



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

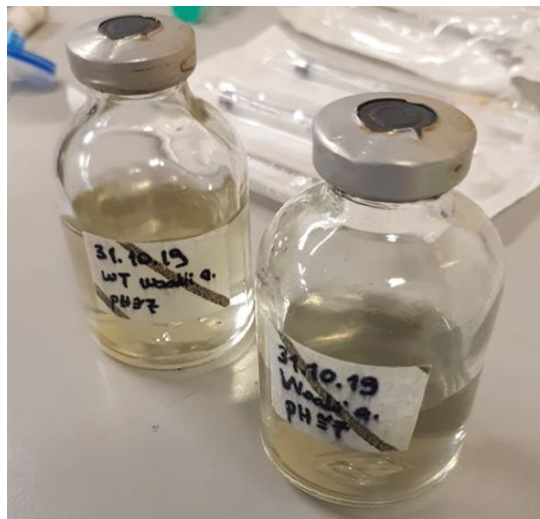
Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Producción de compuestos de alto valor añadido a partir de gases de efecto invernadero en biorreactores

Producción de compostos de alto valor engadido a partir de gases de efecto invernadoiro en biorreactores

Production of high added-value compounds from greenhouse gases in bioreactors



Iván Pereira Orosa

Curso: 2019 - 2020. Convocatoria: xuño

Director: Dr. Christian A.M. Henri Kennes

Agradecimientos

Este traballo de fin de grao vai dedicado a meus pais, Josefa e Salvador, que iniciando unha vida xuntos con moito traballo, grazas ao seu esforzo e apoio, puideron darnos a oportunidade de estudar unha educación plena a meu irmán e a min. Tamén vai dedicado a miña madriña, Carmen, meus tíos/as, primos/as e miña avoa, os que me apoiaron ao largo da miña vida académica e persoal.

Aos meus amigos dende a escola en Vilalba, que levamos toda unha vida xuntos, e a todos os meus compañeiros de clase e laboratorio que coñecín ao largo do grao na Universidade de A Coruña.

Finalmente, quero agradecer a mi director Dr. Christian Kennes, quien guiándome y aconsejándome con todas las partes de este trabajo, dentro y fuera del laboratorio, me ha ayudado todo lo posible en tiempos difíciles de este 2020, y a mis compañeras de laboratorio Kübra Arslan y Büşra Bayar, thank you for sharing your effort, guiding and advising me. I wish you the best of success.

Índice

Resumen/Resumo/Abstract.....	1
Cronograma	4
1. Introducción.....	7
1.1 Cambio climático: el efecto invernadero.....	7
1.2 Métodos de obtención de productos de alto valor añadido a partir de CO ₂	8
1.3 Bioproceso: la ruta Wood-Ljungdahl	10
1.4 Acetógenos	12
1.4.1 <i>Acetobacterium woodii</i>	13
1.4.2 <i>Clostridium aceticum</i>	13
1.4.3 <i>Clostridium carboxidivorans</i>	14
2. Objetivos	15
3. Antecedentes	15
4. Procedimiento experimental.....	17
4.1 Reactivos y preparación del medio del primer experimento.....	17
4.2 Reactivos y preparación del medio del segundo experimento	22
4.3 Reactivos y preparación del medio del tercer experimento	24
4.4 Reactivos y preparación del medio del cuarto experimento	25
4.5 Inoculación de la bacteria.....	27
5. Equipos y métodos de análisis	28
5.1 Medición de pH	28
5.2 Análisis de muestras de líquido mediante HPLC.....	29
5.3 Análisis de muestras de gas mediante GC	30
6. Resultados y discusión.....	32
6.1 Estudio del efecto del ZVI con la bacteria <i>A. woodii</i>	32
6.2 Estudio de la producción de ácido acético a partir de CO ₂ con la bacteria <i>C. aceticum</i> , creciendo el inóculo con fructosa	36
6.3 Estudio de la producción de ácido acético a partir de CO ₂ con la bacteria <i>C. aceticum</i> , creciendo el inóculo con CO	39
6.4 Estudio de la producción de ácido acético a partir de CO ₂ con las bacterias <i>C. aceticum</i> y <i>C. carboxidivorans</i> , creciendo el inóculo con CO.....	43
7. Conclusiones/conclusionés/conclusions	50
8. Bibliografía	53

Resumen/Resumo/Abstract

Resumen

El cambio climático es un importante problema mundial que consiste en el aumento de la temperatura del planeta, provocado por determinados gases entre los que destaca el dióxido de carbono (CO_2), producido por la combustión de fuentes de energía fósiles como el gas natural, el petróleo y el carbón, lo que genera el llamado efecto invernadero. Este problema ha obligado a científicos e ingenieros a investigar nuevas tecnologías que permitan la reducción de las emisiones de CO_2 , incluso a su utilización para generar a través de una serie de reacciones productos alternativos de alto valor añadido.

En este estudio se investiga la conversión de CO_2 en ácido acético (CH_3COOH), usando hierro de valencia cero (ZVI, "Zero Valent Iron") para generar hidrógeno (H_2) y posteriormente obtener ácido acético a través de una reacción de CO_2 , con el H_2 generado, llevada a cabo en un medio de reacción, con condiciones anaerobias, por un acetógeno (bacteria acetogénica).

El CO_2 es un compuesto que se considera estable química y termodinámicamente, con el carbono de la molécula en alto estado de oxidación (IV), por lo que se necesitan condiciones altamente reductoras para su reducción, que proporciona el hidrógeno generado en la reacción con el hierro de valencia cero en condiciones anaerobias. En un primer experimento se estudia la concentración de ZVI adecuada para llevar a cabo este proceso.

Para realizar la conversión final de CO_2 en ácido acético se necesita la presencia de un acetógeno que, mediante una reacción bioquímica que usa el CO_2 y el H_2 , realiza la ruta metabólica de Wood-Ljungdahl y genera CH_3COOH en condiciones anaerobias. En este estudio se realizan tres experimentos con varias bacterias acetogénicas para investigar la mayor producción de ácido acético en diferentes condiciones de pH, con distintos sustratos para el crecimiento de la bacteria y diferente aportación de CO_2 .

Palabras clave: cambio climático, dióxido de carbono, efecto invernadero, ácido acético, anaerobias, hidrógeno, hierro de valencia cero, acetógeno.

Resumo

O cambio climático é un gran problema global que consiste no aumento da temperatura do planeta, causado por certos gases, entre os que destaca o dióxido de carbono (CO_2), producido pola combustión de fontes de enerxía fósiles como o gas natural, petróleo e carbón, que xera o chamado efecto invernadoiro. Este problema obrigou a científicos e enxeñeiros a investigar novas tecnoloxías que permitan a redución das emisións de CO_2 , incluído o seu uso para xerar a través dunha serie de reaccións produtos alternativos de alto valor engadido.

Neste estudo invéstigase a conversión de CO_2 en ácido acético (CH_3COOH), empregando ferro de valencia cero (ZVI, "*Zero Valent Iron*") para xerar hidróxeno (H_2) e posteriormente obter ácido acético a través dunha reacción de CO_2 , co H_2 xerado, levado a cabo nun medio de reacción, en condicións anaerobias, por un acetóxeno (bacteria acetoxénica).

O CO_2 é un composto que se considera química e termodinamicamente estable, co carbono da molécula en alto estado de oxidación (IV), polo que se necesitan condicións altamente redutoras para a súa redución, proporcionadas polo hidróxeno xerado na reacción co ferro de valencia cero en condicións anaerobias. Nun primeiro experimento, estúdase a concentración ZVI axeitada para levar a cabo este proceso.

Para realizar a conversión final de CO_2 en ácido acético é necesaria a presenza dun acetóxeno que, mediante unha reacción bioquímica que usa CO_2 e H_2 , realiza a ruta metabólica Wood-Ljungdahl e xera CH_3COOH en condicións anaerobias. Neste estudo realízanse tres experimentos con varias bacterias acetoxénicas para investigar o aumento da produción de ácido acético en diversas condicións de pH, con diferentes substratos para o crecemento da bacteria e diferente aporte de CO_2 .

Palabras chave: cambio climático, dióxido de carbono, efecto invernadoiro, ácido acético, anaerobias, hidróxeno, ferro de valencia cero, acetóxeno.

Abstract

Climate change is a major global problem that consists in the increase of the planet's temperature, caused by certain gases, among which carbon dioxide (CO₂) stands out, produced by the combustion of fossil energy sources such as natural gas, oil and coal, which generates the so-called greenhouse effect. This problem has forced scientists and engineers to investigate new technologies that allow the reduction of CO₂ emissions, including their use to generate, through a series of reactions, high added-value alternative products.

In this study, the conversion of CO₂ into acetic acid (CH₃COOH) is investigated, using zero valent iron (ZVI) to generate hydrogen (H₂) and subsequently obtaining acetic acid through the reaction of CO₂, with the H₂ generated, carried out in a reaction medium, under anaerobic conditions, by an acetogen (acetogenic bacteria).

CO₂ is a compound that is considered chemically and thermodynamically stable, with the carbon of the molecule in a high oxidation state (IV), so highly reducing conditions are required for its reduction, which is provided by the hydrogen generated in the reaction with the zero valent iron under anaerobic conditions. In a first experiment, the appropriate ZVI concentration is studied to carry out this process.

To carry out the final conversion of CO₂ to acetic acid, the presence of an acetogen is required which, through a biochemical reaction that uses CO₂ and H₂, uses the Wood-Ljungdahl metabolic pathway and generates CH₃COOH under anaerobic conditions. In this study, three experiments are carried out with various acetogenic bacteria to investigate the highest production of acetic acid under different pH conditions, with different substrates for the growth of the bacteria and different concentrations of CO₂.

Key words: climate change, carbon dioxide, greenhouse effect, acetic acid, anaerobes, hydrogen, zero valent iron, acetogen.

Cronograma

- Presentación del TFG y entrada en el laboratorio de ingeniería química.
- Primer experimento con la bacteria *Acetobacterium woodii*.
- Segundo experimento con la bacteria *Clostridium aceticum*.
- Tercer experimento con la bacteria *Clostridium aceticum*.
- Cuarto experimento con las bacterias *C. aceticum* y *C. carboxidivorans*.
- Redacción de la memoria del TFG.

Octubre						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31			

Noviembre						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
				1	2	3
4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	

Diciembre						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29
30	31					

Enero						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31		

Febrero						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
					1	2
3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	

Marzo						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	21	22
23	24	25	26	27	28	29
30	31					

Mayo						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
				1	2	3
4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17
18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	31

Junio						
Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30					

1. Introducción

1.1 Cambio climático: el efecto invernadero

El cambio climático es un problema de escala mundial que consiste en el aumento de la temperatura del planeta a consecuencia de la emisión a la atmósfera de gases de efecto invernadero, los cuales absorben la radiación térmica emitida por el planeta, la irradian en todas direcciones e impiden que se libere al espacio, devolviéndola a la superficie terrestre e incrementando la temperatura superficial media. Algunos de estos son los clorofluorocarbonos (CFC), el metano (CH_4), el monóxido de dinitrógeno (N_2O), y el más relevante, el dióxido de carbono (CO_2), producido principalmente en la combustión de fuentes de energía fósiles como el gas natural, el petróleo y el carbón. La concentración de CO_2 atmosférico aumentó desde la era preindustrial de $280 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (ppm) a más de 420 ppm, pudiendo llegar a final de siglo a más de 800 ppm, lo que contribuye en gran medida al aumento del calentamiento del planeta, variando según las previsiones en un aumento entre $1,5^\circ\text{C}$ más que el período de referencia actual (1986-2005), hasta un aumento de más de 4°C dependiendo de las medidas de reducción de emisiones tomadas.^{1, 2, 3.}

Este cambio climático provocado por el efecto invernadero supone graves amenazas para la población, ya que ocasiona la elevación del nivel del mar, una mayor frecuencia e intensidad de fenómenos meteorológicos extremos, la desaparición de multitud de especies plantas y animales, y un aumento de problemas de salud a través de golpes de calor o infecciones transmitidas por vectores.^{1, 2, 4} Debido a esto, todos los países del mundo deben adoptar medidas necesarias para la reducción de los gases de efecto invernadero, en especial el CO_2 , invirtiendo en ciencia y tecnología.

Una posibilidad para reducir las emisiones de CO_2 es la implementación de la denominada economía circular, que es un sistema regenerativo en el que se minimizan el consumo de recursos y los desechos, las fugas de energía y las emisiones, pudiendo lograrse mediante la reutilización, refabricación y reciclaje reducir las emisiones de gases de efecto invernadero en sectores clave. Un ejemplo de estas técnicas es el desarrollo para uso industrial de procesos de fermentación de gas, en los cuales se usa H_2 , CO_2 y/o CO para generar, a través de reacciones bioquímicas, en condiciones aerobias o anaerobias, compuestos finales de alto valor añadido.⁵

1.2 Métodos de obtención de productos de alto valor añadido a partir de CO₂

Existen microorganismos, de los que se ha realizado numerosas investigaciones, que permiten realizar el proceso de fermentación y crecer con gases como el CO₂, H₂, y/o CO, en diversas proporciones y concentraciones, a través de vías de bioconversión anaerobia (descomposición de compuestos biodegradables sin presencia de oxígeno), como la acetogénesis y la metanogénesis (Figura 1). Este método, es una tecnología de bajo consumo de energía y de materia prima flexible (puede usar tanto H₂ y CO₂ como gases residuales de procesos industriales que contienen CO, como, por ejemplo, en las industrias metalúrgicas), que utiliza el potencial de bacterias anaerobias para facilitar la conversión de compuestos de carbono (C1) en una variedad de compuestos químicos como el acetato, etanol, 2,3 butanodiol y lactato (Figura 2), a través del uso de la vía reductora Acetil-CoA, como sucede en la acetogénesis y la metanogénesis. Los microorganismos capaces de usar compuestos C1 como única fuente de energía y carbono se denominan microorganismos unicarbonotróficos, y los microorganismos que usan CO₂ y CO como fuente de carbono y H₂ como fuente de energía se denominan como autotróficos. Actualmente, son objeto de estudio muchos tipos de microorganismos de dos géneros, *Acetobacterium* y *Clostridium*, que llevan a cabo mediante la bioconversión, la producción de etanol y/o ácido acético, siendo más frecuente en muchos de estos tipos de microorganismos la producción o una mayor concentración de ácido acético.^{5,6}

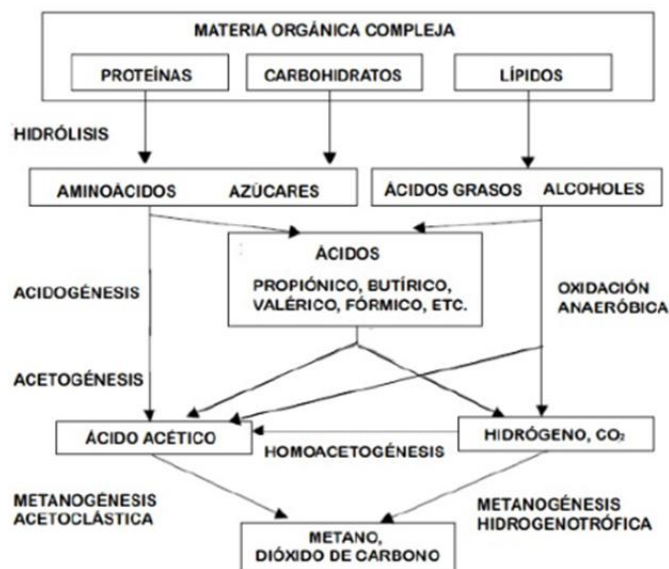


Figura 1: Procesos de digestión anaerobia de acetógenos⁷

Además de las bacterias anaerobias, también las bacterias aerobias, en especial las carboxidotróficas, son estudiadas para la producción de compuestos de alto valor añadido a partir de gases (Figura 2). Estas bacterias pueden crecer quimiolitotroficamente en CO o H₂ y CO₂ (syngas) mediante el uso de la ruta reductora de la pentosa fosfato para el anabolismo (construcción de moléculas a partir de unidades más pequeñas) y el O₂ como aceptor final de electrones en el metabolismo energético.⁵ En esta ruta metabólica se llevan a cabo dos fases distintas, la inicial la fase oxidativa, que genera NADPH, y una segunda que es la fase de síntesis no oxidativa de azúcares de cinco carbonos. La oxidación aerobia de CO genera una mayor cantidad de ATP que la fermentación anaerobia con CO, no obstante, aún es necesario una mayor investigación en herramientas moleculares para las bacterias aerobias carboxidotróficas (pocas de las cuales se han caracterizado en detalle hasta ahora) y un mayor estudio en la producción de cepas de estos microorganismos.⁸ Además, dificulta su uso que el H₂ y CO muestran muy baja solubilidad en disoluciones acuosas, y el manejo de H₂ y CO en presencia de O₂ requiere precauciones extensas, que nos son tan críticas en condiciones anaerobias.

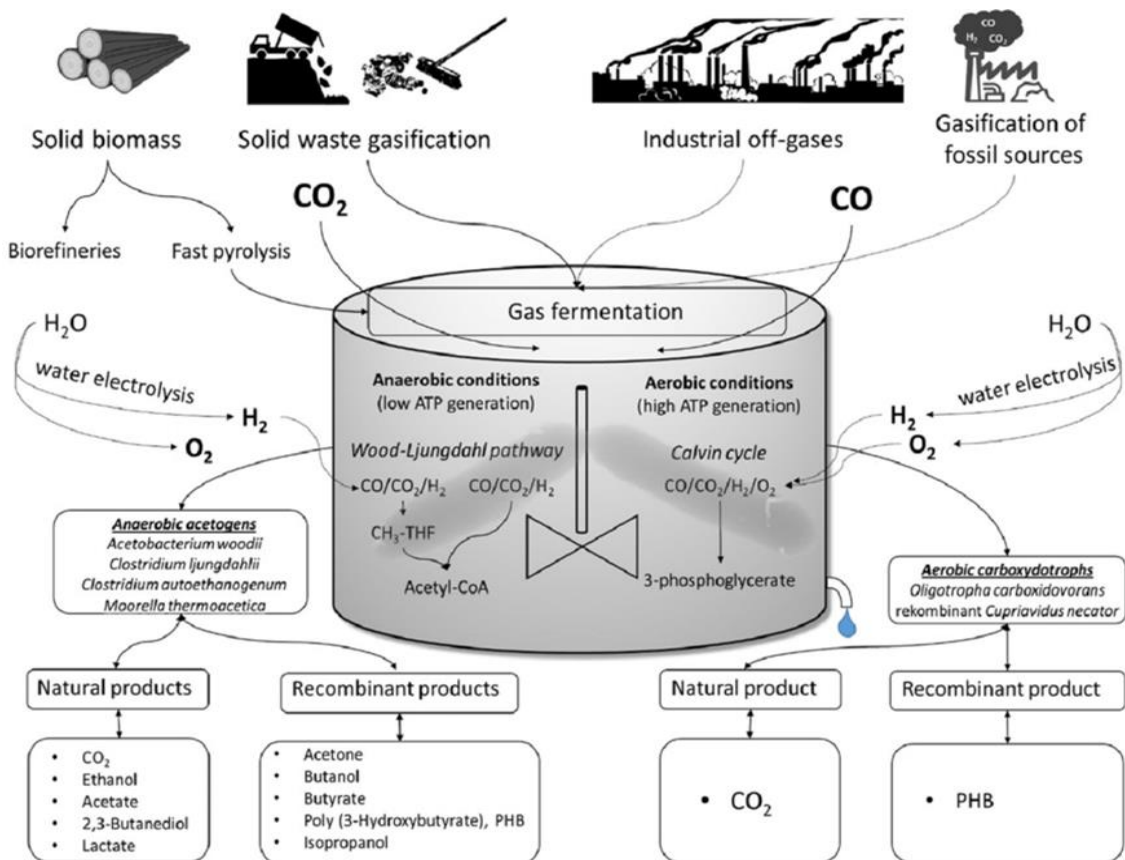
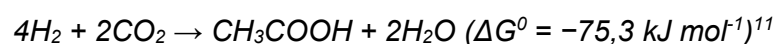
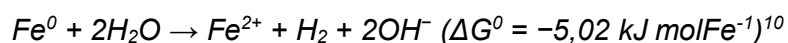


Figura 2: Procesos aerobios y anaerobios para la fermentación de gas⁵

1.3 Bioproceso: la ruta Wood-Ljungdahl

Las bacterias acetogénicas anaerobias son las que pueden utilizar la ruta reductora acetil-CoA para la reducción de CO₂ al intermedio acetil denominado acetil-coenzima A (acetil-CoA), para la conservación de energía como terminal aceptor de electrones y para la fijación (asimilación) de CO₂. La ruta reductora acetil-CoA se conoce con el nombre de ruta Wood-Ljungdahl, en reconocimiento a sus primeros investigadores, Lars G. Ljungdahl y Harland G. Wood, quienes dilucidaron su química y enzimología usando la bacteria *Moorella thermoacetica*. También se conoce a este proceso como ruta CODH/ACS tras el descubrimiento de la enzima clave de la ruta la CO deshidrogenasa/Acetil-CoA sintasa.⁹

Esta ruta reductora está ampliamente distribuida de manera diversa entre los distintos tipos de los géneros de bacterias *Acetobacterium* y *Clostridium*. Las bacterias acetogénicas anaerobias utilizan los gases CO₂ y H₂ para producir ácido acético. En este estudio, inicialmente se obtiene el H₂ a partir del hierro de valencia cero, el cual es un elemento metálico no tóxico y de bajo coste, que en condiciones anaerobias permite generar el H₂, debido a la producción de hidróxido y al aumento de la basicidad del medio¹⁰. Posteriormente, el H₂ generado reacciona con el CO₂ y se produce ácido acético como se muestra en las siguientes reacciones:



La ruta Wood-Ljungdahl es una ruta irreversible (no cíclica), que consta de una rama oriental (la del metilo) y una rama occidental (la del carbonilo), para generar el intermedio acetil-CoA (Figura 3). En la rama del metilo, se lleva a cabo una reducción de seis electrones, generados a partir del H₂ por enzimas hidrogenasa, en cada CO₂, que se reduce a formiato, el cual se acopla a la coenzima tetrahydrofolato (THF), hidrolizando un ATP a ADP y fosfato inorgánico (P_i). Posteriormente el CO₂ se reduce sucesivamente a metil-THF y el metilo se transfiere a una proteína hierro-azufre-corrinoide. En la rama del carbonilo, la cual es única de las bacterias anaerobias, se usan CO del medio u otras moléculas de CO₂ se reducen a CO, usando ferredoxina reducida, por la enzima acetil-CoA sintasa/CO deshidrogenasa, que posteriormente, también combina el metilo de la proteína hierro-azufre-corrinoide, un intermediario de CoA y el grupo carbonilo para

formar el acetil-CoA. Este intermedio se metaboliza adicionalmente en acetato, produciendo un ATP en la reacción de acetato quinasa.⁵ Por lo tanto, no queda ATP fosforilado a nivel de sustrato para el crecimiento ni reacciones biosintéticas, por lo que los acetógenos obtienen energía adicional de los gradientes de iones, ya sea generados por el denominado complejo Rnf (una ferredoxina reducida: NAD⁺ oxidorreductasa, que produce un gradiente de protón o Na⁺) o el complejo Ech, que oxida la ferredoxina reducida, reduce los protones, produciendo H₂ y movilizandolos a través de la membrana citoplasmática.⁵

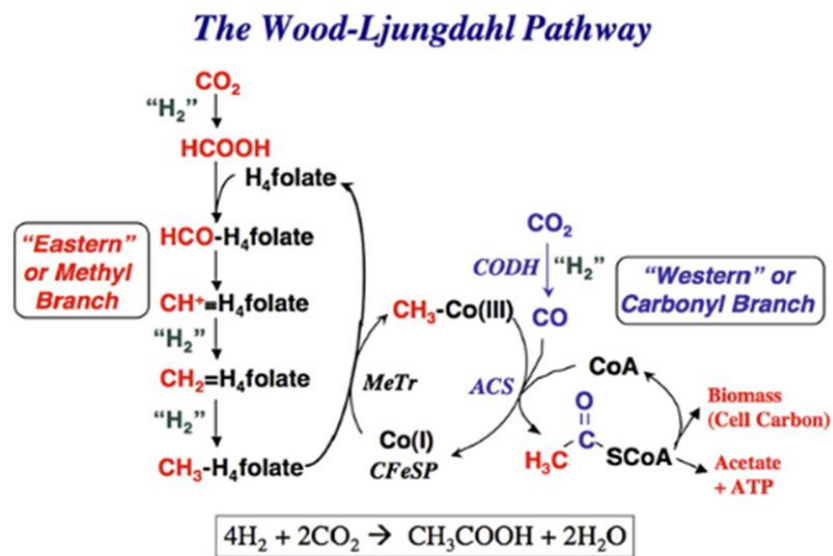


Figura 3: Ruta Wood-Ljungdahl para la fijación de CO₂¹²

En este estudio, no se usa el CO como única fuente de carbono y energía debido a que pocas bacterias pueden utilizar el CO como única fuente de carbono y energía, dado la inhibición del crecimiento debido a la sensibilidad de las metaloproteínas e hidrogenasas hacia el CO. Sin embargo, algunas bacterias sí que consiguen crecer con CO puro, aparte de crecer con CO₂ y H₂, e incluso pueden producir compuestos como el (bio)etanol, que se puede aprovechar como biocombustible.¹³ En estudios recientes se ha comprobado que algunos acetógenos usan electrones derivados de electrodos para reducir el CO₂ en compuestos orgánicos como acetato, formiato, fumarato, cafeína y 2-oxo-butirato. Este proceso recientemente estudiado, denominado electrostática microbiana, ofrece otra ruta para que los acetógenos recojan los electrones generados a partir de fuentes sostenibles para reducir el CO₂ en productos útiles de múltiples carbonos, como los biocombustibles.⁹

En resumen, el acetil-CoA generado mediante la vía Wood-Ljungdahl sirve como intermediario clave para la síntesis de la masa celular, así como producción de acetato, donde se usa el CO₂ como fuente de carbono el cual se fija al intermedio. Se observó que todas las bacterias acetogénicas producen acetato, con el fin de ganar energía a través de la fosforilación a nivel de sustrato (SLP) para compensar la energía invertida en la activación del formiato en la rama occidental de la vía reductora acetil-CoA.

En estudios anteriores con CO₂ y H₂ como sustrato, solo se ha observado acetato como producto principal, con pequeñas cantidades de etanol producidas en casos muy excepcionales, esto es debido a que la producción de etanol mediante acetil-CoA no puede ser llevada a cabo bajo condiciones autotróficas dado que el rendimiento de ATP es menor que el ATP requerido para producir acetil-CoA suficiente a partir de CO₂ y H₂.¹⁴

Los parámetros que se deben controlar en el estudio, para llevar a cabo el proceso de conversión y aprovechamiento de CO₂, son: la concentración adecuada de hierro de valencia cero, la temperatura y el pH del medio de fermentación, el potencial redox de los medios, la presión parcial del CO₂, la transferencia de masa y la composición de los gases usados.

1.4 Acetógenos

Los acetógenos (bacterias acetogénicas), son un grupo específico de bacterias capaces de utilizar un gas de efecto invernadero como el CO₂ para producir biomasa y ácido acético a través de la mencionada ruta Wood-Ljungdahl. La mayoría de acetógenos pertenecen a los géneros *Acetobacterium* y *Clostridium*.

En este estudio para los experimentos realizados se usan las bacterias *Acetobacterium woodii*, *Clostridium aceticum* y *Clostridium carboxidivorans*. En todos los experimentos se usa hierro de valencia cero para generar H₂, el cual es oxidado como un donador de electrones para reducir el CO₂ al grupo metilo y posteriormente formar el acetil-CoA. Estas bacterias anaerobias son homoacetogénicas y autotróficas, su fuente de energía y carbono son únicamente compuestos inorgánicos, en este caso, el CO₂.

1.4.1 *Acetobacterium woodii*

El microorganismo *Acetobacterium woodii* (DSM 1030)¹⁵, aislado en el año 1977 y completamente secuenciado hoy en día, es una bacteria anaerobia, autotrófica, no formadora de esporas, gram positiva, mesofílica (temperatura óptima de trabajo 30°C), con un pH óptimo de 7, de fermentación homoacetogénica y de tipo de cepa clasificada WB1 y ampliamente utilizada en distintos estudios anteriores (Figura 4).

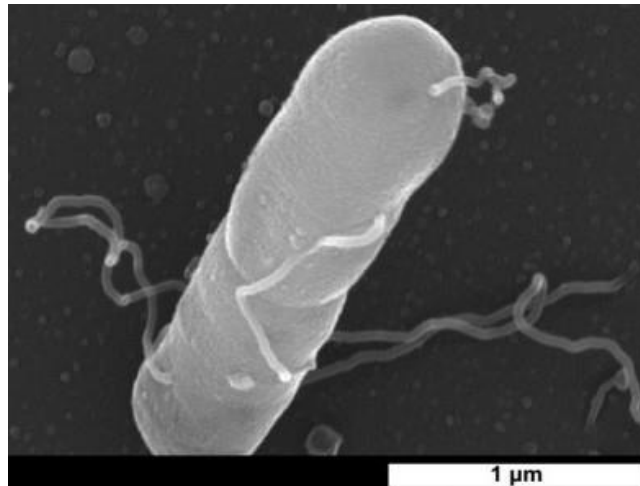


Figura 4: *Acetobacterium woodii*¹⁸

1.4.2 *Clostridium aceticum*

La bacteria *Clostridium aceticum* (DSM 1496)¹⁶, descubierta en el año 1947 aunque olvidada hasta ser redescubierta y estudiada años después alrededor de 1980, es una bacteria anaerobia, de crecimiento autotrófico y posteriormente descubierto en condiciones heterotróficas, formadora de esporas, mesofílica (temperatura óptima de trabajo 30°C), gram negativa, con un pH óptimo de 8,3, fermentación homoacetogénica y de tipo de cepa clasificada y utilizada en multitud de estudios anteriores (Figura 5).

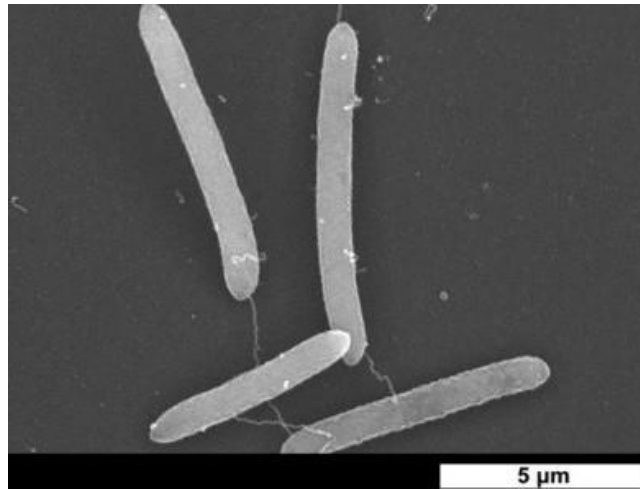


Figura 5: *Clostridium acetivum*¹⁸

1.4.3 *Clostridium carboxidivorans*

La bacteria *Clostridium carboxidivorans* (DSM 15243)¹⁷, aislada y estudiada por primera vez en 2005, es una bacteria anaerobia, de crecimiento en condiciones autotróficas y heterotróficas, formadora de esporas, mesofílica (temperatura óptima de trabajo 38°C), con un pH óptimo de 6,2, gram positiva, de tipo de cepa clasificada P7 y de fermentación acetogénica que puede formar tanto ácido acético como, en las condiciones adecuadas, etanol, butirato y butanol (Figura 6). Más recientemente, se descubrió que es también capaz de producir hexanoato y hexanol a partir de gases como el CO o el CO₂.¹⁹ Todos estos compuestos tienen un alto interés comercial.

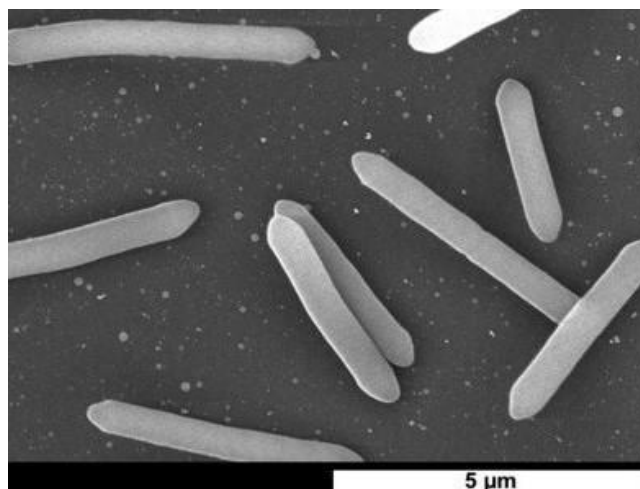


Figura 6: *Clostridium carboxidivorans*¹⁸

2. Objetivos

En este estudio, se pretende comprobar, en primer lugar, el efecto de la concentración de hierro de valencia cero (ZVI) para la generación de hidrógeno que reaccione con el dióxido de carbono y produzca ácido acético, usando, en el primer experimento, la bacteria *Acetobacterium woodii* crecida con fructosa como inóculo. Se decide crecer el inóculo con fructosa, para alcanzar una mayor concentración bacteriana, aunque posteriormente, el experimento, se realiza con CO₂. También se comprueba la variación a lo largo del experimento del pH, dependiendo de la concentración de ZVI y sus efectos, ajustando el pH inicial lo máximo posible al pH óptimo para el crecimiento de la bacteria.

En el segundo experimento, se pretende comprobar el efecto del pH en la bacteria *Clostridium aceticum*, con tres valores de pH iniciales diferentes, a una misma concentración de ZVI y con un mismo inóculo inicial crecido con fructosa.

En el tercer experimento, se pretende comprobar el efecto del pH en la bacteria *Clostridium aceticum*, a una misma concentración de ZVI, variando el inóculo inicial, el cual crece con monóxido de carbono, y aplicando una presurización inicial de 1,5 bar de dióxido de carbono en el experimento, comparando la producción de ácido acético final del segundo y tercer experimento.

Finalmente, en el cuarto experimento, se usan las bacterias *Clostridium aceticum* y *Clostridium carboxidivorans*, como inóculo, crecidas con monóxido de carbono, iniciando el experimento a un pH ajustado lo máximo posible al pH óptimo de crecimiento de cada bacteria. Se usa una misma concentración de ZVI y se varía el método de presurización, la cual se realiza periódicamente, presurizando 1 bar de dióxido de carbono cada cierto número de días en los recipientes de ambas bacterias, y se compara, por último, los resultados de la concentración de ácido acético obtenida en cada caso.

3. Antecedentes

Este novedoso estudio, no tiene precedentes conocidos en cuanto a la utilización de hierro de valencia cero para la generación de hidrógeno que reaccione con dióxido de carbono y forme ácido acético como producto final.

No obstante, hay algunos estudios previos en los que se aplica hidrógeno y dióxido de carbono iniciales para la producción de metano. Existen numerosos estudios con diversos tipos de bacterias anaerobias del género *Acetobacterium* y *Clostridium*, para realizar procesos de acetogénesis. Además de usar como materia prima para los procesos, gases de efecto invernadero derivados de la combustión, también existen estudios en los que se usa lignocelulosa a partir de biomasa vegetal, para la producción de biocombustibles, como el bioetanol, con este mismo grupo de bacterias acetogénicas.⁶

En cuanto a procesos de acetogénesis, con bacterias anaerobias, son diversos los estudios en los que a través de la ruta Wood-Ljungdahl, usando como fuente de carbono y energía CO o CO₂ y H₂ (syngas), se produce tanto ácido acético, como otros productos de alto valor añadido, así como etanol. Además de compuestos como este, algunas bacterias del género *Clostridium*. por ejemplo, la bacteria objeto de investigación en este estudio, *C. carboxidivorans*, producen alcoholes superiores con más carbonos como el butanol y hexanol, los cuales son productos interesantes como biocombustibles, que en un futuro puedan substituir a los combustibles fósiles, generados a partir de materia prima de un carbono, como el CO o CO₂, usando la ruta de Wood-Ljungdahl para metabolizar el CO, CO₂ o syngas.²⁰

De acuerdo a anteriores estudios, el uso de ZVI también favorece los procesos de metanogénesis, debido a la disminución del potencial de oxidación-reducción (ORP), y a pesar de que muchos estudios se han centrado en el tratamiento anaerobio de desechos o aguas residuales con la adición de ZVI, se han realizado algunos estudios también de conversión de CO₂ como fuente única de carbono en la producción de metano (CH₄) (o biogás) con uso de ZVI y con mezcla de cultivos anaerobios tanto como con desechos residuales anaerobios. Los metanógenos más usados en este tipo de estudios son los del género *Methanobacterium*. Los metanógenos hidrogenotróficos que existen en el lodo granular anaeróbico pueden usar H₂ como donante de electrones para la reducción de CO₂ a CH₄. Además, los homoacetógenos que también están presentes en el lodo granular pueden utilizar H₂ y CO₂ para la producción de ácido acético, pudiendo ser utilizado por los metanógenos acetoclásticos para la generación de biogás.¹⁰

4. Procedimiento experimental

En todos los experimentos realizados en este estudio, se siguen las mismas acciones mencionadas a continuación: preparación del medio, uso de recipientes (botellas de suero, que conforman los biorreactores a pequeña escala) para el medio de cultivo, aplicación de corriente de gas para generar el medio de crecimiento anaerobio con N₂, inoculación de la bacteria, toma de muestras, medición del pH y obtención de resultados de cromatografía de gases y líquidos para determinar la concentraciones de compuestos como el CO₂ y ácido acético.

4.1 Reactivos y preparación del medio del primer experimento

Todas las bacterias usadas en los experimentos de este estudio han sido adquiridas al instituto Leibniz DSMZ²¹, colección alemana de microorganismos y cultivos celulares GmbH, el cual proporciona las condiciones de cultivo de cada bacteria, con los reactivos que deben usarse para su óptimo crecimiento en condiciones anaerobias. No obstante, también pueden ser utilizados otros reactivos disponibles en algún caso de este estudio. En el primer experimento, las cantidades de reactivos dadas por el instituto Leibniz son para un volumen de trabajo de 1000 mL, por lo tanto, se han reajustado las cantidades de reactivos para el volumen de trabajo determinado como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1: Medio de cultivo para la bacteria *Acetobacterium woodii*²²

Reactivos	Volumen tomado por DMSZ (1000 mL)	Volumen de trabajo del experimento (200 mL)
NH ₄ Cl	1 g	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,33 g	0,066 g
K ₂ HPO ₄	0,45 g	0,09 g
Extracto de levadura	2 g	0,4 g
NaHCO ₃	10 g	2 g
L-cisteína-HCl · H ₂ O	0,5 g	0,1 g
Na ₂ S · 9 H ₂ O	0,5 g	0,1 g
Solución Na-resazurina	0,5 mL	0,1 mL
Sol. de elementos traza	2 mL	0,4 mL

También, el instituto Leibniz, proporciona los reactivos y cantidades de composición de la solución de elementos traza y la solución vitamínica.

Tabla 2: Composición de la solución de elementos traza²³

Reactivos de la solución de elementos traza	Cantidades dadas por DSMZ
Ácido nitrilotriacético	1,5 g
MgSO₄ · 7 H₂O	3 g
MnSO₄ · H₂O	0,5 g
NaCl	1 g
FeSO₄ · 7 H₂O	0,1 g
CoSO₄ · 7 H₂O	0,18 g
CaCl₂ · 2 H₂O	0,1 g
ZnSO₄ · 7 H₂O	0,18 g
CuSO₄ · 5 H₂O	0,01 g
KAl(SO₄)₂ · 12 H₂O	0,02 g
H₃BO₃	0,01 g
Na₂MoO₄ · 2 H₂O	0,01 g
NiCl₂ · 6 H₂O	0,03 g
Na₂SeO₃ · 5 H₂O	0,3 mg
Na₂WO₄ · 2 H₂O	0,4 mg
Agua destilada	1000 mL

Se indica en la preparación de esta solución que, en primer lugar, se disuelva el ácido nitrilotriacético y se ajuste el pH a 6,5 con KOH, luego se agreguen los minerales. Finalmente, se ajusta a pH 7.0 con KOH. A continuación, se muestra la composición de la solución vitamínica, la cual se prepara y se usa concentrada, por lo que la cantidad final que se añade a la botella en el medio de cultivo de las bacterias es de unas 4 o 5 gotas. La composición es la siguiente:

Tabla 3: Composición de la solución vitamínica²³

Reactivos de la solución vitamínica	Cantidades dadas por DSMZ
Biotina	2 mg
Ácido fólico	2 mg
Piridoxina-HCl	10 mg
Tiamina-HCl	5 mg
Riboflavina	5 mg
Ácido nicotínico	5 mg
D-Ca-pantotenato	5 mg
Vitamina B12	0,1 mg
Ácido p-aminobenzoico	5 mg
Ácido lipoico	5 mg
Agua destilada	1000 mL

Se prepara el medio de cultivo para un volumen de 200 mL, añadiendo a un matraz aforado todos los reactivos, menos $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, fructosa y la solución vitamínica, y se agita con un agitador magnético tras enrasar con agua destilada. La mezcla de reacción cambia de color amarillo, al añadir Na-resazurina, a color rosa pálido, ya que este es un indicador redox, no tóxico para las bacterias usadas, que se utiliza para controlar el potencial redox en los cultivos anaerobios. Al finalizar la agitación, se echa el volumen de 200 mL en 4 botellas cada una 20 mL y en 3 botellas cada una 40 mL. Se introducen todas las botellas en el autoclave durante 45 minutos, el cual somete al medio de cultivo a unas condiciones de alta temperatura y presión, con lo que permite eliminar cualquier microorganismo o degradar cualquier partícula que estuviese presente en el medio y pueda afectar a la bacteria del experimento, generando un medio estéril (de color amarillo pálido tras el autoclavado) apto para su posterior inoculación y crecimiento de la bacteria con H_2 y CO_2 . Posteriormente, dos de las botellas con 20 mL de medio, se someten a una corriente de nitrógeno durante un período de 5 minutos cada una, para generar un medio anaerobio dentro de ellas, y se cierran las botellas con un septum. Se añaden, en condiciones asépticas, los tres componentes que no son añadidos antes del autoclavado, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (el cual puede generar alguna reacción no deseada que formase un precipitado), fructosa (que puede generar una reacción no deseada) y la solución vitamínica (la cual puede degradarse y eliminarse).

Tabla 4: Reactivos añadidos después del proceso de autoclavado²²

Reactivos añadidos tras el autoclavado	DMSZ (1000 mL)	Botellas del experimento (200 mL)
D-Fructosa	10 g	2 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g	0,02 g
Solución vitamínica	1 mL	0,2 mL

Por último, se inocula la bacteria *A. woodii*, la cual se presenta en forma de gránulos liofilizados, inyectándola a las botellas de 20 mL, las cuales se dejan varios días para su crecimiento en una cámara de temperatura a 30°C dispuestas sobre un equipo de agitación a 150 rpm.

Después de dejar crecer la bacteria durante tres días en los dos botellas de 20 mL, se prepara el medio para inocularla en las botellas de 40 mL, cada una de estas con un volumen mayor actúan como un pequeño reactor, se inocula la bacteria y se reinicia su fase de crecimiento creando subcultivos. Se siguen los mismos procesos mencionados anteriormente, en condiciones asépticas, se añaden inyectando en el septum de la botella MgSO₄ · 7 H₂O, D-fructosa y la solución vitamínica, y se inocula la bacteria tomando 4 mL de las botellas de 20 mL, las cuales están inoculadas previamente, inyectándolo a las botellas de 40 mL de medio (Figura 7), y se llevan a la cámara de temperatura para dejar de nuevo durante varios días el proceso de crecimiento a 30°C.

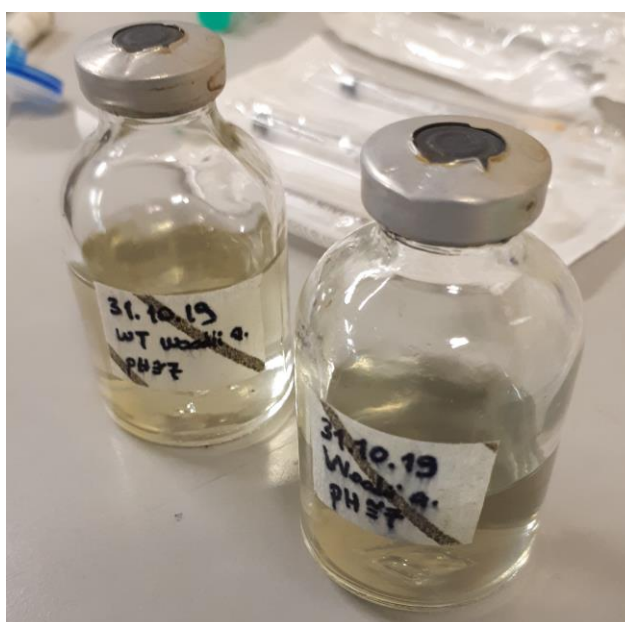


Figura 7: Botellas con subcultivos de la bacteria *A. woodii*²⁴

Para realizar el primer experimento se escogen las cantidades de concentración de hierro de valencia cero (ZVI) a las cuales se somete cada botella a la que se inocula la bacteria *A. woodii* en un volumen de 60 mL de medio de cultivo. En este caso, se comprueba el efecto del ZVI a unas concentraciones de: 25 g/L, 50 g/L, 100 g/L, 150 g/L y 200 g/L. Se prepara cada botella de suero por duplicado, por si hubiese algún error de preparación, alguna ruptura de una botella o contaminación. También se prepara una botella de control, y su respectivo duplicado, en la que se añade el medio de cultivo y se inocula la bacteria, pero sin ninguna cantidad de hierro de valencia cero para comparar en el proceso sin el efecto de este. Se calcula la cantidad de hierro de valencia cero para cada botella en el primer experimento con la bacteria *A. woodii*, resultando de la siguiente manera:

Tabla 5: Concentraciones de hierro de valencia cero estudiadas

Concentración de ZVI (g/L)	Cantidad ZVI por cada botella (g)
25	1,5
50	3
100	6
150	9
200	12

Se añade la cantidad de ZVI correspondiente para cada una de las 10 de las 12 botellas de este experimento (no se utiliza ZVI en las de control), se prepara el volumen necesario con los reactivos del medio de cultivo de la bacteria, como se trabaja esta vez con un volumen de 60 mL para cada botella, se necesita preparar un mínimo de 720 mL de medio de cultivo, por lo cual se ajusta la cantidad de los reactivos para un volumen de 1 L (ya que es el volumen de trabajo del matraz aforado disponible preparando la disolución en un único matraz y se prepara un volumen de reserva por si hay posibles pérdidas). Tras preparar y agitar el medio de cultivo, siguiendo los pasos anteriormente descritos, se echa 60 mL en cada una de las 12 botellas del experimento y se introduce el tiempo necesario en el autoclave. Posteriormente, se pasa una corriente de N₂ durante un tiempo de 5 minutos por cada botella, creando las condiciones anaerobias y controlando el pH, con un pH-metro al mismo tiempo que se pasa la corriente de gas, y ajustándolo al pH adecuado para el crecimiento de la bacteria, en este caso la *A. woodii* a un pH de 7. Se cierra la botella y se repite el proceso de adición de MgSO₄ · 7 H₂O, D-fructosa y solución vitamínica e inoculación de la bacteria desde las botellas de 40 mL

a las 12 botellas del experimento (añadiendo 6 mL en cada una de las 12 botellas ya que se considera un 10% del volumen al que se lleva la cantidad suficiente para el crecimiento de la bacteria), en condiciones asépticas, inyectando a través del septum.

Finalmente, se agregan dos vías a cada botella, que permiten la extracción de muestras introduciendo una jeringa en la vía, la cual dispone de una válvula de apertura y cierre, permitiendo o no el paso de gas y líquido, con lo que permite extraer las muestras sin pérdidas ni introducción de contaminación. Se introducen las botellas en la cámara de temperatura a 30°C y se dejan en el equipo de agitación a 150 rpm durante unos días para el crecimiento de la bacteria.

4.2 Reactivos y preparación del medio del segundo experimento

En el segundo experimento se utiliza la bacteria *Clostridium acetikum*, por lo cual se realiza el proceso de inoculación igual al anteriormente explicado para la bacteria *A. woodii*, en el cual se preparan 3 botellas de subcultivos, a partir de un cultivo de 40 mL en el que se ha inoculado la bacteria anteriormente, con 40 mL de volumen en las botellas de subcultivo y fructosa como sustrato. También se mantienen los mismos reactivos en el medio de cultivo, ajustando las cantidades para el volumen de trabajo y las necesidades del medio de cultivo de la bacteria.

En este experimento, se escoge la concentración de 25 g/L (el análisis del ZVI del experimento anterior consta en el apartado resultados obtenidos). Se busca estudiar el efecto del pH en la producción de H₂ y ácido acético en esta bacteria, por lo que se añade 1,5 g (25 g/L) de ZVI en cada botella (menos en las de control) con un volumen de 60 mL de medio de cultivo, variando el pH, lo que causa que se tenga que ajustar con una base o ácido (NaOH o HCl) durante el minuto final de la aplicación de la corriente de N₂ (tras preparar las muestras y antes del autoclavado). Se utiliza inicialmente los siguientes pH: 6,5; 7,25 y 8,00. Cada botella se prepara por duplicado, incluyendo la de control, la cual se prepara sin ZVI a un pH de 8,00.

Dado que se usan 8 botellas en este experimento con un volumen de medio cada una de 60 mL y se preparan 3 subcultivos cada uno de 40 mL, se necesita un volumen mínimo de 600 mL, pero para solventar posibles pérdidas en el trasvase del matraz a las botellas, se prepara un volumen de medio de la *C. acetikum* de 700 mL.

Tabla 6: Medio de cultivo para la bacteria *Clostridium aceticum*

Reactivos	Volumen de trabajo del experimento (700 mL)
NH₄Cl	0,14 g
KH₂PO₄	1,225 g
K₂HPO₄	5,915 g
Extracto de levadura	2,1 g
NaHCO₃	7 g
L-cisteína-HCl · H₂O	0,21 g
Na₂S · 9 H₂O	0,63 g
Solución Na-resazurina	0,7 mL
Sol. de elementos traza	1,4 mL

Tras tener el ZVI y el medio de reacción (60 mL) en las 8 botellas, se pasa la corriente de N₂ ajustando el pH y se introducen en el autoclave. Después de terminar el proceso se observa que se generan burbujas en las botellas, por lo que se toman muestras de gas para comprobar, mediante cromatografía de gases, si se genera H₂ en el proceso de autoclavado y este favorece la producción de H₂ en presencia del ZVI.

Posteriormente, se añade MgSO₄ · 7 H₂O y la solución vitamínica y se procede a la inoculación de la bacteria *C. aceticum*, la cual está previamente inoculada en una botella de subcultivo con fructosa, por lo que se inocula 6 mL de esta botella (con la bacteria en 40 mL de medio con fructosa como sustrato) en cada una de las 8 botellas con ZVI y 60 mL de medio de cultivo. Finalmente, se ponen las dos vías de toma de muestra de gas y líquido y se toman las muestras iniciales de pH y líquido. Se deja varios días que continúe el proceso de crecimiento de la bacteria y se toman los datos de pH, gas y líquido regularmente.

Tabla 7: Reactivos añadidos después del proceso de autoclavado

Reactivos añadidos tras el autoclavado	Botellas del experimento (700 mL)
D-fructosa	7 g
MgSO₄ · 7 H₂O	0,245 g
Solución vitamínica	0,14 mL

4.3 Reactivos y preparación del medio del tercer experimento

En el tercer experimento, se continúa usando la bacteria *Clostridium acetivum*, utilizando los mismos reactivos de medio de cultivo (Tabla 6), el mismo estudio de diferentes pH y la misma concentración (25 g/L) de ZVI y volumen de trabajo (60 mL cada una de las 8 botellas). La diferencia en este tercer experimento se establece en el uso del sustrato, el cual, en vez de la fructosa, es el monóxido de carbono.

Después de la preparación de las 8 botellas del experimento, con la cantidad necesaria de ZVI (1,5 g excepto las de control) y el volumen del medio (60 mL), se circula la corriente de N₂ durante 5 minutos, y después de esta, al momento se hace pasar otra corriente de CO₂ durante otros 5 minutos, ajustando el pH a los valores de estudio (6,5; 7,25 y 8), con lo cual tras cerrar las botellas queda en el medio el CO₂, proporcionado en esta segunda corriente, y se introducen las botellas cerradas en el autoclave. Se inocula como en los experimentos anteriores la bacteria, en condiciones asépticas, con el CO previamente en el medio de las botellas de subcultivo de la bacteria a partir de las cuales se inocula, y se agregan dos vías de extracción de muestras de gas y líquido. Se realiza un cambio con respecto a los experimentos anteriores, en este caso, con un manómetro introducido en la vía de gas se mide la presión de las 8 botellas, en las que, a continuación, se añade 1,5 bar de CO₂ a través de la vía del líquido, midiendo que entra la presión dicha con el manómetro. Con este cambio, se pretende comprobar si aumentando el CO₂ inicial del medio también se produce una mayor cantidad obtenida de ácido acético en los resultados del cromatógrafo de líquidos, respetando el proceso de crecimiento de la bacteria.

Se toman muestras de gas y líquido iniciales, cambiando el volumen tomado de gas a partir de este experimento, con lo cual, en vez de tomar 1 mL de gas como en los experimentos anteriores, en este caso se toman de 0,30 a 0,60 mL, según la presión interior de la botella, con el mecanismo nuevo de válvula de cierre y apertura en la jeringa extractora, más eficaz, con lo que se evita mayor consumo de gas y posible contaminación en la vía de gases. Los resultados obtenidos para los volúmenes de este y el siguiente experimento se extrapolan a un volumen de 1 mL, para comparar los datos con una misma referencia. Se llevan las 8 botellas a la cámara de temperatura a 30°C y se dejan en el equipo de agitación, para que la bacteria realice el proceso de crecimiento en los sucesivos días y tomar muestras de pH, gas y líquido regularmente.

4.4 Reactivos y preparación del medio del cuarto experimento

En el cuarto experimento, se utilizan las bacterias *Clostridium acetikum* y *Clostridium carboxidivorans*, en este caso se comprueba la producción de ácido acético al pH óptimo de la bacteria, con una concentración de ZVI de 25 g/L, con CO como sustrato aplicado con una corriente de gas de 5 minutos en las botellas de 40 mL de subcultivo preparadas anteriormente (a partir de un cultivo inicial de 40 mL de medio), con las que se inocula las botellas de trabajo de 60 mL, estableciendo la diferencia de que tras la aplicación de la corriente de N₂ no se aplica la corriente de CO₂ sino que se procede al autoclavado y posteriormente se presuriza cada botella con 1 bar de CO₂ inicial y, con el transcurso del tiempo del experimento cuando se observa que la presión es débil, también periódicamente se rellena las botellas hasta 1 bar de CO₂ de presión. Tanto para el caso de la bacteria *C. acetikum* como para la bacteria *C. carboxidivorans* se usa una botella con 25 g/L de ZVI, ajustada a su respectivo pH óptimo todo lo posible, junto con un duplicado y una única botella de control para cada una también ajustada a su respectivo pH óptimo. Por lo tanto, como cada botella usa 60 mL de volumen de medio se necesita mínimo un volumen de trabajo de 180 mL, con lo que finalmente se ajusta a 200 mL de volumen de medio de cultivo preparado para cada bacteria en este experimento.

Los reactivos que usan cada una de las bacterias para el volumen de trabajo dado son los siguientes:

Tabla 8: Medio de cultivo para la bacteria *Clostridium acetikum*

Reactivos de la bacteria <i>Clostridium acetikum</i>	Cantidades para un volumen de medio de cultivo de 200 mL
Extracto de levadura	0,6 g
NH₄Cl	0,04 g
KH₂PO₄	0,35 g
K₂HPO₄	1,69 g
NaHCO₃	2 g
Solución de trazas de metales	0,4 mL
Solución Na-resazurina	0,2 mL
L-cisteína-HCl · H₂O	0,06 g
Na₂S · 9 H₂O	0,18 g

Tabla 9: Reactivos añadidos después del proceso de autoclavado

Reactivos añadidos tras el autoclavado	Botellas del experimento (500 mL)
MgSO₄ · 7 H₂O	0,07 g
Solución vitamínica	0,12 mL

La bacteria *C. carboxidivorans* sigue el mismo proceso de inoculación, pero usa ciertos reactivos distintos como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 10: Medio de cultivo para la bacteria *Clostridium carboxidivorans*

Reactivos de la bacteria <i>Clostridium carboxidivorans</i>	Cantidades para un volumen de medio de cultivo de 200 mL
Extracto de levadura	0,2 g
NH₄Cl	0,5 g
NaCl	0,4 g
KH₂PO₄	0,05 g
KCl	0,05 g
CaCl₂ · 2 H₂O	0,0265 g
Solución de trazas de metales	2 mL
Solución Na-resazurina	0,2 mL
L-cisteína-HCl · H₂O	0,12 g

La solución vitamínica de esta bacteria también es diferente a las anteriores, usando una vitamina K1 etanol al 95% y esterilizada por filtración.

Tabla 11: Reactivos añadidos después del proceso de autoclavado

Reactivos añadidos tras el autoclavado	Botellas del experimento (500 mL)
MgSO₄ · 7 H₂O	0,205 g
Solución vitamínica	0,6 mL

En este experimento se toman y analizan muestras de pH, gas y líquido para cada botella siguiendo el mismo proceso que en el experimento anterior, siendo la única variación las presurizaciones periódicas cuando la presión de las botellas lo requiere.

4.5 Inoculación de la bacteria

En todos los experimentos de este estudio, se sigue el mismo proceso de inoculación de la bacteria correspondiente a la que se usa en cada uno de ellos. Inicialmente, se prepara un primer cultivo de la bacteria en una botella de suero con un volumen menor a las de toma de muestra del experimento, ya que esta es usada para el inicio del crecimiento y la realización de subcultivos. A esta botella se le añade todos los reactivos necesarios para el desarrollo de la bacteria, se hace pasar una corriente de N_2 durante 5 minutos para crear las condiciones anaerobias adecuadas²⁵ y, posteriormente, una corriente de CO (si este es el sustrato que va a ser usado como fuente para el crecimiento de la bacteria, como es el caso del tercer y cuarto experimento), se cierra herméticamente con un septum y sellos de aluminio y se introduce en el autoclave para esterilizar el medio de la botella e impedir cualquier posible contaminación.

Posteriormente, en la mesa de inoculación, la cual está preparada para generar condiciones de trabajo asépticas siendo esterilizada con etanol y contando con un mechero Bunsen para inyectar cerca de la llama que proporciona un área aséptica, se esteriliza (con una pequeña llama hecha con unas gotas de etanol) la parte superior de la botella (en la zona expuesta al aire del septum) para evitar introducir posible contaminación y se inyectan, cerca de la llama del mechero, con una jeringa, los reactivos restantes como $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, la solución vitamínica y la solución de fructosa (si es en este caso el sustrato que va a ser usado como fuente para el crecimiento de la bacteria, como es el caso del primer y segundo experimento). Tras tener el correspondiente medio de crecimiento de la bacteria preparado, se dispone a la inoculación de esta, la cual se inyecta, con una jeringa cerca de la llama del mechero, en la botella a partir de la muestra de gránulos liofilizados rehidratados. Después de dejar el inicio del proceso de crecimiento a la temperatura y agitación óptimas durante varios días, se realizan subcultivos de 40 mL de volumen de medio por cada botella, utilizando los reactivos, el sustrato (fructosa o CO) para el crecimiento del inóculo, las corrientes de gases y el autoclavado anteriormente mencionados y apropiados para cada bacteria. Se vuelve a preparar la mesa de inoculación y se añade a los subcultivos de 40 mL de medio un volumen, de la botella con la bacteria anteriormente inoculada, de aproximadamente el 10 % del volumen de medio de la nueva botella de subcultivo. Tras la inoculación de estos subcultivos se vuelve a dejar el proceso de crecimiento de la bacteria durante varios días en las condiciones adecuadas de temperatura y agitación.

Finalmente, para las botellas usadas en cada experimento para la producción de ácido acético de la bacteria, se repite la preparación del medio con las cantidades ajustadas al volumen de trabajo, las corrientes de gas, como N_2 , y en los casos necesarios la de CO_2 , y el proceso de autoclavado²⁶, el cual lleva un tiempo de entre 45 minutos y 1 hora dependiendo del volumen de las botellas a esterilizar en el equipo. Se vuelve a preparar la mesa de inoculación, se añaden los reactivos necesarios posteriores al autoclavado, y en condiciones asépticas se añade de las botellas de subcultivos de 40 mL la cantidad necesaria de bacteria para las botellas de producción de ácido acético, en este caso, se inyecta un volumen de 6 mL a cada una de las botellas usadas. Se introducen en el septum dos vías, una para gases y otra para líquidos, en cada botella de producción de cada experimento para la extracción sin introducir contaminación en el medio de la bacteria cada vez que se necesitan tomar muestras de gas y líquido o medir la presurización e introducir un volumen determinado de CO_2 . Por último, se dejan todas las botellas en la cámara de temperatura adecuada para su crecimiento y con la agitación necesaria.

5. Equipos y métodos de análisis

5.1 Medición de pH

En este estudio, se usa el control de pH para dos objetivos en los experimentos realizados. Uno de los objetivos es el ajuste del pH durante el paso de las corrientes de N_2 , CO o CO_2 , ya que se precisa iniciar el experimento al pH requerido de estudio o al pH óptimo para el crecimiento de la bacteria. El otro objetivo es controlar la variación de pH a medida que avanza el experimento, la bacteria crece, usa el ZVI, H_2 y CO_2 para formar ácido acético y esto modifica el pH del medio y aporta información del transcurso de las reacciones.

Durante el proceso de aplicación de corrientes de gases, se ajusta el pH midiéndolo con un pH-metro, Basic 20 (Figura 8), introduciendo el electrodo en la fase final de la corriente de gas y ajustando el pH con HCl, en caso de que necesite reducirse, o NaOH, en el caso de que necesite aumentarse. Para la medición de las muestras de líquido de cada botella, se toma 1 mL a través de la vía de extracción de líquido, se introduce en un Eppendorf y se mide el pH para su estudio.



Figura 8: pH-metro Basic 20²⁷

5.2 Análisis de muestras de líquido mediante HPLC

A través del análisis de muestras de líquido, se busca estudiar la concentración de fructosa, que se consume en el medio de reacción de los dos primeros experimentos, la concentración de ácido fórmico, debido a que las enzimas hidrogenasa y formiato deshidrogenasa pueden activarse con el uso de ZVI, para aceptar electrones y generar bajas concentraciones de ácido fórmico y H_2 , y, finalmente, para estudiar la producción de ácido acético en todos los experimentos.

Para este análisis se utiliza la cromatografía líquida de alta eficacia, con un sistema (Figura 9) HP 1100 (Agilent Co., USA), equipado con un con un detector de matriz de diodos (DAD) y un detector de índice de refracción (RID) a $50^{\circ}C$ para determinar las concentraciones de ácido acético. En este estudio se usa fundamentalmente el detector RID para registrar los resultados, mientras que el otro detector se usa para comparar los picos obtenidos en el cromatograma entre detectores en caso de dudas del producto obtenido por el tiempo de retención. Se utilizó una solución de H_2SO_4 0,005 M como fase móvil con un caudal de 0,800 ml / min. Se inyectaron muestras de 20 μ l en la columna Agilent Hi-Plex H (300 · 7,7 mm) a $45^{\circ}C$.²⁸

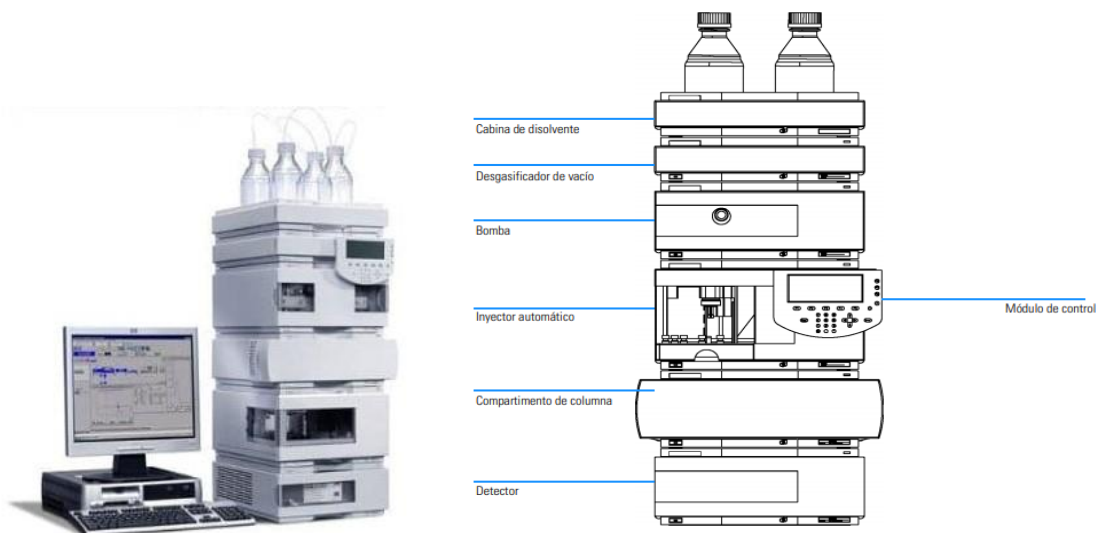


Figura 9: Equipo HPLC HP 1100²⁹

Las muestras son preparadas en la mesa de inoculación, en las que en condiciones asépticas aproximando la botella a la llama del mechero Bunsen, se extrae 1 mL de muestra a través de la vía de líquido. Esta muestra dispuesta en un Eppendorf se centrifuga con una centrifugadora ELMi Skyline Ltd CM-70M-07 a 7000 RPM²⁸ durante 5 minutos y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm PTF (Labbox, Barcelona, España) antes del análisis por HPLC.

5.3 Análisis de muestras de gas mediante GC

El análisis de las muestras de gas permite estudiar la variación de CO_2 y la formación de H_2 a lo largo del tiempo de duración de cada uno de los experimentos del estudio. Las muestras se toman con una jeringa de 1 mL a través de la vía de extracción de gas de cada botella. En los dos primeros experimentos el método es la toma de un volumen de 1 mL, pero para el tercer y cuarto experimento se mejora la técnica y se empieza a utilizar un mecanismo de cierre adaptado a la punta de la jeringa extractora, con el cual se permite tomar un volumen menor, evitar mayores posibilidades de pérdidas y riesgo de contaminación. El volumen menor de muestra tomado con su respectivo valor de concentración de H_2 o CO_2 se extrapola para un valor de 1 mL de muestra, por lo que se puede comparar los resultados con los experimentos anteriores. Los resultados obtenidos son dados en valores de área, los cuales se convierten a valores de concentración (mg/L) dividiendo el valor del área entre la pendiente de la recta de calibrado³⁰ tanto para la concentración de H_2 como la concentración de CO_2 .

Se usan dos sistemas de GC distintos para la obtención del área y posterior valor de concentración de H₂ y CO₂. En el caso del H₂, se utiliza un sistema (Figura 10) de cromatografía de gas HP 6890 (Agilent tecnologías, Madrid, España), equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). Este es el detector usado durante todo el estudio del que se obtienen todos los resultados. También está equipado con una columna HP-PLOT Molecular Sieve 5A de 15 metros (ID: 0,53 mm; espesor de película, 50 μm). La temperatura del horno se mantuvo inicialmente constante a 50°C, durante 5 minutos, y luego se elevó a 20°C / min, durante 2 minutos, para alcanzar una temperatura final de 90°C. La temperatura del puerto de inyección, donde se introduce la aguja de la jeringa de cada muestra, y del detector se mantuvo a 150°C. En el caso del CO₂, se utiliza un sistema (Figura 11) de cromatografía de gas HP 5890 (Agilent tecnologías, Madrid, España), equipado también con un detector TCD y con una columna Porapak Q 80/100 (inox) (2m · 1/8 "). Ambos sistemas usan el helio como gas portador. Las temperaturas del puerto de inyección, horno y detección se mantuvieron a 90, 25 y 100°C, respectivamente²⁸.



Figura 10: Sistema GC HP 6890²⁹



Figura 11: Sistema GC HP 5890²⁹

6. Resultados y discusión

Los resultados de este estudio, obtenidos periódicamente a medida que desarrollan el crecimiento las bacterias, tras iniciar los experimentos inoculando las correspondientes bacterias en las botellas con 60 mL de medio con su respectivo sustrato, se basan en la obtención y análisis de los siguientes parámetros: el pH, las concentraciones de fructosa, ácido fórmico y ácido acético obtenidas mediante la cromatografía líquida de alta eficacia y las concentraciones de hidrógeno y dióxido de carbono obtenidas mediante la cromatografía de gases.

6.1 Estudio del efecto del ZVI con la bacteria *A. woodii*

En este experimento se usa como sustrato la fructosa y para cada botella se procura ajustar el pH lo máximo posible a 7, el óptimo de la bacteria. Debido a la pérdida de una de las botellas de control se obtiene datos de una única en este experimento. Para realizar las gráficas de cada parámetro, se representan los puntos obtenidos a partir del valor medio (eje Y) de los valores de cada una de las dos botellas de cada concentración de ZVI, frente al tiempo (eje X) transcurrido del experimento.

También se determina la desviación estándar, representada por una línea vertical superior e inferior de la misma proporción en cada punto de cada serie, en la que los puntos del parámetro estudiado sean resultado de un valor medio (representado en el eje Y, por eso la línea solamente es vertical) de los valores de cada una de las dos botellas de cada concentración (o de cada pH en el segundo y tercer experimento).

Se observa (Figura 12) que a una mayor concentración de ZVI, mayor es el pH que se alcanza a medida que avanza el tiempo del experimento, lo cual es perjudicial para la bacteria, en este caso la *A. woodii*, que tiene un valor de pH óptimo de 7. Por lo tanto, la mayor actividad y crecimiento de la bacteria atendiendo al parámetro del pH se propicia con una concentración de 25 g/L.

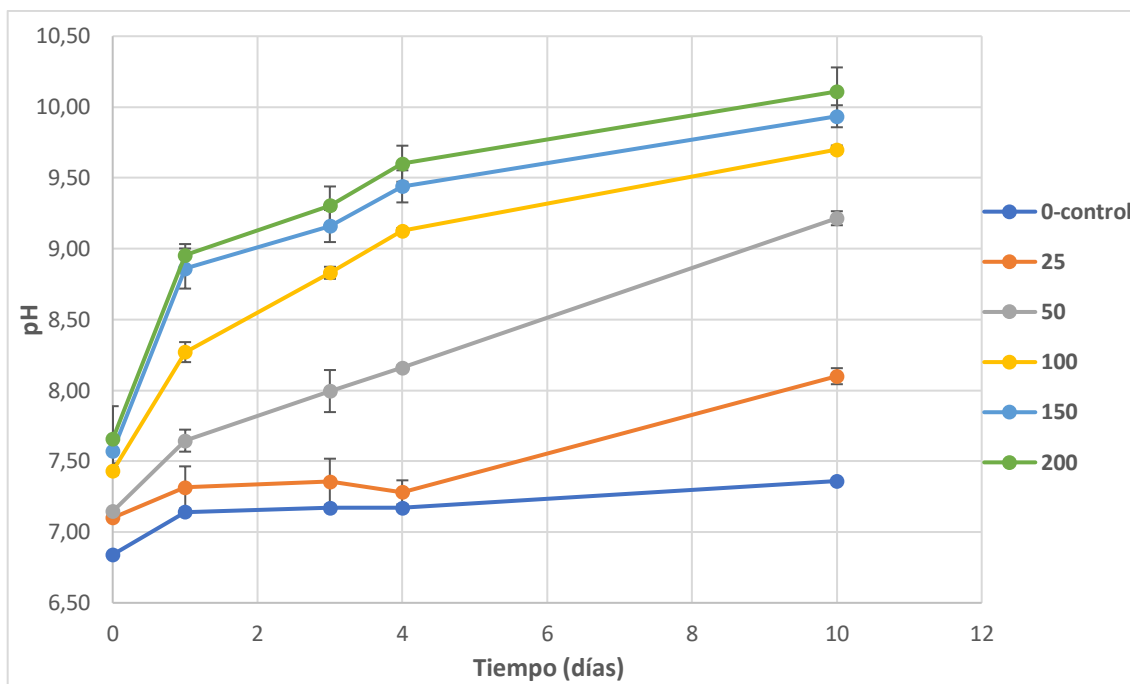


Figura 12: Gráfica de pH del primer experimento

Se observa (Figura 13) que a unas mayores concentraciones de ZVI se forma y no reacciona una mayor cantidad de ácido fórmico, lo cual se pretende evitar para obtener una mayor formación de ácido acético mediante la reacción de formiato en el proceso de la ruta Wood-Ljungdahl¹². Por lo tanto, observando los datos de este parámetro la concentración más propicia de ZVI es de 25 g/L.

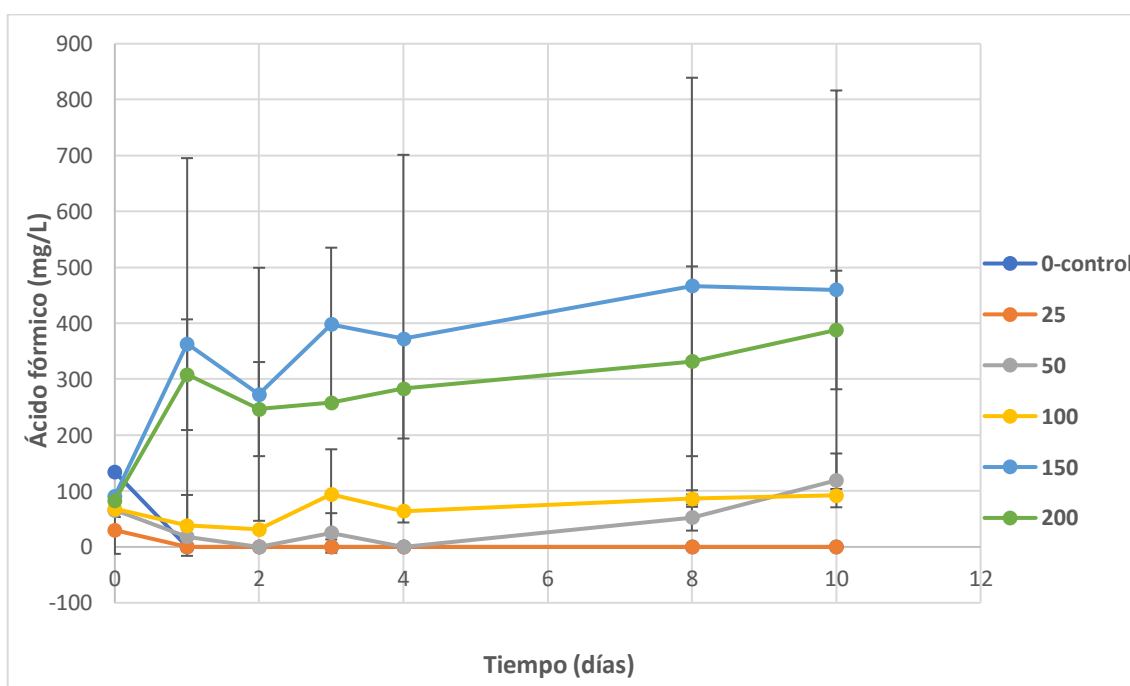


Figura 13: Gráfica de producción de ácido fórmico del primer experimento

En este caso, para el tiempo transcurrido de este experimento, se observa (Figura 14) una mayor concentración de ácido acético usando una concentración de 50 g/L de ZVI, seguido por las concentraciones de 150 g/L y 25 g/L muy próximas entre ellas como se puede observar en el rango de la desviación estándar, pero teniendo en cuenta los parámetros anteriormente observados, la concentración de 25 g/L de ZVI es la que mantiene un pH más cercano al óptimo para el desarrollo y producción de la bacteria durante un mayor tiempo de experimento, sin generar concentraciones de ácido fórmico considerables (de formiato que no reacciona en el proceso de formación de acetato) y manteniendo una cantidad de producción de ácido acético de las más elevadas, con la posibilidad de incrementarse más en el tiempo que la concentración de 50 g/L, ya que mantiene un pH más cercano al óptimo de la bacteria. También se observa que la concentración de ácido acético en la botella de control es prácticamente igual al final del experimento que la concentración inicial, lo cual indica que sin el hierro de valencia cero no transcurre de la manera deseada el proceso de la ruta Wood-Ljungdahl para la producción de H₂ como fuente de electrones y, posteriormente, de ácido acético.

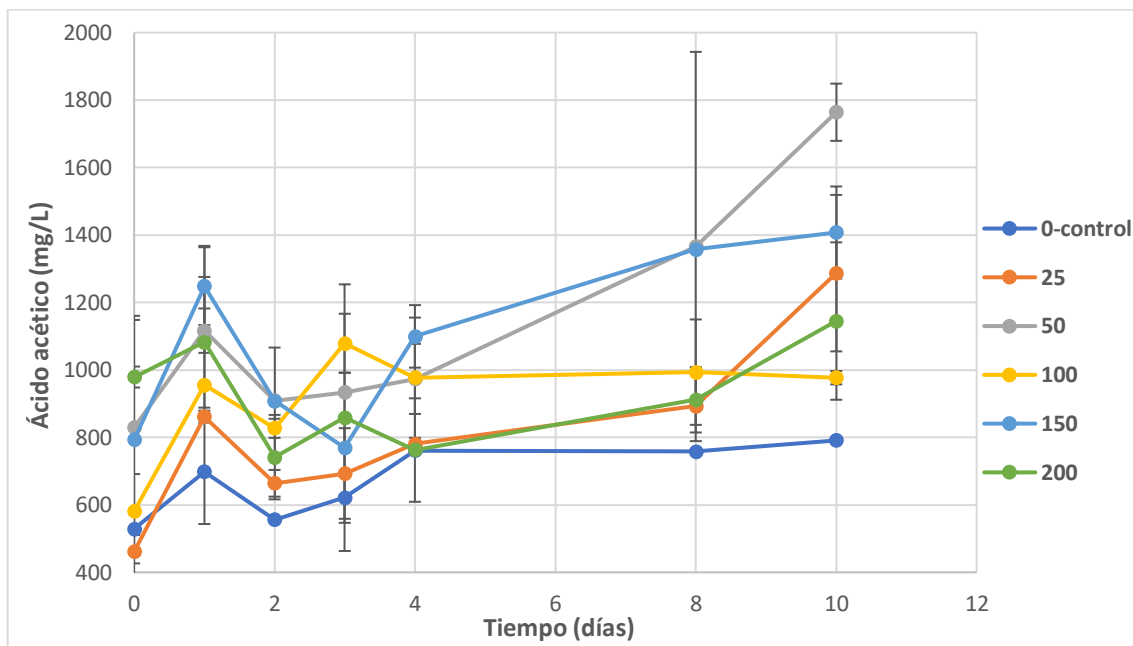


Figura 14: Gráfica de producción de ácido acético del primer experimento

Se observa (tabla 12 y tabla 13) que a una mayor cantidad usada de ZVI, mayor es la producción de hidrógeno para la reacción con dióxido de carbono, además sin el uso de este no se produce H₂ en el medio tal y como se observa en los resultados sin uso de ZVI de la botella de control. También se observa que se consume toda la fructosa inicial aportada al medio, por lo que no se puede determinar exactamente si la formación de ácido acético es a partir de este sustrato o proporcionada por el H₂/CO₂.

Finalmente, se comprueba como sin el uso de ZVI el CO₂ del medio no se consume para producir ácido acético y en el resto de casos el H₂ que se produce reacciona con el CO₂ del medio consumiéndose ambos para la obtención (en parte o totalmente) de ácido acético y, como se observa, salvo en el caso de las botellas con 25 g/L de ZVI, también se producen ciertas cantidades de ácido fórmico, siendo mayores cuanto más elevada es la concentración de ZVI (sobre todo las cantidades más elevadas se producen a 150 g/L y 200 g/L de ZVI). Por lo tanto, para un uso más productivo de la bacteria a un pH óptimo, con la menor producción de ácido fórmico y mejor producción de ácido acético posible, a partir de H₂ y CO₂, se usa en los posteriores experimentos una concentración de ZVI de 25 g/L.

Tabla 12: Resultados fructosa y GC del primer experimento día inicial.

ZVI de la botella (g/L)	Tiempo (días)	Fructosa (mg/L)	H ₂ (mg/L)
0 - control	0	589	0
25 (media)	0	471	9,75
50 (media)	0	983	25,69
100 (media)	0	640,5	34,35
150 (media)	0	908	42,67
200 (media)	0	1183	39,26

Tabla 13: Resultados de fructosa y GC del primer experimento día final.

ZVI de la botella (g/L)	Tiempo (días)	Fructosa (mg/L)	H ₂ (mg/L)	CO ₂ (mg/L)
0 - control	10	0	0	1133,38
25 (media)	10	0	0	0
50 (media)	10	0	0	0
100 (media)	10	0	6,6	6,13
150 (media)	10	0	31,42	1,46
200 (media)	10	0	49	0

6.2 Estudio de la producción de ácido acético a partir de CO₂ con la bacteria *C. aceticum*, creciendo el inóculo con fructosa

En este experimento se continúa usando fructosa como sustrato para el desarrollo de la bacteria, con una concentración de ZVI de 25 g/L en cada botella (menos las de control). Se estudia el efecto del pH ajustando a tres pH distintos: 6,5; 7,25 y 8 (a pH 8 tanto las botellas con y sin ZVI).

Como se observa (Figura 15) no se ha podido estudiar el efecto del pH de la manera deseada en este experimento, ya que a lo largo del tiempo se han mantenido valores próximos entre las botellas con distintos valores iniciales ajustados lo máximo posible a los 3 pH de trabajo, pero modificados y próximos desde el inicio debido al CO₂ solubilizado que reacciona en el medio. Los tres pH de trabajo con ZVI alcanzan el pH óptimo de la bacteria (pH: 8,3), excepto las botellas de control sin ZVI en las que el pH no varía prácticamente del inicial al final.

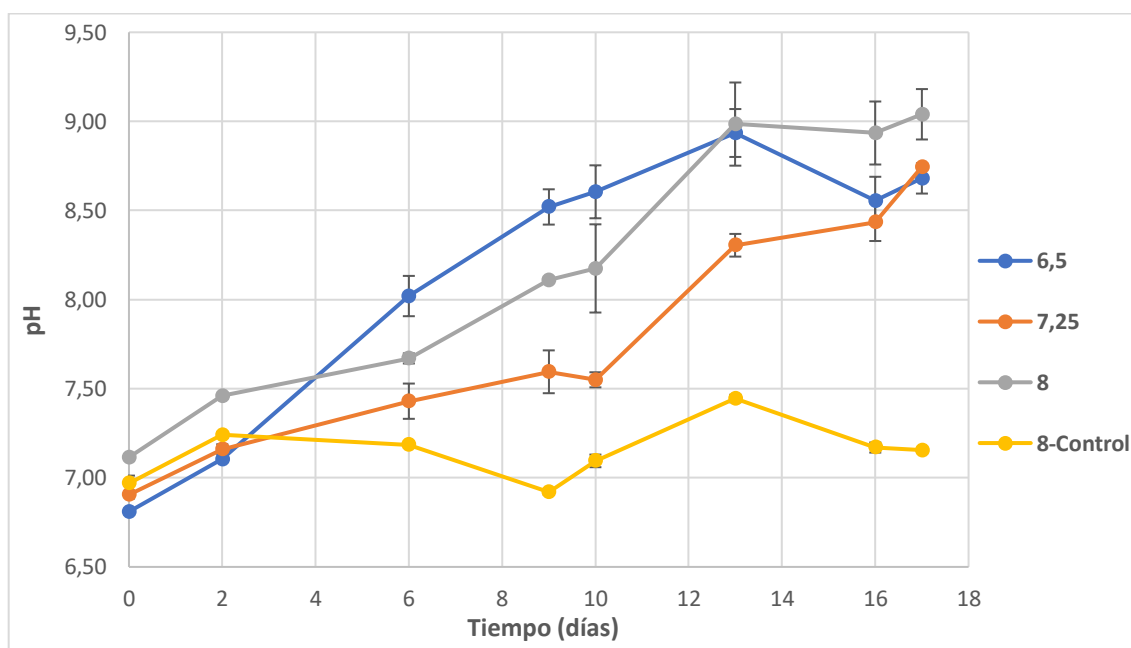


Figura 15: Gráfica de pH del segundo experimento

En cuanto a la fructosa (Figura 16) inyectada al medio, inicialmente se dispone de una concentración de aproximadamente 400 mg/L en cada una de las botellas de trabajo. Se observa que se consume en su totalidad para las botellas que contienen ZVI, es decir, en las que transcurre la formación de H₂ para su reacción con CO₂, pero no se puede determinar si la fuente de carbono para la formación de ácido acético ha sido la fructosa o el H₂/CO₂.

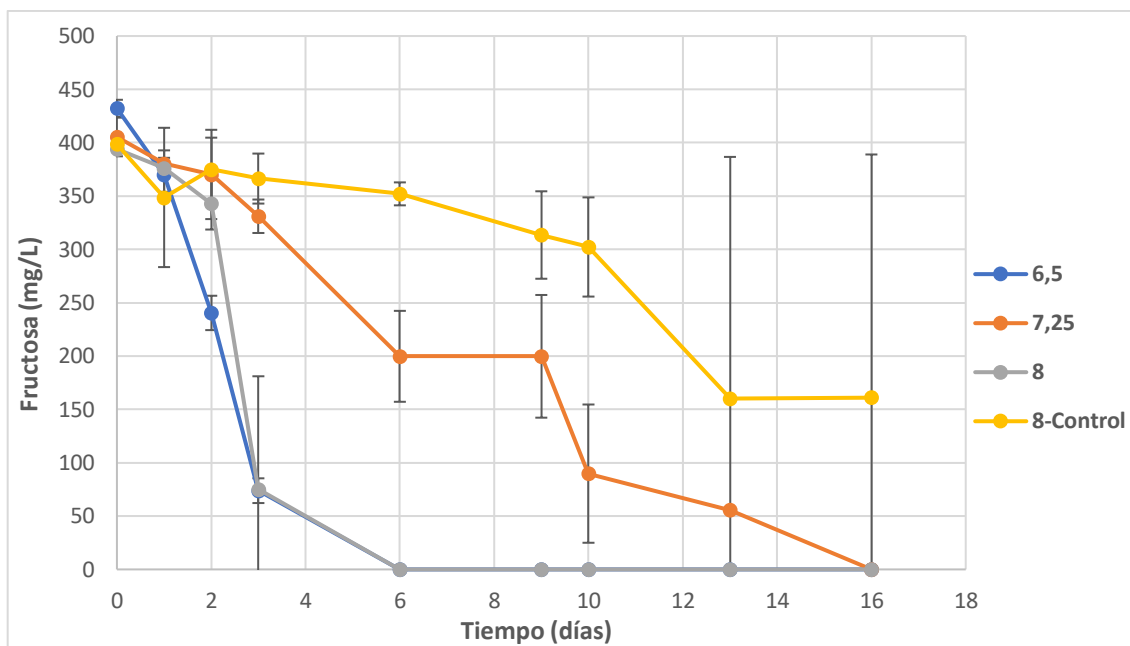


Figura 16: Gráfica de fructosa del segundo experimento

El ácido fórmico, como se observa (Figura 17), parte de una concentración inicial generada por los reactivos del medio, de entre 120 y 150 mg/L, y al final del experimento todo el ácido fórmico ha reaccionado y se ha consumido.

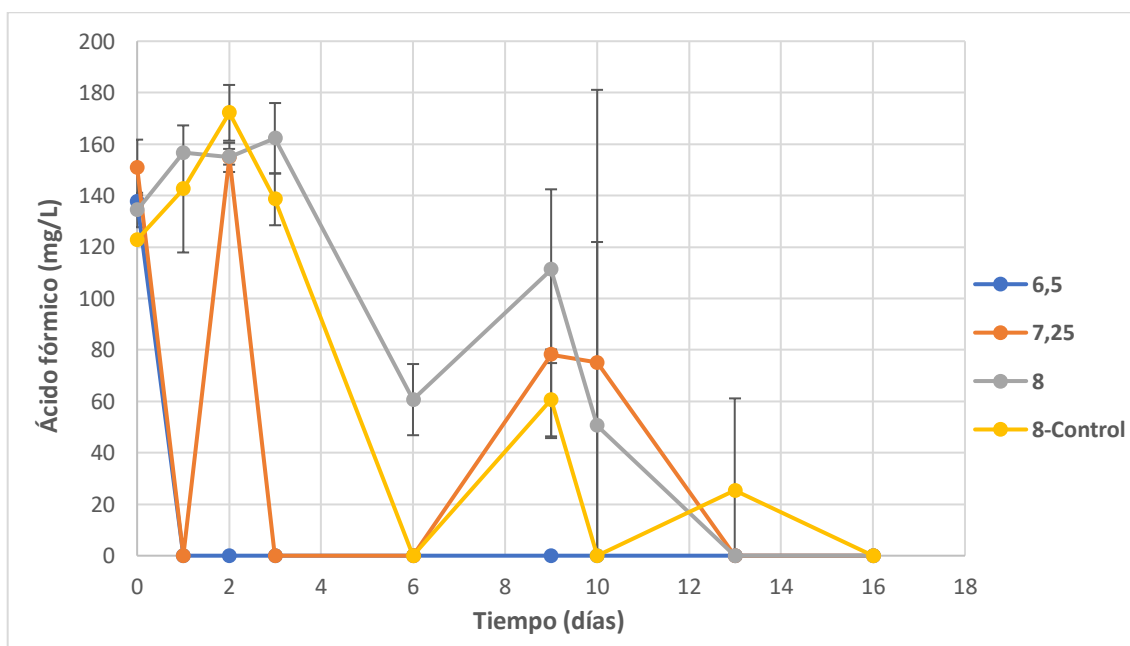


Figura 17: Gráfica de producción de ácido fórmico del segundo experimento

En este experimento, la concentración máxima de ácido acético (Figura 18) con un rango bajo de desviación estándar, es de 1817,27 mg/L de media, la cual se alcanza en las botellas con un pH inicial de 6,5 en el cual se ha generado una mayor concentración de H₂ (Figura 19) y ha consumido en menos tiempo todo el CO₂ en el medio (Figura 20).

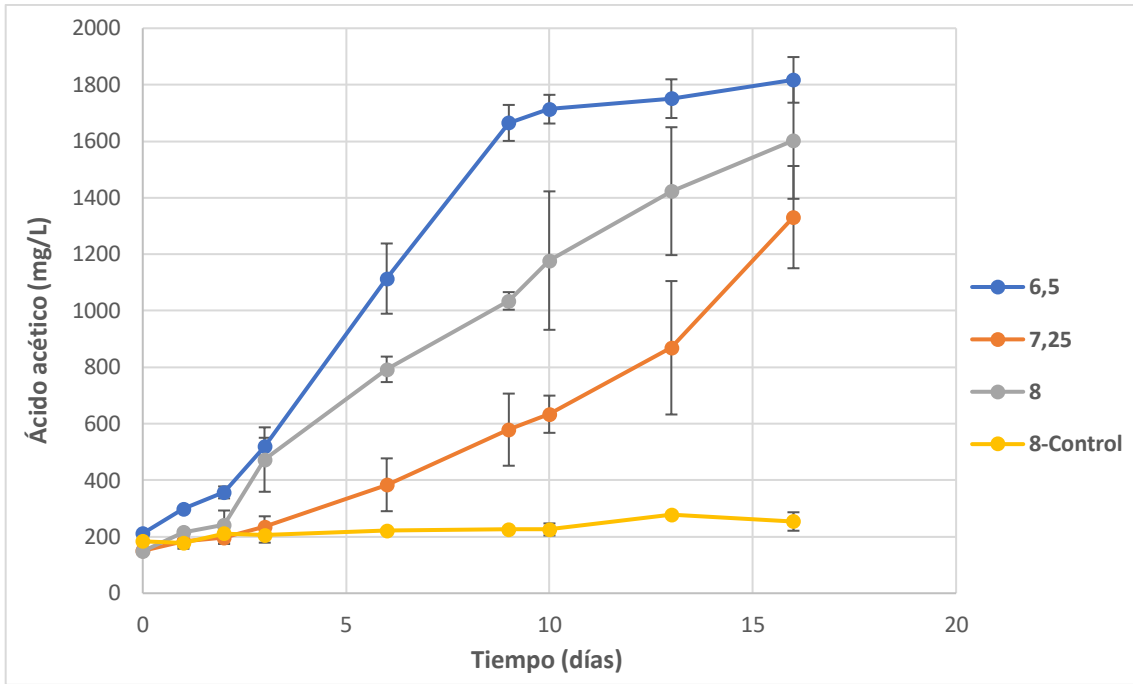


Figura 18: Gráfica de producción de ácido acético del segundo experimento

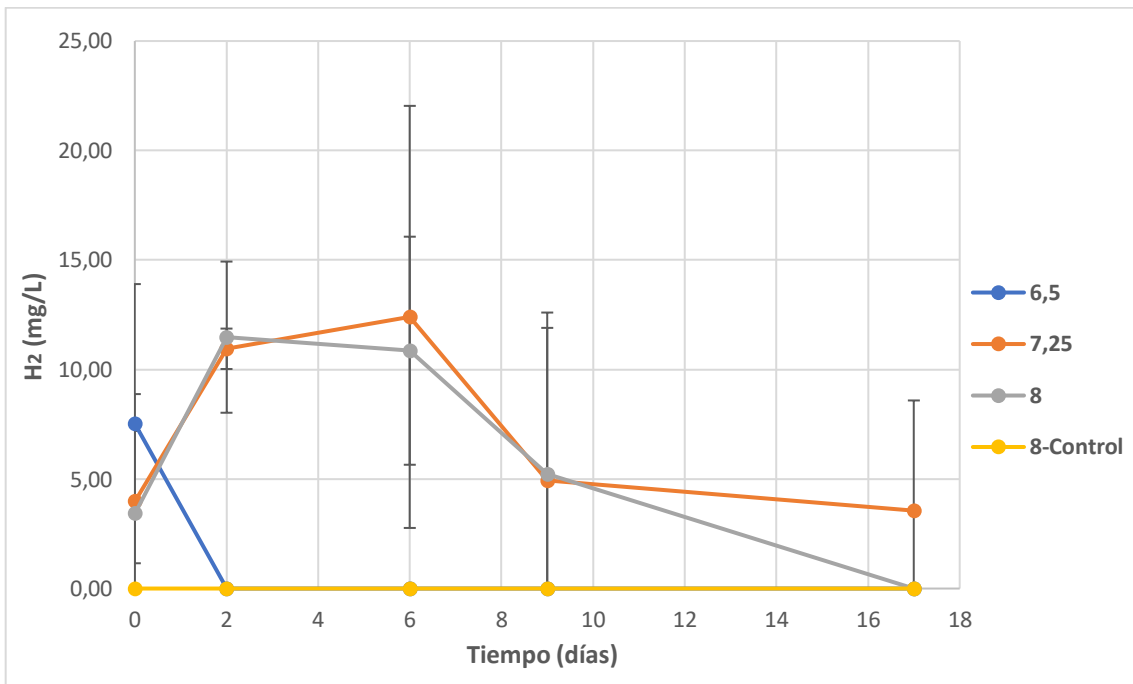


Figura 19: Gráfica de H₂ del segundo experimento

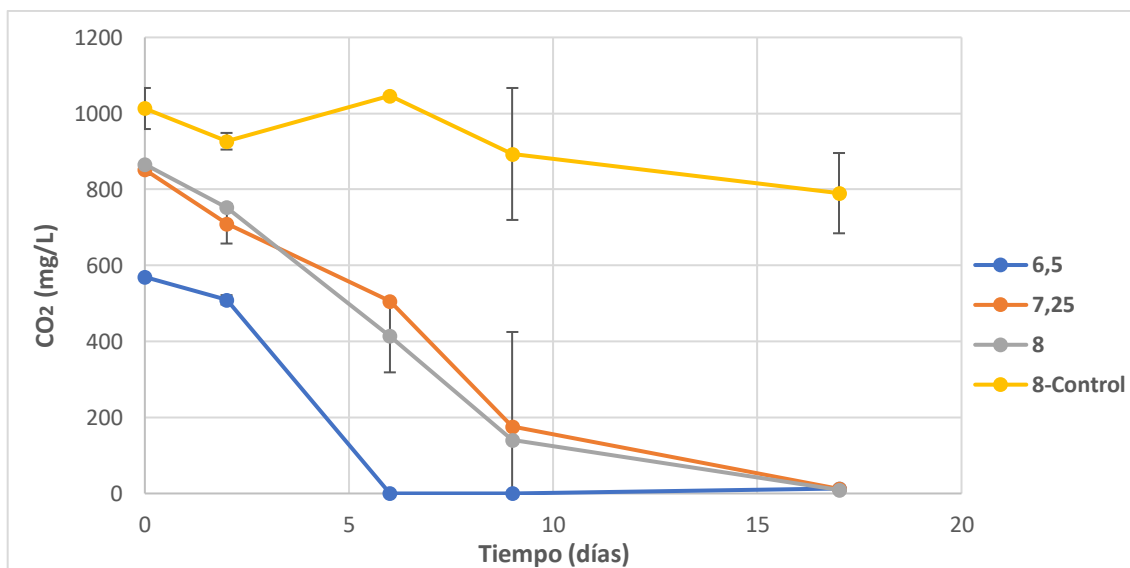


Figura 20: Gráfica de CO₂ del segundo experimento

6.3 Estudio de la producción de ácido acético a partir de CO₂ con la bacteria *C. aceticum*, creciendo el inóculo con CO

En este tercer experimento se usa también la bacteria *C. aceticum* con un nuevo sustrato para el crecimiento del inóculo, el monóxido de carbono, evitando así la presencia de fructosa en el experimento. La concentración de ZVI usada sigue siendo de 25 g/L. En este caso se presuriza inicialmente las botellas con 1,5 bar de CO₂ medidos con un manómetro.

Debido a la corriente de CO₂ aplicada inicialmente en el medio y la posterior presurización, se dificulta el control del pH en el tiempo y el ajuste inicial del pH de trabajo, ya que el CO₂ al solubilizarse en el medio genera la disminución de pH (aproximadamente 1 unidad presurizando 1 bar), tal y como se puede comprobar (Figura 21) también en la disminución de pH, de las botellas de pH inicial 8, en los días 12 y 13 debido a la presurización de 1 bar de CO₂, realizada el día 12 de experimento en estas botellas, por falta de presión para la toma de muestras de GC.

Una de las botellas de pH inicial 8, antes de la presurización de 1 bar de CO₂ a ambas botellas el día 12, se ajusta aumentando su valor de pH en una unidad para comprobar si produce más H₂ con el pH más cercano al óptimo de la bacteria, lo que genera una gran variación en el rango de la desviación estándar del pH para esta serie entre los días 7 y 12.

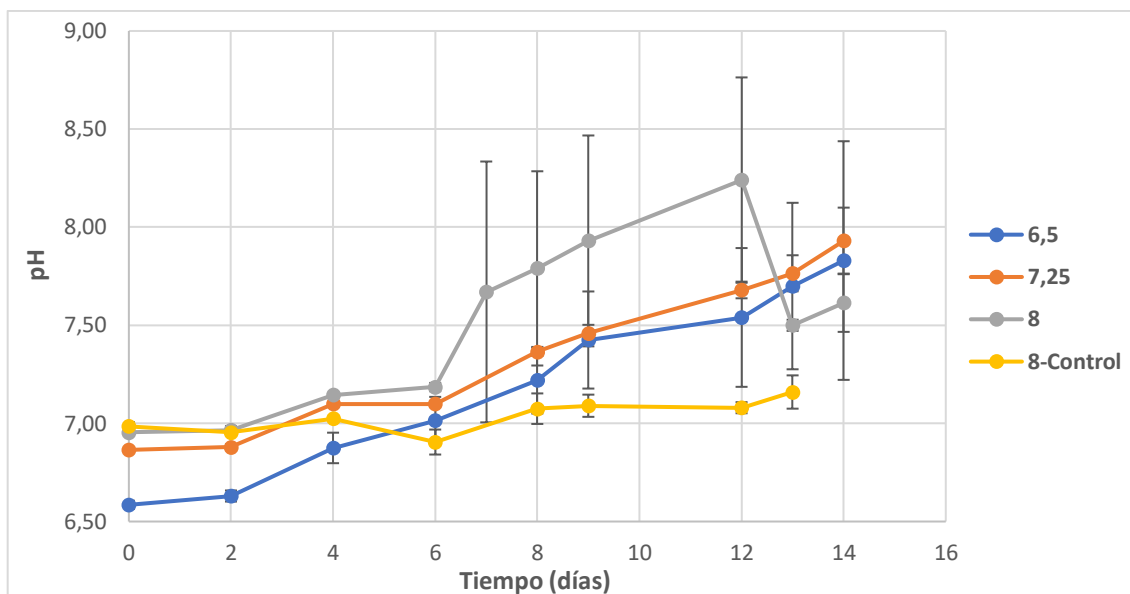


Figura 21: Gráfica de pH del tercer experimento

El ácido fórmico (Figura 22) de concentración inicial en las botellas del experimento de entre 125 y 140 mg/L, reacciona y se consume completamente en el caso de las botellas de pH inicial 8 y 7,25, y en el caso de las botellas de pH inicial 6,5 se consume en la botella que si produce ácido acético, a partir del día en el que se aprecia un gran rango de desviación estándar, ya que en la otra botella se mantiene la concentración.

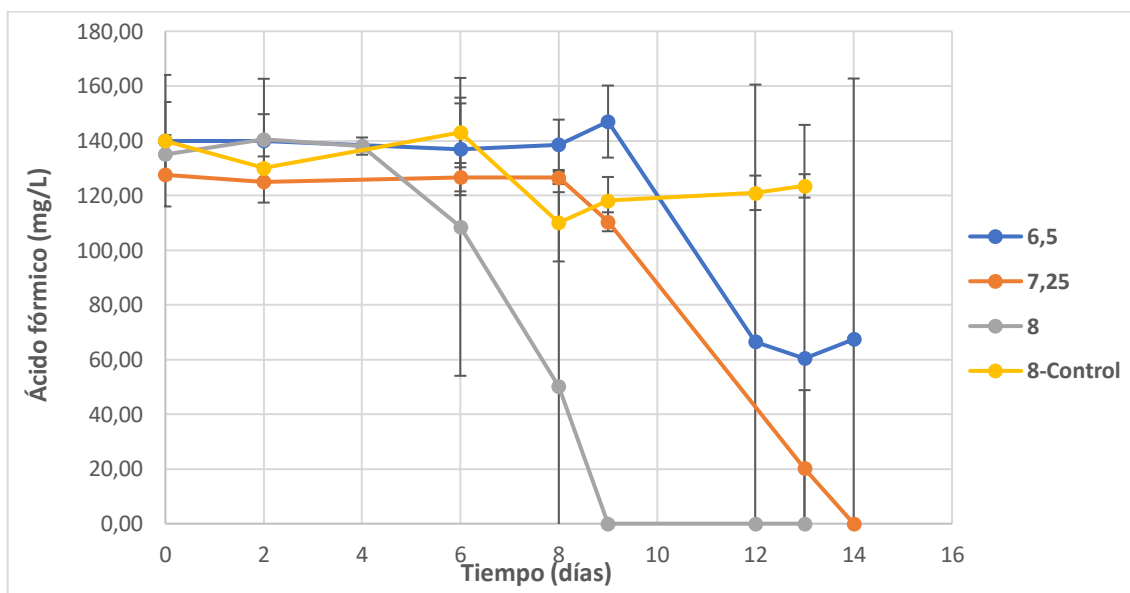


Figura 22: Gráfica de producción de ácido fórmico del tercer experimento

Se obtiene (Figura 23) una concentración máxima de ácido acético de 1178,34 mg/L, en la botella de pH inicial 8 en la que no se ajustó el pH el día 7, ya que la concentración de ácido acético de la botella ajustada el día 7, empezó a decrecer en el día 14, siendo su máxima concentración, de 918,52 mg/L, alcanzada el día 13.

También se observa que una de las botellas de pH 6,5, no ha producido ácido acético en este experimento, debido a esto se obtienen rangos altos de desviación estándar, ya que la otra botella a este pH sí produce, por lo que en una de las botellas la bacteria se consiguió desarrollar y en la otra botella aparentemente esto no sucedió. Esto puede ser debido a la entrada de oxígeno en la botella (e injerencia en el medio de la bacteria), ya que después de la aplicación de las corrientes de gas se apreció un cambio de color a rosa pálido en la botella, característico de la presencia de oxígeno, con lo que se inhibiría la bacteria que precisa de condiciones anaerobias para su desarrollo.

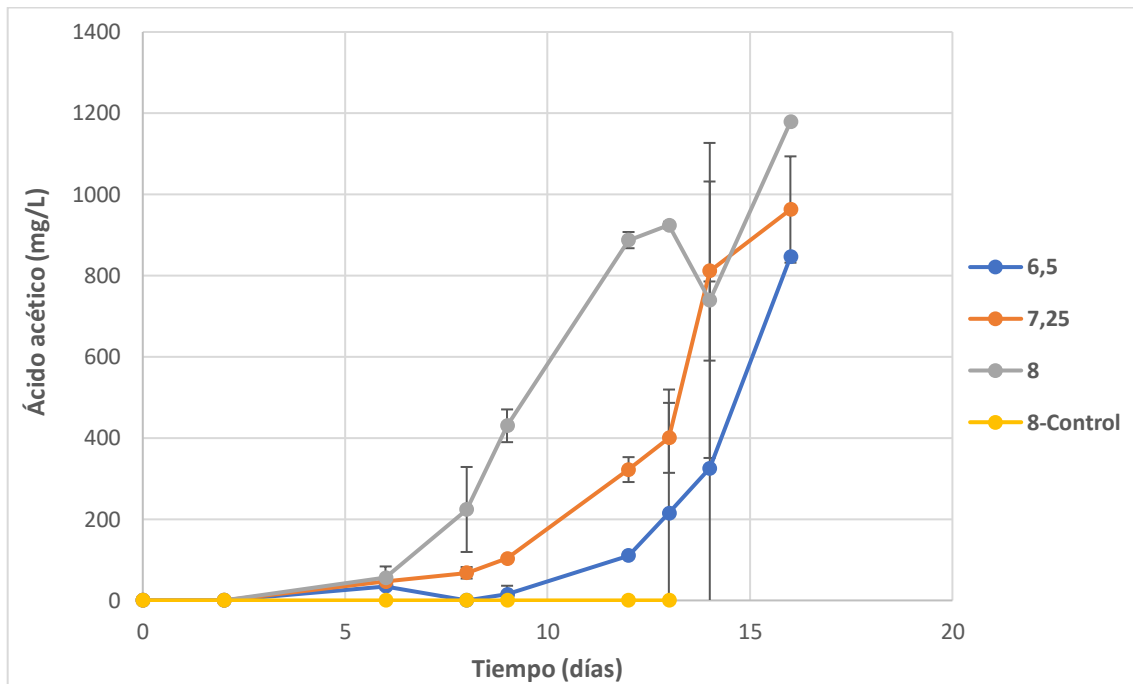


Figura 23: Gráfica de producción de ácido acético del tercer experimento

Como se puede observar (Figura 24), las botellas de pH inicial 6,5 acumulan una mayor cantidad de hidrógeno, siendo consumido en los días finales de experimento, por las bacterias de una de las botellas de pH 6,5, como se observa en el gran rango de desviación estándar del último punto, ya que en la otra se produce hidrógeno, pero no es consumido en ningún momento como si sucede en la otra botella en la que se produce ácido acético. No obstante, tanto las botellas de pH inicial 7,25 y 8 con menos cantidad formada consumen más hidrógeno que las de pH 6,5. En el caso de las botellas de control no se produce hidrógeno como en los anteriores experimentos.

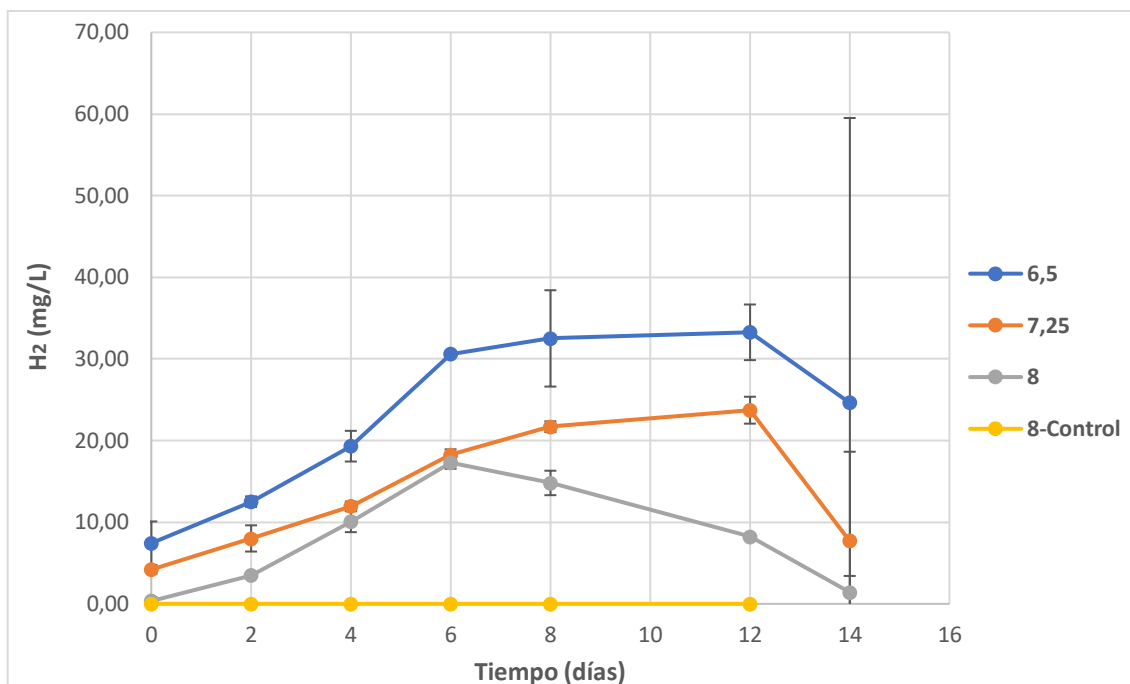


Figura 24: Gráfica de H₂ del tercer experimento

En este experimento, no se usa fructosa como sustrato sino CO, por lo que se puede decir que todo el ácido acético formado viene de la reacción H₂/CO₂, con lo que se observa (Figura 25) que todo el CO₂ entre 700 y 900 mg/L se transforma en ácido acético, llegando a consumirse completamente para el caso de las botellas de pH inicial 8, con lo que tras la presurización del día 12 y el repunte de CO₂, la bacteria podría usar de nuevo más CO₂ para continuar produciendo más ácido acético.

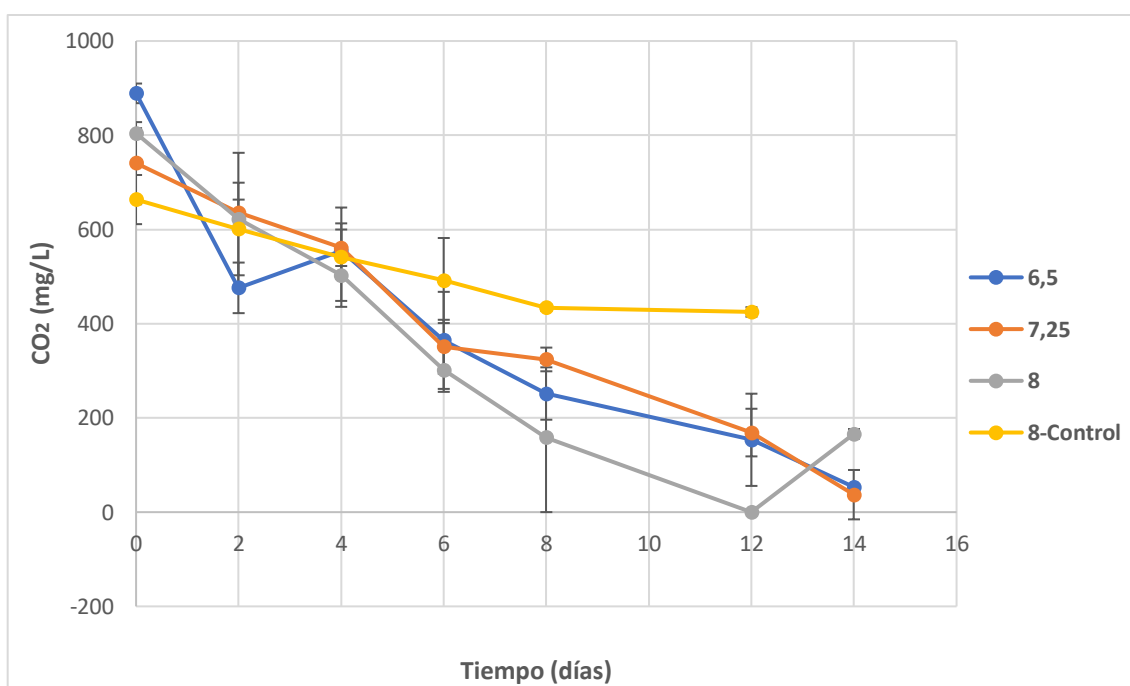


Figura 25: Gráfica de CO₂ del tercer experimento

6.4 Estudio de la producción de ácido acético a partir de CO₂ con las bacterias *C. acetium* y *C. carboxidivorans*, creciendo el inóculo con CO

En este experimento se usan las bacterias *C. acetium* y *C. carboxidivorans* para estudiar la producción de ácido acético a partir de CO₂, con CO como sustrato para el crecimiento del inóculo de ambas bacterias. Se continúa usando una concentración de 25 g/L de ZVI en ambos casos. Se preparan 2 botellas con cada una de las bacterias con esta concentración de ZVI y una de control para cada bacteria. En la preparación del experimento se aplicó una corriente de nitrógeno para generar el medio anaerobio en cada botella, aunque en este caso no se pasó a continuación una corriente de CO₂ en el medio, para evitar la formación de hidrógeno (dado que a menor pH mayor es su formación) previa al autoclavado y para la posterior presurización con CO₂ con mayor facilidad sin la presión del hidrógeno durante el proceso. Por lo tanto, tras la aplicación de la corriente de N₂ el pH aumenta a 8,5, se introducen las botellas en el autoclave y posteriormente se presurizan con 1 bar de CO₂, lo que reduce el pH aproximadamente 1 unidad. Tras dejar pasar un día para la solubilización del CO₂ en el medio, se obtiene un pH de 7,5, bueno inicialmente para la inoculación de las botellas con *C. acetium*, y en las botellas en las que se inocula la bacteria *C. carboxidivorans*, se ajusta el pH con ácido para generar un pH inicial más cercano al óptimo de aproximadamente 6.

En cada gráfica realizada, de los resultados de este experimento, se representan los valores correspondientes del parámetro para cada botella analizada frente al tiempo transcurrido en el experimento. Además de la presurización inicial de CO₂, a lo largo del experimento se presuriza de nuevo hasta 1 bar de CO₂ cada botella cuando se observa una presión muy baja en estas en el momento de toma de muestra de GC, llegando a realizar esta presurización tres veces más después de la inicial, las cuales se pueden observar en cada gráfica de este experimento representadas por líneas rojas, verticales y discontinuas en el día en el que se realizó la presurización de todas las botellas.

Se observa (Figura 26) que el pH de las botellas de *C. acetium* con ZVI se mantiene entre 7 y 8, con valores muy próximos en cada punto de ambas botellas con ZVI, reduciéndose entre 0,5 y 1 unidad con cada presurización de CO₂. Este rango de variación sin superar el pH 8 favorece la producción de H₂ manteniendo un pH adecuado para el desarrollo de la bacteria. En el caso de la botella de control, el pH no alcanza los valores de las botellas en las que si se produce H₂ que reacciona con CO₂.

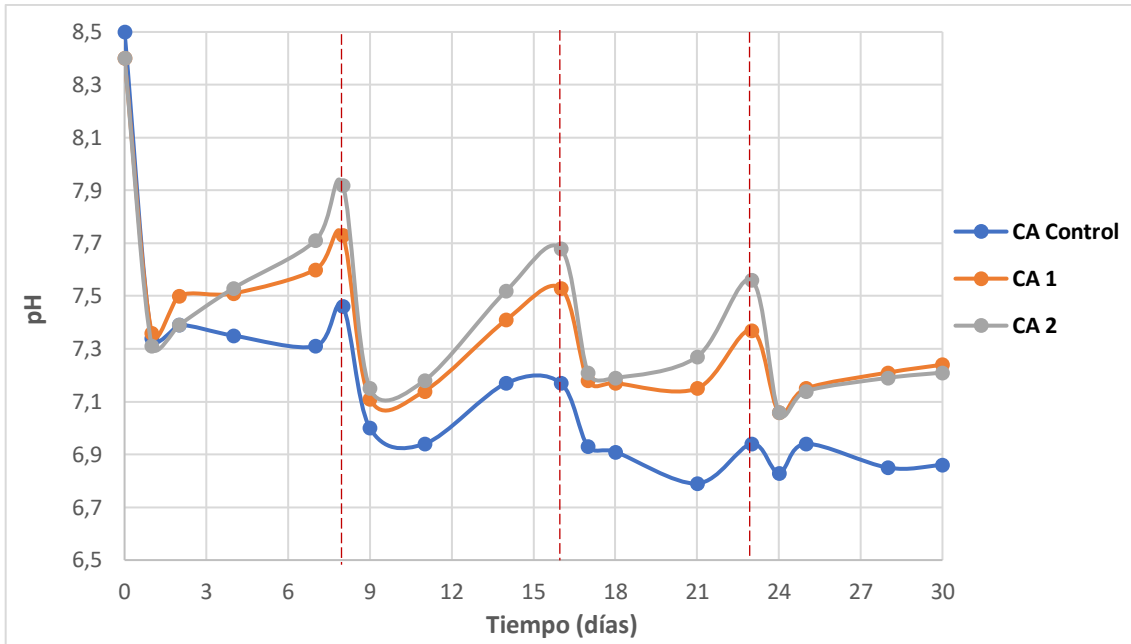


Figura 26: Gráfica de pH con *C. aceticum*

En las botellas con *C. carboxidivorans*, el pH (Figura 27) varía entre 6 y 7, con valores muy próximos de ambas botellas con ZVI en cada punto, descendiendo entre 0,8 y 0,5 en cada presurización, sin llegar al valor de pH 7 tras la primera presurización con CO₂, lo cual genera unas buenas condiciones para la producción de H₂ y el desarrollo en un pH adecuado. En cuanto a la botella de control sucede lo mismo que en el caso anterior, el pH apenas varía hasta las presurizaciones en las cuales disminuye y no alcanza los valores de las botellas con ZVI.

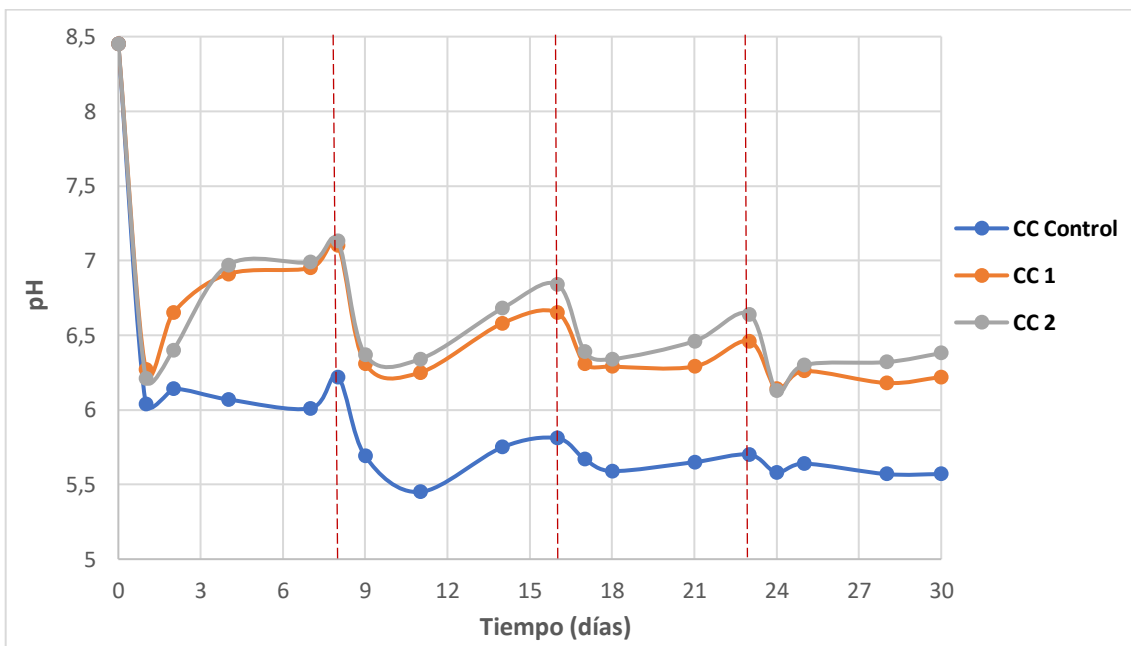


Figura 27: Gráfica de pH con *C. carboxidivorans*

En el análisis del ácido fórmico, se observan (Figura 28) dos comportamientos distintos para las botellas con *C. aceticum*. En el caso de la botella CA 2, a partir de la primera presurización la concentración disminuye, lo cual puede indicar una reacción y consumo del ácido fórmico para dar lugar a ácido acético, y en el caso de la botella CA 1 y de control, la concentración de ácido fórmico se mantiene durante el tiempo, aumentando ligeramente en la botella CA 1 tras la primera presurización indicada y manteniéndose en un valor próximo al inicial en el caso de la botella de control.

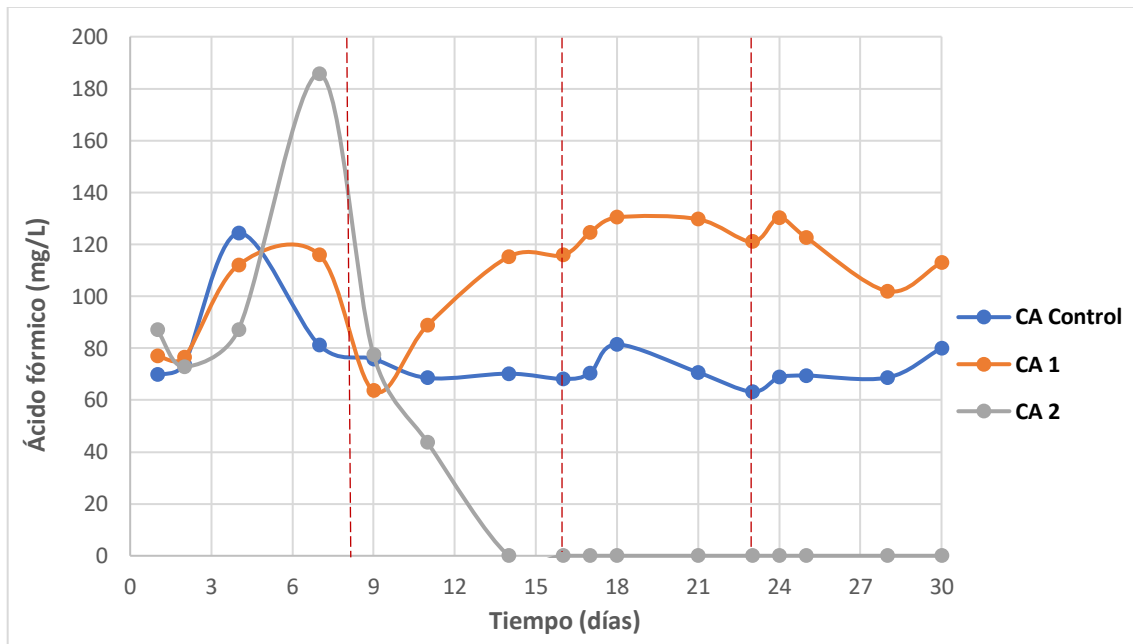


Figura 28: Gráfica de producción de ácido fórmico con *C. aceticum*

Para las botellas con *C. carboxidivorans*, la concentración de ácido fórmico, como se observa (Figura 29) es nula en el caso de la botella de control, se forma hasta 130 mg/L en la botella CC 1, disminuyendo tras la primera presurización, con un repunte de 65 mg/L tras la segunda presurización, pero reaccionando y consumiéndose completamente tras la tercera presurización siendo 0 al final del experimento. En el caso de la botella CC 2, se forma inicialmente una concentración de 80 mg/L que se mantiene prácticamente sin variación hasta el final del experimento.

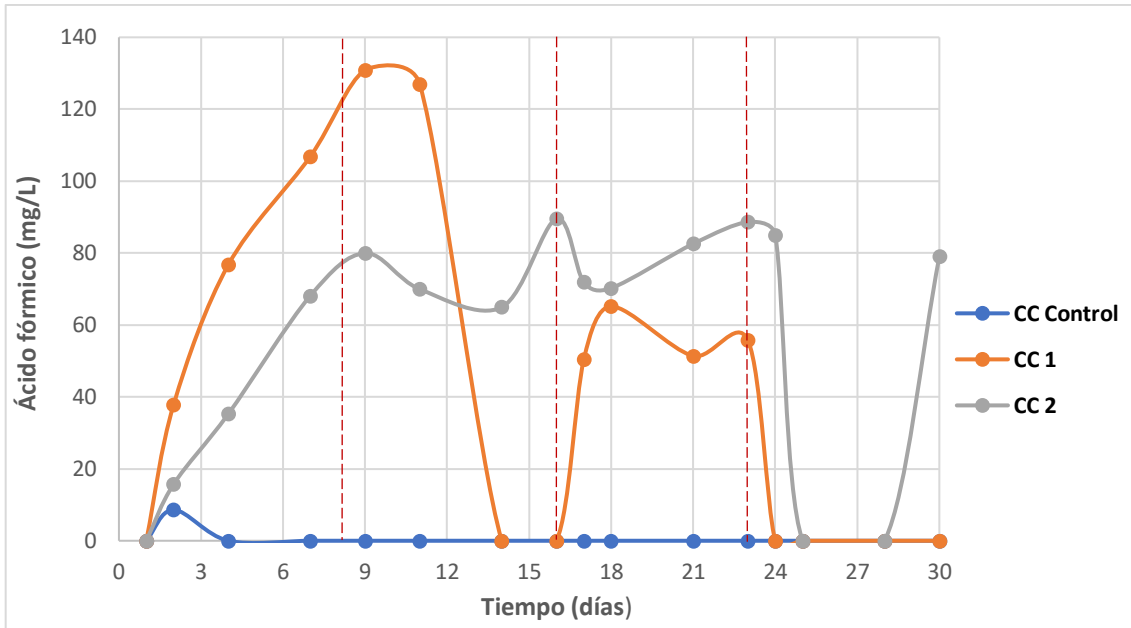


Figura 29: Gráfica de producción de ácido fórmico con *C. carboxidivorans*

La concentración máxima de ácido acético (Figura 30) alcanzada en las botellas con la bacteria *C. aceticum* es de 1630 mg/L de la botella CA 2 (aproximadamente 400 mg/L más que la máxima concentración de la botella CA 1), con lo que la botella CA 2 pudo estar favorecida en la obtención de una concentración mayor por una posible reacción y transformación del ácido fórmico en ácido acético que no sucede en la botella CA 1. En la botella de control, la concentración de ácido acético varía muy poco comparada la concentración inicial de esta y comparada con la concentración formada en las otras dos botellas con ZVI.

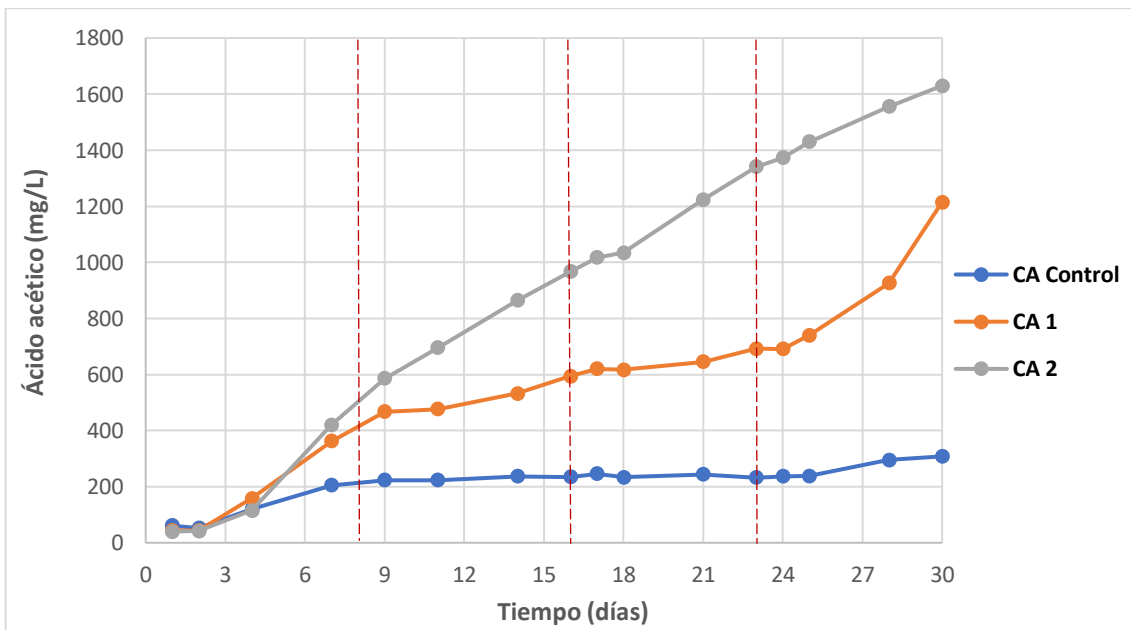


Figura 30: Gráfica de producción de ácido acético con *C. aceticum*

La concentración máxima de ácido acético (Figura 31) para las botellas con la bacteria *C. carboxidivorans* es de 2124 mg/L en la botella CC 1, siendo aproximadamente 200 mg/L mayor que la de la botella CC 2, lo que también indica como en el caso anterior, que una posible reacción de ácido fórmico se transforme en ácido acético y produzca una mayor concentración de ácido acético. También, inicialmente se comprueba en el HPLC la posible formación de etanol u otros alcoholes, no resultando visible ninguna concentración de estos en el cromatograma.

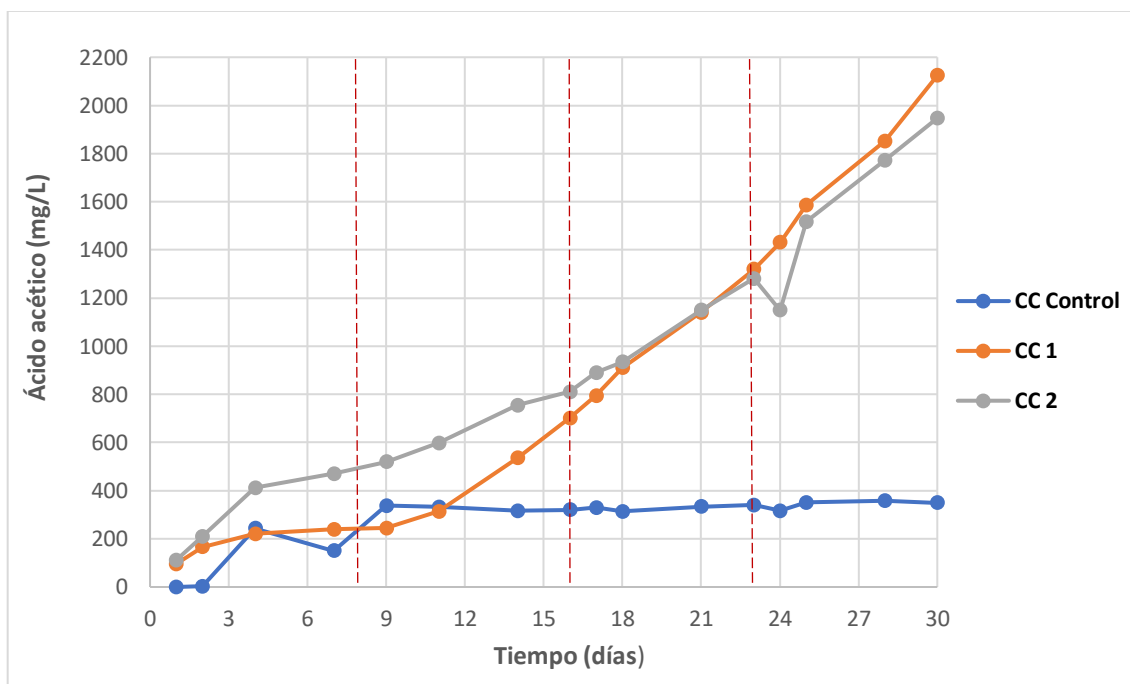


Figura 31: Gráfica de producción de ácido acético con *C. carboxidivorans*

Tanto en los resultados de producción de hidrógeno de las botellas de *C. aceticum* (Figura 32) como los de las botellas de *C. carboxidivorans* (Figura 33) con ZVI, se comprueba que se produce hidrógeno que reacciona y se consume para la formación de ácido acético. Tras las distintas presurizaciones de CO₂, el H₂ aumenta en cada botella consiguiendo prolongar el proceso de producción de ácido acético. También se comprueba que en las botellas de control definitivamente no se produce ninguna cantidad de H₂.

Se aprecia que, en las botellas de concentraciones máximas obtenidas de ácido acético, la CA 2 y CC 1, el consumo de H₂ es mayor, hasta el punto de ser casi cero en algún punto, con lo que las presurizaciones son necesarias para que en el experimento se continúe con la formación de ácido acético y no se detenga el desarrollo de la bacteria antes de llegar al día final del experimento.

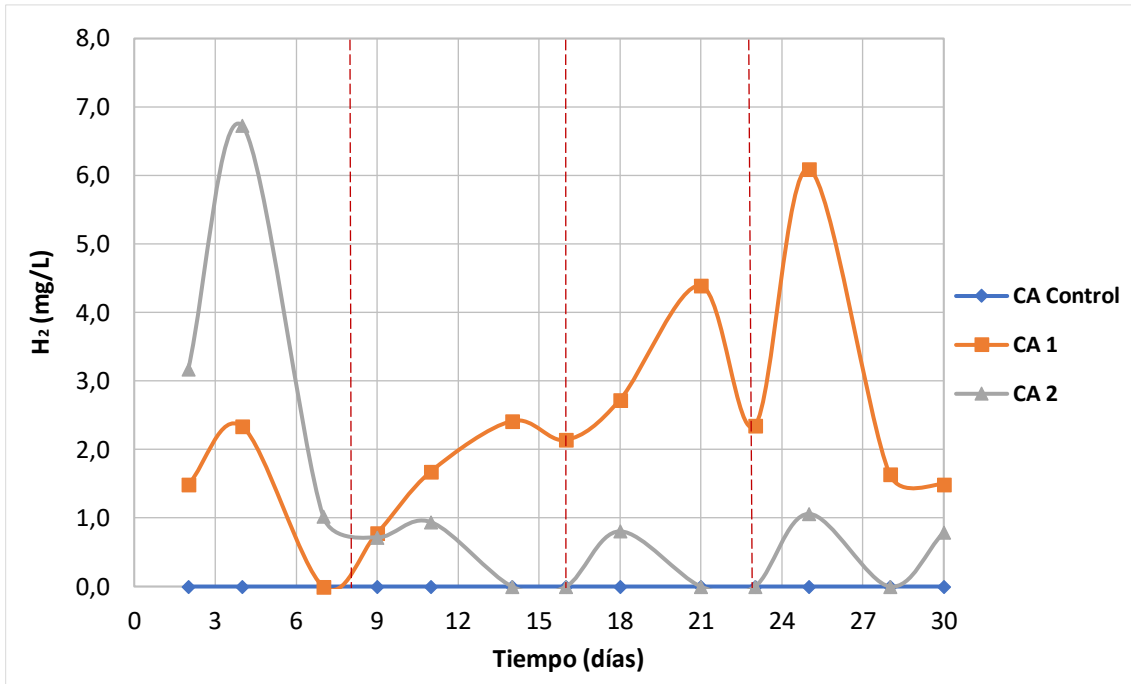


Figura 32: Gráfica de H₂ con *C. aceticum*

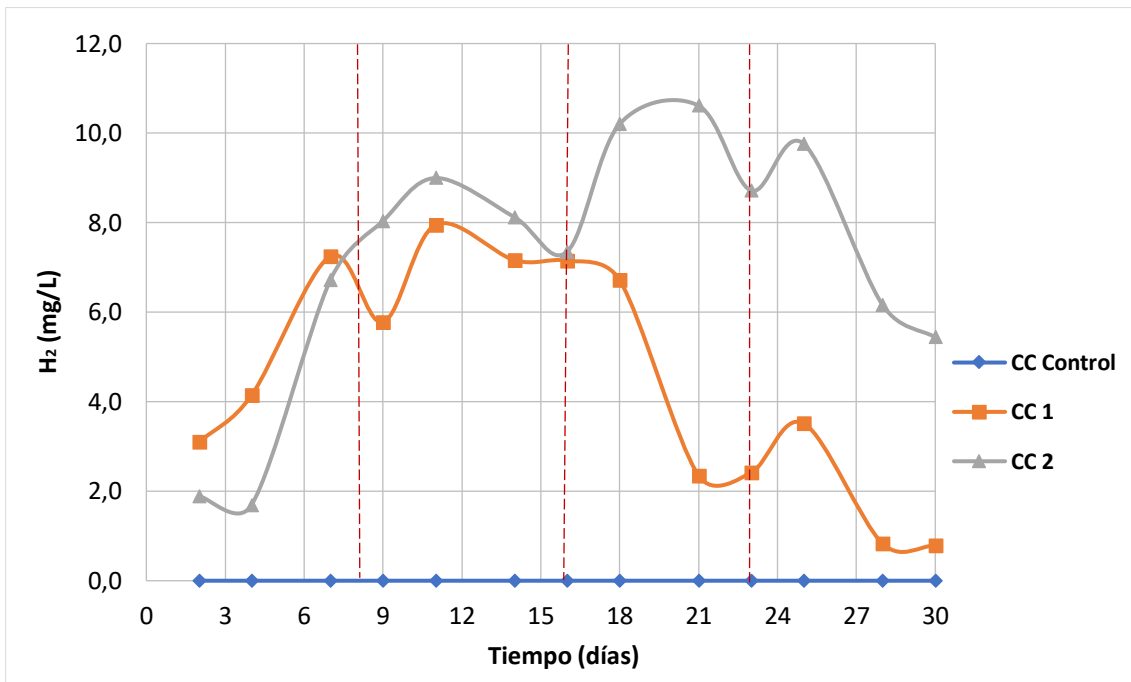


Figura 33: Gráfica de H₂ con *C. carboxidivorans*

En el caso de la concentración de dióxido de carbono en el medio, tanto en las botellas de *C. aceticum* (Figura 34) como en las botellas de *C. carboxidivorans* (Figura 35) con ZVI, se observa un consumo constante hasta cada punto presurización, en el que se aumenta la concentración para generar hidrógeno con el que reaccionar y producir ácido acético.

En cambio, en las botellas de control con cada bacteria la concentración de CO₂ se acumula en un grado mayor, siendo necesario el uso de ZVI para la producción de H₂, para el consumo de CO₂ y la producción de ácido acético.

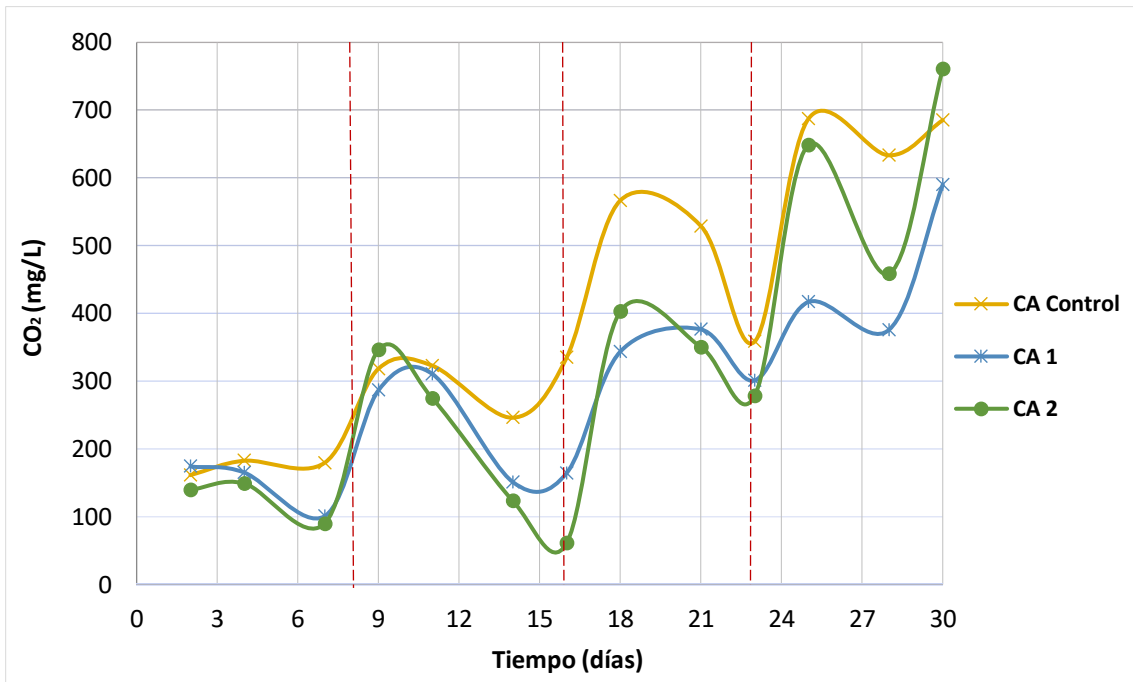


Figura 34: Gráfica de CO₂ con *C. aceticum*

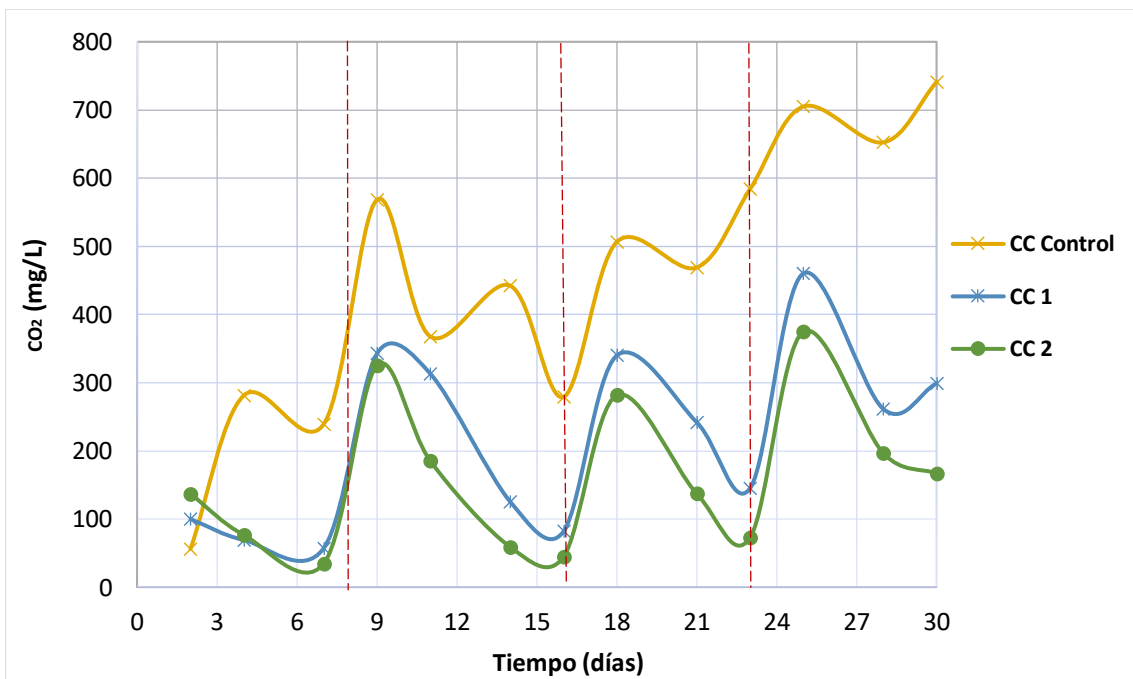


Figura 35: Gráfica de CO₂ con *C. carboxidivorans*

7. Conclusiones/conclusionés/conclusions

Conclusiones

Se ha observado la formación de ácido acético y la producción de biomasa como resultado del proceso de la ruta de Wood-Ljungdahl con tres bacterias distintas: *Acetobacterium woodii*, *Clostridium aceticum* y *Clostridium carboxidivorans*.

Analizando los primeros 16 días de cada experimento, se obtiene una mayor concentración de ácido acético en el segundo experimento, usando fructosa como sustrato para el crecimiento del inóculo de *C. aceticum*, con lo que puede ser posible que una parte de su consumo vaya a la formación de ácido acético.

El pH tiene un difícil control con la solubilización de CO₂ en el medio, que provoca su disminución y dificultad de ajuste para un óptimo desarrollo de la bacteria. Como también el difícil control en su aumento a medida que avanza el tiempo del experimento. Con lo cual, si no se presuriza con CO₂ a lo largo del experimento, es recomendable iniciarlo con un pH ajustado por debajo del pH óptimo de la bacteria. Tras la finalización de este TFG, el grupo de investigación adquirió un sistema de regulación de pH en las botellas, lo cual permite mantener un pH constante a lo largo del experimento y elimina esta variable y la influencia de este parámetro.

Se ha conseguido la producción de hidrógeno, a través del uso de hierro de valencia cero, para su reacción con dióxido de carbono, comprobando que sin el uso del ZVI no es posible el desarrollo de las bacterias y la alta formación de ácido acético. Por otro lado, se produce ácido fórmico a partir de los reactivos del medio, el cual, en ciertas ocasiones, reacciona y se consume para formar ácido acético aumentando los resultados de su concentración. También se obtienen mejores resultados aplicando las corrientes de N₂ y CO₂ al medio en el inicio del experimento, antes del autoclavado, sin las presurizaciones de las botellas con el CO₂.

Finalmente, dada la producción de H₂, el consumo de CO₂ es constante en todos los experimentos, siendo este un método viable para la producción de compuestos de alto valor añadido, como ácido acético, a partir de gases de efecto invernadero, como CO₂.

Conclusións

Observouse a formación de ácido acético e a produción de biomasa como resultado do proceso da ruta de Wood-Ljungdahl con tres bacterias distintas: *Acetobacterium woodii*, *Clostridium acetivum* e *Clostridium carboxidivorans*.

Analizando os primeiros 16 días de cada experimento, obtense unha maior concentración de ácido acético no segundo experimento, usando frutosa como substrato para o crecemento do inóculo de *C. acetivum*, co que pode ser posible que unha parte do seu consumo vaia a formación de ácido acético.

O pH ten un difícil control coa solubilización de CO₂ no medio, que provoca a súa diminución e dificultade de axuste para un óptimo desenvolvemento da bacteria. Como tamén o difícil control no seu aumento a medida que avanza o tempo do experimento. Polo cal, se non se presuriza con CO₂ ao longo do experimento, é recomendable inicialo con un pH axustado por debaixo do pH óptimo da bacteria. Despois da finalización deste TFG, o grupo de investigación adquiriu un sistema de regulación de pH nas botellas, o cal permite manter o pH constante ao longo do experimento e elimina esta variable e a influencia deste parámetro.

Conseguíuse a produción de hidróxeno, a través do uso de ferro de valencia cero, para a súa reacción con dióxido de carbono, comprobando que sen o uso de ZVI non é posible o desenvolvemento das bacterias e a alta formación de ácido acético. Por outro lado, prodúcese ácido fórmico a partir dos reactivos do medio, o cal, en certas ocasións, reacciona e consúmese para formar ácido acético aumentando os resultados da súa concentración. Tamén obtense mellores resultados aplicando as correntes de N₂ e CO₂ ao medio no inicio do experimento, antes do autoclavado, sen as presurizacións das botellas co CO₂.

Finalmente, dada a produción de H₂, o consumo de CO₂ é constante en tódolos experimentos, sendo este un método viable para a produción de compostos de alto valor engadido, como ácido acético, a partir de gases de efecto invernadoiro, como CO₂.

Conclusions

Acetic acid formation and biomass production have been observed as a result of the Wood-Ljungdahl pathway found in three different bacteria: *Acetobacterium woodii*, *Clostridium aceticum*, and *Clostridium carboxidivorans*.

Analysing the first 16 days of each experiment, a higher concentration of acetic acid is obtained in the second experiment, using fructose as a substrate for the growth of the inoculum of *C. aceticum*, since it is highly probable that part of its consumption goes to the formation of acetic acid.

The pH has a difficult control with the solubilization of CO₂ in the medium, which causes its decrease and a difficult adjustment for an optimal development of the bacteria, as well as the difficult control of its increase with time during the experiment. Therefore, instead of pressurizing with CO₂ throughout the experiment, it is recommended to start it with a pH adjusted below the optimum pH of the bacteria. After the completion of this final degree project, the research group acquired a pH regulation system for the bottles, which allows maintaining a constant pH throughout the experiment and eliminates this variable and the influence of this parameter.

The production of hydrogen has been achieved, through the use of zero valent iron, for its reaction with carbon dioxide, proving that without the use of the ZVI, the development of bacteria and the high formation of acetic acid are not possible. On the other hand, formic acid is produced from the reagents in the medium, which, on certain occasions, reacts and is consumed to form acetic acid, increasing the results of its concentration. Better results are also obtained by applying the N₂ and CO₂ supply to the medium at the beginning of the experiment, before autoclaving, without pressurizing the bottles with CO₂.

Finally, given the production of H₂, the consumption of CO₂ is constant in all the experiments, being this a viable method for the production of compounds with high added-value, such as acetic acid, from greenhouse gases, such as CO₂.

8. Bibliografía

1. IPCC, 2018: Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways. V. M. Delmotte, P. Zhai, H. O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. M. Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M. I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, T. Waterfield (eds.). Incheon, South Korea.
2. IPCC, 2013: Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. T. F. Stocker, D. Qin, G. K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, P. M. Midgley (eds.). Cambridge University Press, UK and New York, USA.
3. T. Kizildeniz, J. J. Irigoyen, I. Pascual, F. Morales. 2018. Simulating the impact of climate change (elevated CO₂ and temperature, and water deficit) on the growth of red and white Tempranillo grapevine in three consecutive growing seasons (2013–2015). *Agricultural Water Management*. 202:220-230.
4. B. R. Villanueva, M. B. Salvador, R. G. Huelgas. 2019. Cambio climático y salud. *Revista Clínica Española*. 219(5):260-265.
5. R. Takors, M. Kopf, J. Mampel, W. Bluemke, B. Blombach, B. Eikmanns, F. R. Bengelsdorf, D. Weuster-Botz, P. Durre. 2018. Using gas mixtures of CO, CO₂ and H₂ as microbial substrates: The do's and don'ts of successful technology transfer from laboratory to production scale. *Microbial Biotechnology*. 11(4):606–625. J. Wiley & Sons, USA.
6. J. W. van Groenestijn, H. N. Abubackar, M. C. Veiga, C. Kennes. 2013. Bioethanol. *Air Pollution Prevention and Control: Bioreactors and Bioenergy*. 18:431-463. J. Wiley & Sons, USA.
7. S. G. Pavlostathis, E. G. Gomez. 1991. Kinetics of Anaerobic Treatment. *Water Science and Technology*. 24(8):35–59.

8. N. J. Kruger, A. von Schaewen. 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*. 6(3):236-246.
9. F. M. Liew, M. Köpke, S. D. Simpson. 2013. Gas Fermentation for Commercial Biofuels Production. Liquid, gaseous and solid biofuels. 5:125-173. IntechOpen, Austria.
10. I. Vyrides, M. Andronikou, A. Kyprianou, A. Modic, A. Filippeti, C. Yiakoumis, C. G. Samanides. 2018. CO₂ conversion to CH₄ using Zero Valent Iron (ZVI) and anaerobic granular sludge: Optimum batch conditions and microbial pathways. *Journal of CO₂ Utilization*. 27:415-422.
11. F. Steger, L. Rachbauer, M. Windhagauer, L. F.R. Montgomery, G. Bochmann. 2017. Optimisation of continuous gas fermentation by immobilisation of acetate-producing *Acetobacterium woodii*. *Anaerobe*. 46:96-103.
12. S. W. Ragsdale, E. Pierce. 2008. Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1784(12):1873-1898.
13. S. Chakraborty, E. R. Rene, P. N. L. Lens, M. C. Veiga, C. Kennes. 2019. Enrichment of a solventogenic anaerobic sludge converting carbon monoxide and syngas into acids and alcohols. *Bioresource Technology*. 272:130-136.
14. H.-H. Cheng, J.-C. Syu, S.-Y. Tiene, L.-M. Whang. 2018. Biological acetate production from carbon dioxide by *Acetobacterium woodii* and *Clostridium ljungdahlii*: The effect of cell immobilization. *Bioresource Technology*. 262:229-234.
15. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1030> (Fecha de acceso: 1/06/2020)
16. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-1496> (Fecha de acceso: 1/06/2020)

17. <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-15243#> (Fecha de acceso: 1/06/2020)
18. F. R. Bengelsdorf, M. H. Beck, C. Erz, S. Hoffmeister, M. M. Karl, P. Riegler, S. Wirth, A. Poehlein, D. Weuster-Botz, P. Dürre. 2018. Bacterial Anaerobic Synthesis Gas (Syngas) and CO₂ + H₂ Fermentation. *Advances in Applied Microbiology*. 103(4):143-221.
19. A. F. Naveira, M. C. Veiga, C. Kennes. 2017. H-B-E (hexanol-butanol-ethanol) fermentation for the production of higher alcohols from syngas/waste gas. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 92:712-731.
20. A. F. Naveira, M. C. Veiga, C. Kennes. 2019. Selective anaerobic fermentation of syngas into either C2-C6 organic acids or ethanol and higher alcohols. *Bioresource Technology*. 280:387-395.
21. <https://www.dsmz.de/> (Fecha de acceso: 1/06/2020)
22. https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium135.pdf (Fecha de acceso: 1/06/2020)
23. https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium141.pdf (Fecha de acceso: 1/06/2020)
24. Imagen propia del primer experimento. Laboratorio de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias, Universidad de A Coruña, A Coruña, España.
25. https://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/Kultivierungshinweise/Kultivierungshinweise_neu_CD/engl_Anaerob_update.pdf (Fecha de acceso: 1/06/2020)

26. H. N. Abubackar, T. Keskin, K. Arslan, C. Vural, D. Aksu, D. K. Yavuzyılmaz, G. Ozdemir, N. Azbar. 2019. Effects of size and autoclavation of fruit and vegetable wastes on biohydrogen production by dark dry anaerobic fermentation under mesophilic condition. *International Journal of Hydrogen Energy*. 44(33):17767-17780.

27. www.crisoninstruments.com (Fecha de acceso: 1/06/2020)

28. K. Arslan, B. Bayar, H. N. Abubackar, M. C. Veiga, C. Kennes. 2019. Solventogenesis in *Clostridium acetivum* producing high concentrations of ethanol from syngas. *Bioresource Technology*. 292:121941.

29. <https://www.agilent.com/> (Fecha de acceso: 1/06/2020)

30. H. N. Abubackar, M. C. Veiga, C. Kennes. 2012. Biological conversion of carbon monoxide to ethanol: Effect of pH, gas pressure, reducing agent and yeast extract. *Bioresource Technology*. 114:518-522.