electrólisis y pirólisis que generalmente utilizan fuentes no renovables; sin embargo, también puede ser producido a través de procesos biológicos que requieren menos energía y pueden utilizar biomasa renovable como

materia prima, contribuyendo además de esta manera al tratamiento de residuos [4].

Hay dos rutas principales para la producción microbiana de H_2 : fotosíntesis y fermentación [5]. Los procesos fotosintéticos presentan mayores rendimientos. Sin embargo, los reactores de fermentación son considerados más prácticos porque pueden alcanzar mayores velocidades de producción y no requieren luz [6], además se pueden utilizar residuos agroindustriales como sustrato mitigando el impacto ambiental que causan este tipo de desechos.

Para que la producción biológica de H_2 , sea posible a escala industrial se requiere mayor investigación en aspectos como: ampliación de conocimiento en fisiología y requerimientos nutricionales de cultivos puros y consorcios bacterianos productores, mejoramiento genético de cepas para aumentar el rendimiento y velocidad de producción utilizando únicamente sustratos residuales para así eliminar costos de adquisición de materias primas.

El objetivo del presente trabajo fue enriquecer consorcios microbianos nativos que condujeran al aislamiento de cepas de actinomicetos productores de H_2 . Los consorcios evaluados se obtuvieron a partir de mucílago de café (fresco y fermentado) y agua de la laguna de tratamiento de las aguas residuales de una empresa procesadora de café. Se escogieron estas fuentes porque en trabajos posteriores se buscará producir H_2 con estas cepas a partir de mucílago de café, el cual es un desecho del proceso de beneficio del café altamente contaminante.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ACTINOMYCETOS

Los actinomicetos son un grupo de bacterias Gram positivas, muy abundantes en el suelo, aguas estancadas, estiércoles y, en general en lugares donde los restos vegetales se descomponen aerobicamente [7]. Los actinomicetos muestran ventajas en el crecimiento, poseen metabolitos secundarios complejo y diversos, entre ellos están los antibióticos, agentes antitumorales, agentes inmunosupresores, y compuestos antiparásitos. Dentro del grupo de actinomicetos el género *Streptomyces* es uno de los principales productores de metabolitos secundarios [8].

Muchos desechos de la industria agrícola y alimentaria contienen almidón y celulosa y otros carbohidratos [9]. La naturaleza compleja de estos residuos afecta negativamente su biodegradabilidad.

Los actinomicetos son bacterias que pueden habitar el suelo y que producen una gran cantidad de enzimas hidrolíticas extracelulares con capacidad de degradar los polímeros de la materia orgánica disponible [10]. Por lo tanto estas bacterias pueden ser muy útiles en procesos industriales que empleen como sustrato residuos agroindustriales.

1.2 PRODUCCIÓN DE H₂ POR FERMENTACIÓN OSCURA

La producción de H₂ por este método está dada por bacterias anaeróbicas o facultativas que crecen en ausencia de oxígeno (O₂) y usan sustratos ricos en carbohidratos. El rendimiento teórico de H₂ en la fermentación oscura están alrededor de 2 mol H₂/mol glucosa. Los subproductos de la fermentación son ácidos orgánicos como acético, succínico y láctico, además del etanol. La distribución de

productos de fermentación depende de las rutas metabólicas características de cada cepa. Las fermentaciones se llevan a cabo a diferentes temperaturas, desde mesófilas (25-40°C), hasta termófilas (>50 °C) produciéndose biogás que contiene H₂, CO₂, CO, H₂S y, en algunos casos, CH₄. Las especies bacterianas que producen hidrógeno por este sistema, y que son más conocidas, son las que corresponden a los géneros *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium* [11]. La temperatura, el pH, el tiempo de retención hidráulico, la presión parcial de H₂ y dióxido de carbono, concentración de ácidos grasos volátiles y el contenido inorgánico son los parámetros principales que afectan el proceso de fermentación anaerobia de H₂ [12].

1.3 EVOLUCIÓN ADAPTATIVA

Durante la evolución adaptativa en el laboratorio, un microorganismo se cultiva en condiciones claramente definidas por períodos prolongados de tiempo, lo que permite la selección de los mejores fenotipos. Las células microbianas ofrecen ventajas importantes para los estudios de evolución adaptativa en el laboratorio: la mayoría de las células microbianas pueden cultivarse fácilmente en el laboratorio por varios cientos de generaciones dentro de varias semanas o meses. [13]. Con el objetivo de obtener las cepas más competentes en las condiciones de cultivo establecidas, se realizó un procedimiento de evolución adaptativa, a lo largo de varias generaciones; los consorcios fueron concentrados realizando reinoculaciones sucesivas en medio selectivo para actinomicetos en condiciones anaerobias.

2. METODOLOGÍA

La estrategia metodológica desarrollada se estableció en etapas orientadas a enriquecer consorcios microbianos nativos productores de H₂. Un diagrama general de la metodología seguida, se expone en la Figura 1.

Figura 1. Metodología experimental para el enriquecimiento de consorcios microbianos nativos y el aislamiento de actinomicetos productores de H₂.



2.1 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN

En la primera etapa se realizaron pruebas preliminares que permitieron identificar las mejores condiciones de operación para evaluar la producción de H₂.

2.1.1 Requerimiento de condiciones anaerobias y tamaño mínimo de vial. Las cepas productoras de H₂ por fermentación oscura, lo hacen en condiciones anaerobias o semianaerobias (baja concentración de O₂). Como las pruebas de producción de H₂ se realizaron en viales de vidrio herméticamente cerrados, se quiso evaluar si era posible la producción de H₂ sin realizar una purga con N₂ para

eliminar el aire presente en el espacio de cabeza. La hipótesis era que dado que el aire no podría entrar al vial, eventualmente todo el O₂ presente se iba a consumir alcanzando las condiciones anaerobias permitiendo así la producción de H₂.

Se utilizaron viales (10 mL, 12 mL, y 13 mL) Los viales se llenaron a la mitad con medio de cultivo Luria Bertani (LB) [14] suplementados con 18 g/L de glucosa, 2 viales de cada tamaño fueron purgados con N₂ durante dos minutos para garantizar la condición anaerobia y otros 2 viales se dejaron sin purgar. Se realizó un precultivo fresco de *Escherichia coli* en un tubo de ensayo con 5 mL de medio LB a 30°C con agitación durante 24 horas. Varias cepas de esta especie bacteriana se han reportado en la literatura como productoras de H₂.

Los viales se incubaron a temperatura ambiente y se midió la producción de H₂, en los días 1, 3 y 6 usando el detector de H₂ multigas personal Tetra 3 (mpT3), acoplado un sistema de eyección de aire.

2.1.2 Tiempo de producción de H₂. Se prepararon viales de 12 mL cada uno con 6 mL de medio CZAPEK y el pH ajustado a 5, 7 y 9. Se prepararon 27 viales para cada pH. Los viales fueron purgados con N₂ para generar anaerobiosis y se inocularon con muestras obtenidas de una empresa santandereana procesadora de café, las muestras fueron agua de la laguna de tratamiento de residuos del proceso de beneficio del café, mucílago de café fresco (obtenido con una desmucilagadora) y mucílago de café fermentado (desecho del beneficio del café), cada vial se inoculó con 0,6 mL de muestra usando jeringas de 1 mL.

Los viales se incubaron a temperatura ambiente sin agitación. Se realizaron pruebas de control positivo con *E. coli* en medio LB y control negativo con medio de cultivo CZAPEK sin inocular.

Las mediciones de H₂ se hicieron a los días 1, 3 y 6 luego de la inoculación, usando el (mpT3). Las pruebas se hicieron por triplicado cada día de las mediciones. Para todas las mediciones se realizó la determinación espectrofotométrica del crecimiento bacteriano, midiendo la turbidez DO₆₀₀. Seguido a la medición de DO₆₀₀ las muestras se centrifugaron a 4000 rpm; 10 min; 4°C para evaluar el cambio de pH del medio en cada una de las muestras.

2.2 EVOLUCIÓN DE LOS CONSORCIOS

Se prepararon 27 viales cada uno con 6 mL de medio CZAPEK con pH ajustado a 5, 7 y 9, y se purgaron con N₂. De cada una de las tres muestras: agua de la laguna, mucilago de café (fresco y fermentado) se inóculo 0,6 mL en 3 viales de cada pH los viales se incubaron a temperatura ambiente, sin agitación durante los 3 primeros días. Estos cultivos se emplearon para inocular nuevos viales con 6 mL de medio CZAPEK y pH 5,7 Y 9 con una DO₆₀₀ inicial ≈ 0,1. Los cultivos se reinocularon en 4 ciclos cada uno de 3 días, luego de evaluar la producción de H₂, el DO₆₀₀ y el pH. La hipótesis es que a medida que transcurran las generaciones, los consorcios se irán concentrando en las cepas mejor adaptadas al medio en condiciones anaerobias (favorecen la producción de H₂). Se seleccionaron los consorcios que tuvieron un alto % LEL de H₂, éstos fueron criopreservados en crioviales usando glicerol -80°C.

2.3 AISLAMIENTO DE CEPAS PURAS PRODUCTORAS DE H₂

2.3.1 Inoculaciones con la muestra criopreservada. El mejor consorcio criopreservado (12.9.1.2) se dejó fundir a 4°C, 0,2 ml de la muestra fundida se utilizaron para inocular viales con 6 mL de medio CZAPEK pH 9, y se siguió el proceso de reinoculaciones cada 3 días hasta que la producción de H₂ fuera máxima (límite superior del mpT3), posteriormente mediante diluciones seriadas se aisló cepas individuales.

2.3.2. Diluciones Seriadas. Con la cantidad restante de la muestra criopreservada se efectuaron diluciones seriadas en solución salina al 85% hasta un factor de dilución de 10^{-6} . Se sembraron 100 μL de cada dilución en cajas Petri con medio CZAPEK-agar.

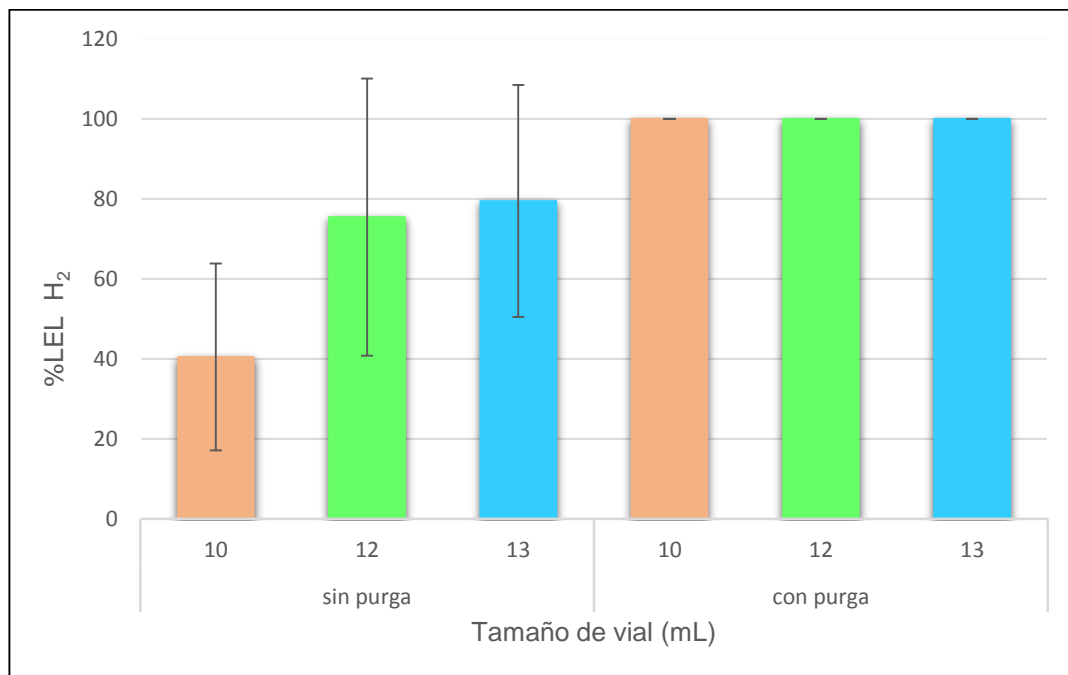
2.3.2 Medición de H_2 con las cepas puras encontradas. Cuando se terminó el proceso de aislar las cepas puras encontradas en los consorcios del agua de la laguna, se planteó la medición de H_2 preparando precultivos frescos por duplicado con las cepas individuales, dos de ellas se obtuvieron de la incubación en viales (R1V1. 10^{-3} y R1V1. 10^{-4}), las demás por diluciones (R2. 10^{-4} (a), R2. 10^{-4} (b) y R3. 10^{-4} (a)) para posteriormente inocular en los viales de 12 mL y con la ayuda del detector Tetra Detector personal de gases para Cuantificar la producción de H_2 .

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN

3.1.1 Requerimiento de condiciones anaerobias y tamaño mínimo de vial

Figura 2. Requerimiento de condición anaerobia

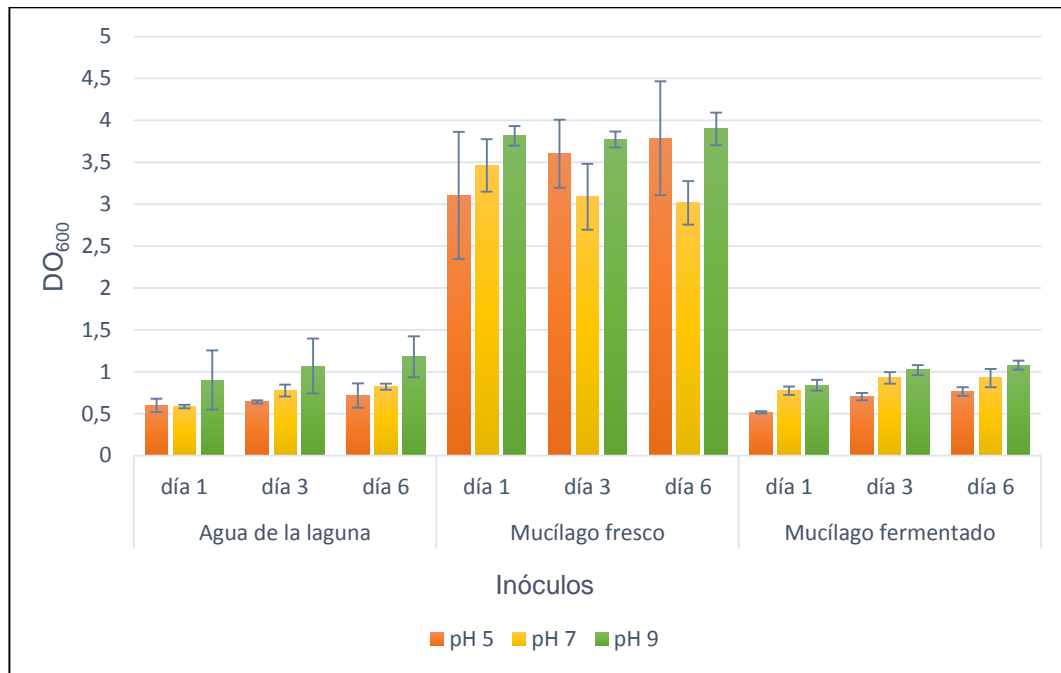


En la Figura 2 se puede observar las mediciones de H₂ en % LEL (que por sus siglas en inglés significa Límite Inferior de Explosión de un gas, es la concentración mínima de gas requerida para que éste se encienda, y que por lo general se expresa como un porcentaje del aire total. Se logró detectar H₂ con el mpT3 y con purga se produjo el máximo mientras que sin purga los valores fueron inferiores. Entonces se necesita la purga de N₂ para garantizar un ambiente anaerobio.

3.1.2 Tiempo de producción de H₂

3.1.2.1 Crecimiento de los inóculos

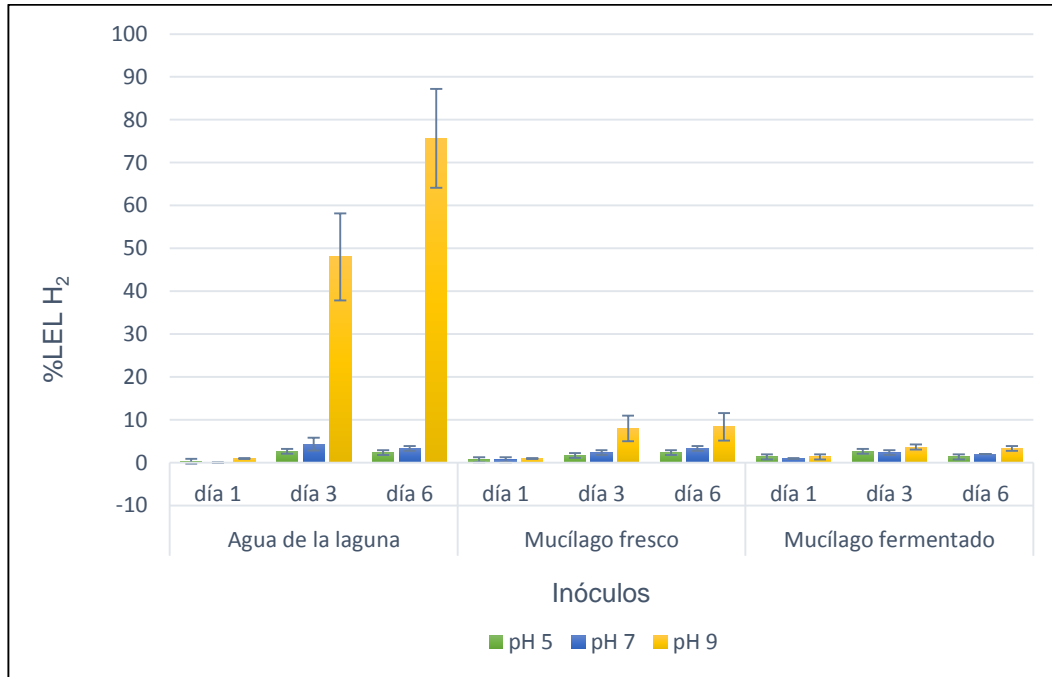
Figura 3. Crecimiento de los inóculos



Los siguientes datos de DO₆₀₀ representan en la Figura 3 el conteo bacteriano, pudiendo observar que: En el inóculo de mucilago de Café fresco se presentó un registro alto de absorbancia en los distintos pH que se trabajaron en los tres días de mediciones, al igual que el pH de 9 en las distintas muestras y días fue el que presentó mayor crecimiento de los consorcios.

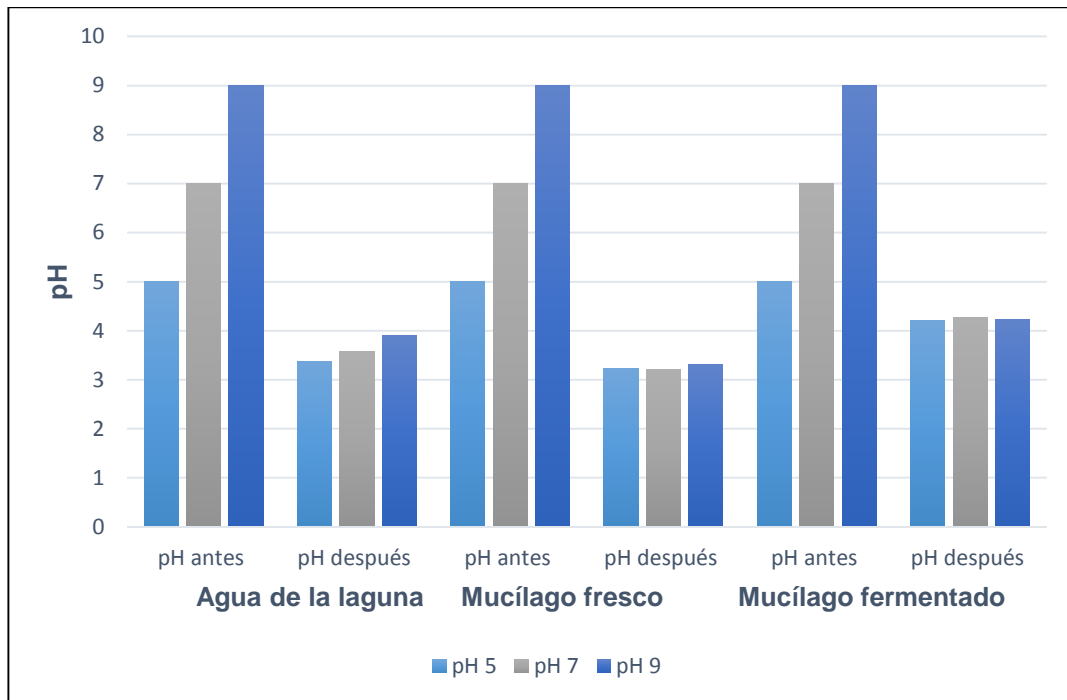
3.1.2.2 Mediciones de H₂ en los inóculos

Figura 4. Producción total de H₂



En la Figura 4. Se identifica que 3 días después de la inoculación la muestra del agua de la laguna tiene altos contenidos de %LEL de H₂ en las otras dos muestras de mucílago de café la producción no fue tan alta 14 veces menor, respecto al pH del medio, la mejor producción se dio en pH 9 para los 3 inóculos.

Figura 5. Cambio de pH total en los inóculos

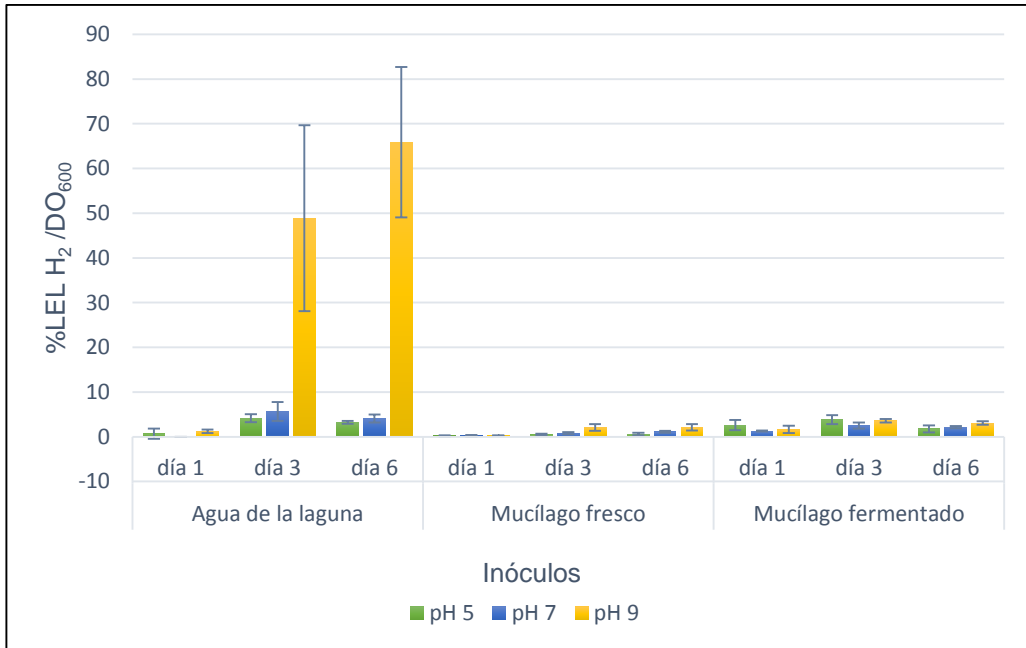


Cuando se termina la lectura de DO_{600} , se efectuó la centrifugación de las muestras para evaluar su pH. En la Figura 5 se analiza que el pH disminuyó en todos los inóculos alrededor de 3,2 y 4,3, este cambio se debió a la actividad metabólica que ocurrió en el medio de cultivo.

Finalmente se decide que es necesario la purga con N_2 para garantizar un ambiente anaerobio, el tiempo de purga de 2 minutos, el tiempo óptimo de producción de H_2 será a los 3 días después de la inoculación y con respecto al pH en la figura 6 se presenta la producción H_2 normalizada de la cual se observa que tanto a la producción como al crecimiento es el pH 9 para el agua de la laguna, pero en las muestras de mucílago el crecimiento de actinomicetos en pH de 5 y 7 es considerable y la producción a pesar de no ser tan alta no difiere mucho a la condición del ajuste de pH que se elaboró por lo cual no se podría descartar,

entonces propusimos trabajar con los distintos pH en la etapa de la evolución con los 3 inóculos.

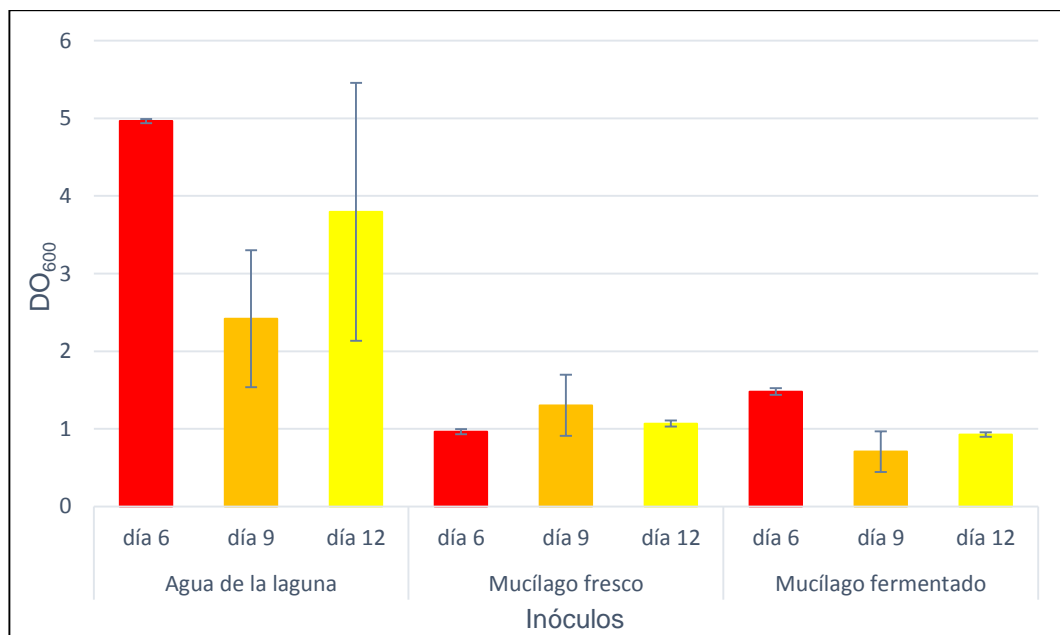
Figura 6. Producción total de H₂ Normalizada.



3.2 EVOLUCIÓN DE LOS CONSORCIOS

3.2.1 Crecimiento de los inóculos en DO_{600} inicial $\approx 0,1$

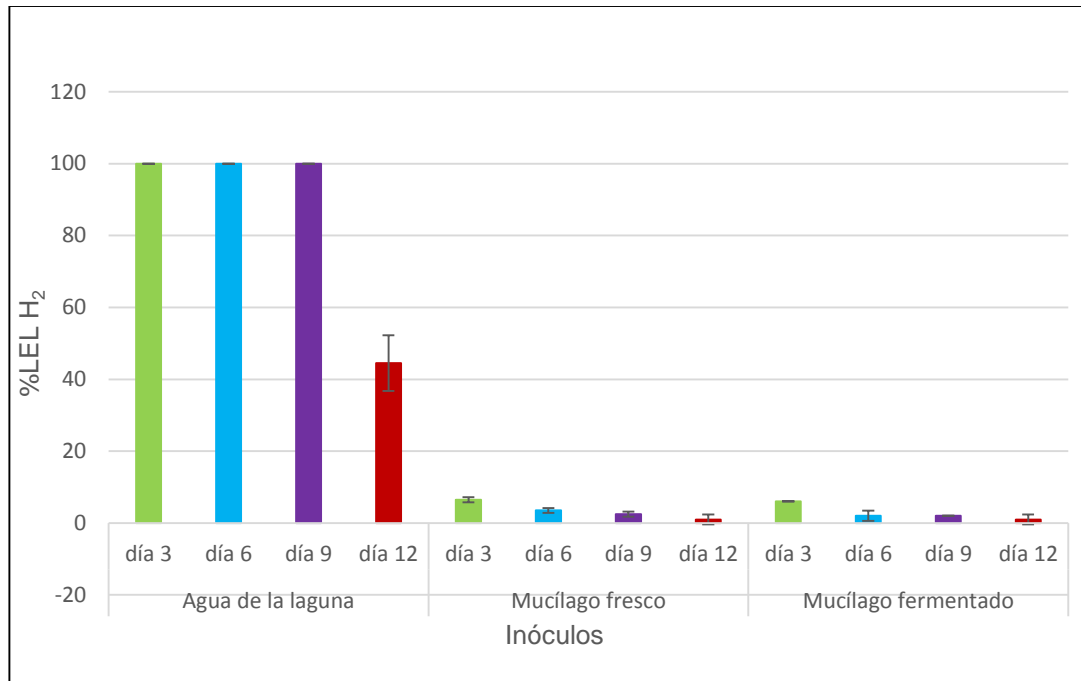
Figura 7. Crecimiento de los inóculos en DO_{600} inicial $\approx 0,1$



Para la etapa de la evolución, la inoculación de las muestras inicial se hizo con 0,6 mL, pero al momento de la primera reinoculación se toma el punto de referencia de un DO_{600} inicial $\approx 0,1$ para empezar con la misma cantidad de células, en ello en la Figura 7 podemos observar que en los días 6, 9 y 12 se destacó el inóculo de agua de la laguna pH 9 presentando mayor DO_{600} en comparación con los otros inóculos, que tuvieron valores similares en toda la evolución, las mediciones se hicieron por duplicado.

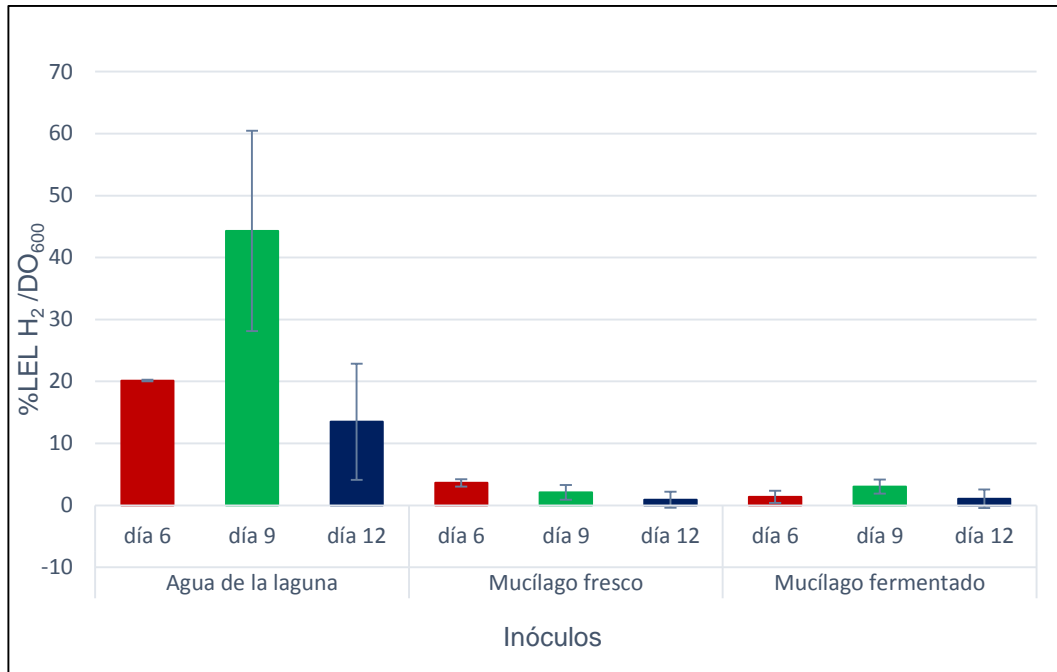
3.2.2 Mediciones de H₂ en los inóculos

Figura 8. Producción total de H₂ en la evolución



En la Figura 8 se muestran los resultados de las mediciones de H₂ a las condiciones de operación ya seleccionadas anteriormente, con las cuales observamos un máximo %LEL de H₂ en el inóculo de agua de la laguna, en los inóculos de mucílago de café la lectura de producción de H₂ disminuye al paso de los días. Y se concluye que la mejor condición de pH es de 9.

Figura 9. Producción Normalizada de H₂ en la evolución



Para verificar el funcionamiento del mpT3 durante la investigación se realizó controles positivos, preparando viales con medio LB inoculados con *E. coli*. Los resultados de este ensayo fueron máximo %LEL de H₂, dando así un grado de confianza al momento de las mediciones del medio CZAPEK con las muestras trabajadas.

3.3 AISLAMIENTO DE CEPAS PURAS PRODUCTORAS DE H₂

3.3.1 Inoculaciones con la muestra criopreservada.

Tabla 1. Producción de H₂ con la inoculación de la muestra criopreservada.

Vial 1		Vial 2		Vial 3		Vial 4		Vial 5	
H ₂	O ₂	H ₂	O ₂	H ₂	O ₂	H ₂	O ₂	H ₂	O ₂
Máx.	14,6	56	15,1	39	13,1	63	15,3	41	15,8

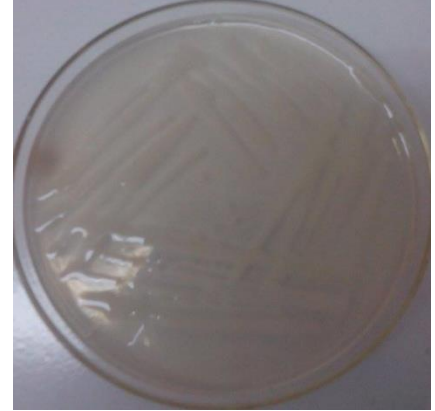
Alarma: Si las concentraciones de alguno de los gases detectados superan los límites establecidos, el dispositivo activará las señales de alarma. El detector proporciona dos niveles de alarma instantáneos, el nivel 1 y el nivel 2, estos se activan por superación de los niveles de gas o por niveles muy bajos. En el caso del oxígeno, la alarma se activa en caso de que el nivel sea muy bajo, para detectar la deficiencia.

Como el vial 1 presentó máximo en la lectura de H₂, con este vial desarrollamos diluciones seriadas y sembramos en cajas de petri con 30 mL de Czapek-Agar. De estas diluciones el crecimiento fue abundante por lo cual se repicó alguna de las colonias que se observaron diferentes, la dilución 10⁻³ (Figura 10) y la dilución 10⁻⁴ (Figura 11.) tuvieron una característica en su crecimiento por lo cual se repicó para tener una cepa pura individual.

Figura 10. Cepa R1V1.10-3



Figura 11. Cepa R1V1.10-4



R1V1.10⁻³: R indica que es un repique tomado de la muestra original, el 1 indica las veces que la muestra se ha aislado de la anterior, V1 del vial 1 de la inoculación de la muestra criopreservada y 10⁻³ tipo de Dilución.

En este experimento se aislaron las cepas R1V1.10⁻³ y R1V1.10⁻⁴ para usarlas en la medición de H₂

3.3.2 Diluciones seriadas.

Con las diluciones solo se percibió el crecimiento de las colonias diluidas en 10⁻⁴ de la cual se repicó las 2 colonias que se formaron, usando el mismo medio de cultivo. Al cabo de 3 días se notó el crecimiento de la cepa (Figura 12), la cual se siguió aislando con el fin de tener la cepa pura individual. (Figura 15).

Figura 12. Cepa R1.10⁻⁴ (a)



Figura 13. Cepa R2.10⁻⁴(a)



Figura 14. Cepa R2.10⁻⁴ (b)

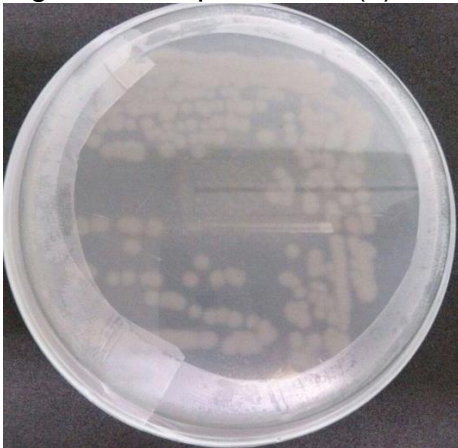


Figura 15. Cepa R3.10⁻⁴ (a)



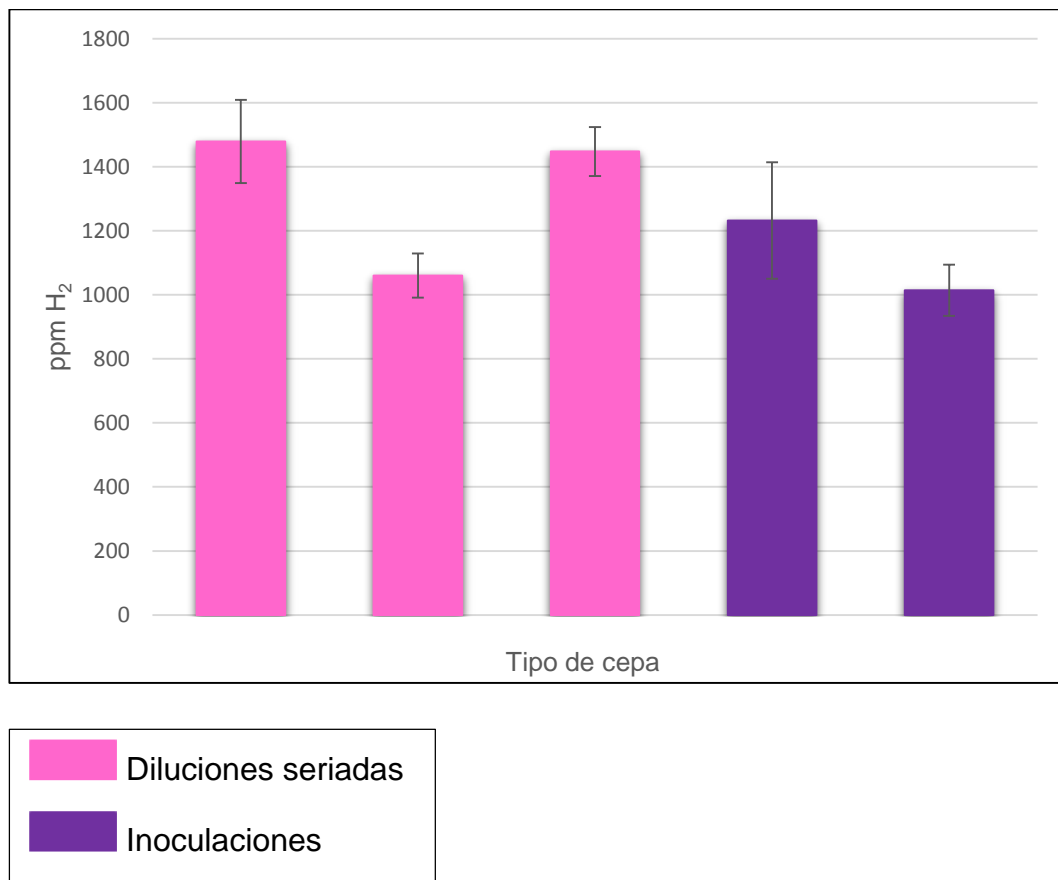
R1: R indica que es un repique tomado de la muestra original 10⁻⁴ y el (1, 2 o 3) indica las veces que la muestra se ha aislado de la muestra anterior, 10⁻⁴ el tipo de Dilución y la letra (a o b) que es otro tipo de colonia.

Con los procedimientos se encontraron 3 tipos de cepas individuales (R2.10⁻⁴ (a), R2.10⁻⁴ (b) y R3.10⁻⁴ (a)) las cuales para purificar se prosigió con los repiques.

3.3.3 Medición de H₂ con las cepas puras encontradas.

Se evaluaron las cepas al tiempo óptimo de producción de H₂

Figura 16. Producción de H₂ en cepas de actinomicetos



De la figura 16 se puede concluir que las cepas R2.10⁻⁴ (a), R2.10⁻⁴ (b) y R3.10⁻⁴ (a) que se aislaron de manera directa usando diluciones seriadas registraron valores entre 1623 y 938 de ppm de H₂, mientras que las del proceso de adaptación al medio entre 1209 y 989 ppm.

4. CONCLUSIONES

- Los resultados demuestran que enriqueciendo muestras de residuos agroindustriales como: agua de la laguna, mucílago de café (fresco y fermentado), la producción de H₂ es detectable tres días después de la inoculación a un pH de 9.
- De las tres muestras de consorcios nativos estudiadas se encontró que el agua de la laguna arrojó una mayor producción de H₂ durante el proceso de evolución adaptativa.
- Se aislaron 5 cepas de actinomicetos productoras de H₂ de la muestra de agua de la laguna, las cuales se criopreservaron a -80 °C para trabajos posteriores.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] SALAS, Eduard. Eficiencia energética: mayor rapidez, menor contaminación. Universidad de Antioquia. {En línea}. {12 junio de 2014} disponible en: (www.udea.edu.co/portal/page/portal/bActualidad/Principal_UdeA/UdeANoticias/Historial/Historial%202011/Vida/ACB33E6FA6A3D99DE04018C8341F2EF1).

[2] GARCÍA, Carmen. El futuro de las energías renovables depende crucialmente del fuerte apoyo gubernamental. {En línea}. {12 junio de 2014} disponible en: (www.madrimasd.org/energiasalternativas/2011/01/13/131069).

[3] DEBATRABA, Das. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. {En línea}. {1 julio de 2014} disponible en: (www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319900000586).

[4] HERNANDEZ, Mario. Hydrogen production from anaerobic co-digestion of coffee mucilage and swine manure. {En línea}. {23 mayo de 2014} disponible en: (hal.inria.fr/file/index/docid/778944/filename/Hernandez_M_11_2012.pdf).

[5] CHEN, Xi. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. Int J Hydrogen Energy. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319905001187).

[6] LOUBETTE, Nicolas. Fermentation reactors are considered more practical because they can achieve higher production rates not require light. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.cder.dz/A2H2/Medias/Download/Proc%20PDF/PARALLEL%20SESSIONS/%5BS07%5D%20Production%20-%20Fermentation/13-06-06/220.pdf).

[7] CRAWFORD, D. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: ([www.ijabpt.com/pdf/93053-Amit%20Pandey\[1\].pdf](http://www.ijabpt.com/pdf/93053-Amit%20Pandey[1].pdf)).

[8] BALTZ, Hosted. Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes. {En línea}. {10 julio de 2014 } disponible en: (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8771797).

[9] RAMIREZ, Pablo. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Revista Peruana de Biología. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332003000100008&script=sci_arttext)

[10]. BOIRON P, Provost F. Enzymatic characterization of Nocardia spp. and related bacteria by API ZYM profile. Mycopathologia. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2352550).

11] REITH, Jim. Bio-methane & Bio-hydrogen status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological Hydrogen Foundation. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.ircwash.org/resources/bio-methane-and-bio-hydrogen-status-and-perspectives-biological-methane-and-hydrogen).

[12] BEDOYA, Andrea. Biological production of hydrogen: a literature survey. {En línea}. {20 julio de 2014} disponible en: (www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S001273532008000100014&script=sci_arttext).

[13] DRAGOSITS, Martin. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.microbialcellfactories.com/content/12/1/64).

[14] BERTANI, Guiseppi. Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386127/?page=1).

BIBLIOGRAFÍA

BALTZ, Hosted. Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomyces. {En línea}. {10 julio de 2014 } disponible en: (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8771797).

BEDOYA, Andrea. Biological production of hydrogen: a literature survey. {En línea}. {20 julio de 2014} disponible en: (www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0012-73532008000100014&script=sci_arttext).

BERTANI, Guiseppi. Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386127/?page=1).

BOIRON P, Provost F. Enzymatic characterization of *Nocardia* spp. and related bacteria by API ZYM profile. *Mycopathologia*. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2352550).

CHEN, Xi. Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *Int J Hydrogen Energy*. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319905001187).

CRAWFORD, D. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: ([www.ijabpt.com/pdf/93053-Amit%20Pandey\[1\].pdf](http://www.ijabpt.com/pdf/93053-Amit%20Pandey[1].pdf)).

DEBATRABA, Das. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. {En línea}. {1 julio de 2014} disponible en: (www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319900000586).

DRAGOSITS, Martin. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.microbialcellfactories.com/content/12/1/64).

GARCÍA, Carmen. El futuro de las energías renovables depende crucialmente del fuerte apoyo gubernamental. {En línea}. {12 junio de 2014} disponible en: (www.madrimasd.org/energiasalternativas/2011/01/13/131069).

HERNANDEZ, Mario. Hydrogen production from anaerobic co-digestion of coffee mucilage and swine manure. {En línea}. {23 mayo de 2014} disponible en: (hal.inria.fr/file/index/docid/778944/filename/Hernandez_M_11_2012.pdf).

LOUBETTE, Nicolas. Fermentation reactors are considered more practical because they can achieve higher production rates not require light. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.cder.dz/A2H2/Medias/Download/Proc%20PDF/PARALLEL%20SESSIONS/%5BS07%5D%20Production%20-%20Fermentation/13-06-06/220.pdf).

RAMIREZ, Pablo. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Revista Peruana de Biología. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332003000100008&script=sci_arttext)

REITH, Jim. Bio-methane & Bio-hydrogen status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological Hydrogen Foundation. {En línea}. {10 julio de 2014} disponible en: (www.ircwash.org/resources/bio-methane-and-bio-hydrogen-status-and-perspectives-biological-methane-and-hydrogen).

SALAS, Eduard. Eficiencia energética: mayor rapidez, menor contaminación. Universidad de Antioquia. {En línea}. {12 junio de 2014} disponible en: (www.udea.edu.co/portal/page/portal/bActualidad/Principal_UdeA/UdeANoticias/Historial/Historial%202011/Vida/ACB33E6FA6A3D99DE04018C8341F2EF1).

ANEXOS

Anexo A. Receta de medio de cultivos

Tabla 2. CZAPEK (medio liquido).

Ingredientes	Gramos/L
Sacarosa	30
Nitrato de sodio	3
Cloruro de potasio	0,5
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,5
Sulfato de hierro(II) heptahidratado	0,01
Di-potasio hidrogeno fosfato	1

Tabla 3. Luria Bertani (LB), (medio liquido)

Ingredientes	Gramos/L
Extracto de levadura	5 g/l
Triptona	10g/l
NaCl	10g/l

Tabla 4. Czapek-Agar (medio solido)

Ingredientes	Gramos/L
Sacarosa	30
Nitrato de sodio	3
Cloruro de potasio	0,5
Sulfato de magnesio heptahidratado	1,025
Sulfato de hierro(II) heptahidratado	0,018
Di-potasio hidrogeno fosfato	1
Agar	15

Anexo B. Protocolo de medición de H₂ con el (mpT3)

Guía de uso de la unidad Tetra 3 para el enriquecimiento de consorcios microbianos nativos productores de H₂.

- Para realizar una toma de muestras manual con el Tetra 3, debe fijarse una placa del adaptador de flujo en la parte delantera del instrumento, para ello se fija las rejillas del sensor y enrosque el tornillo de ajusta manual hasta que la placa este firmemente fijada, igualmente sobre la entrada del gas se fija una manguera acoplada a una aguja , y en la salida del gas una jeringa de 5 mL que se usa como aspirador, para retirar la placa se desenrosque el tornillo de ajuste manual y levante la placa fuera del instrumento.
- Luego se realiza la guía de inicio rápido descrita en el manual del usuario del Tetra 3 Detector multigas personal.
- Cuando el sistema está listo para su ejecución se inserta la aguja que se encuentra en el adaptador de flujo en la parte de entrada del gas, y se extrae el aire contenido en la unidad usando la jeringa que se encuentra en la parte posterior del adaptador.
- Se espera un tiempo de 2 minutos para tomar el registro.
- Y cuando se termina la prueba del registro de producción de H₂, se realiza el apagado de la unidad.

Anexo C. Controles positivo con *E. coli*

Figura 17. Control positivo con *E. coli* con el medidor mpT3

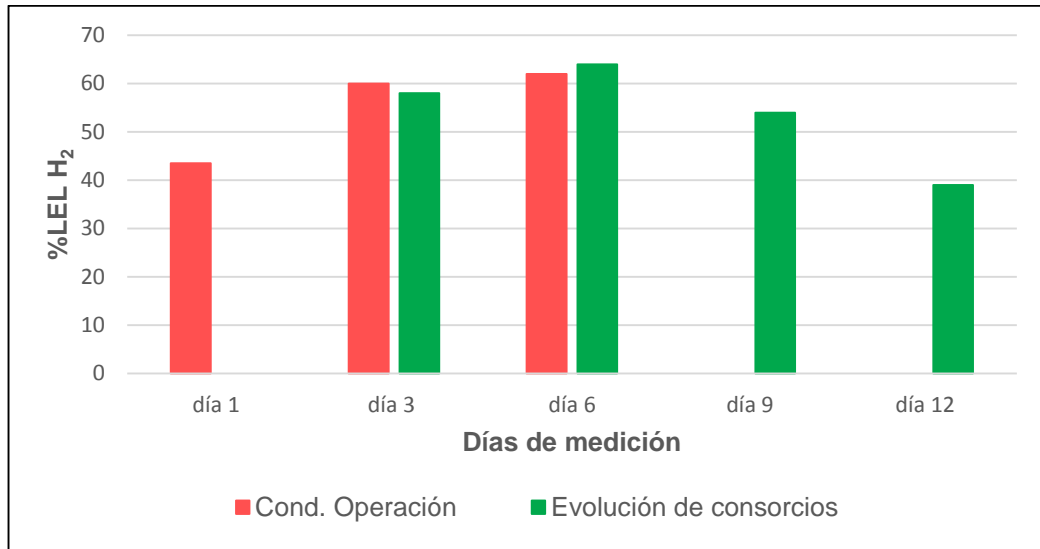


Figura 18. Control positivo con *E. coli* con el medidor personal de gases

