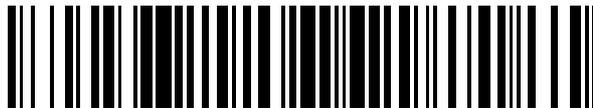


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 776**

21 Número de solicitud: 201231356

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/145 (2006.01)

C12R 1/465 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

03.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.04.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070617

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)
Ciudad Universitaria de Cantoblanco,
C/ Einstein, 3
28049 Madrid ES y
MYGEN LABORATORIO, S.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DÍAZ PORTUONDO, Emiliano Enrique;
SANZ MARTÍN, Jose Luis y
RAJHI, Hayfa**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **CONSORCIO MICROBIANO PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

57 Resumen:

Consortio microbiano para la producción de hidrógeno.

La presente invención se refiere a un consorcio microbiano que comprende una cepa de Clostridium roseum de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y una cepa de Streptomyces sp. con número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185. Además la presente invención se refiere al uso de dicho consorcio para la producción de hidrógeno, ácidos orgánicos, disolventes o biofilms, y a un procedimiento para la obtención de dicho consorcio.

ES 2 456 776 A1

DESCRIPCION

Consortio microbiano para la producción de hidrógeno

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la producción de biocombustibles a partir de microorganismos. Concretamente se refiere a un consorcio microbiano el cual presenta utilidad para la producción de hidrógeno, ácidos orgánicos y disolventes, así como a un procedimiento de obtención del consorcio.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 La necesidad de reducir el uso de los combustibles fósiles está promoviendo la búsqueda y empleo de nuevas fuentes renovables de energía. Entre ellas, el hidrógeno (H_2) se presenta como una de las energías más prometedoras, ya que es un combustible ambientalmente sostenible (porque su combustión produce solo agua), su generación puede hacerse de forma renovable y puede ser convertido eficientemente en electricidad a través de la celda de combustible o utilizado directamente.

15 En la actualidad la producción anual de hidrógeno a nivel mundial supera los 50 millones de toneladas, sin embargo el 96% se produce a través de la conversión de los combustibles fósiles no renovables (Gas Natural, Petróleo y Carbón), mientras que sólo el 4% corresponde a hidrógeno producido a partir de fuentes renovables, fundamentalmente por la vía de la electrólisis del agua.

Una de las formas de producir hidrógeno de forma renovable y sostenible, sería a través de la producción biológica a partir de residuos orgánicos y utilizando microorganismos (biohidrógeno).

25 Esta forma está siendo en la actualidad muy estudiada por diversos grupos científicos, ya que tiene una serie de ventajas, entre las que destaca su bajo consumo energético (el reformado de gas natural para obtener hidrógeno debe hacerse a temperaturas superiores a los $850^\circ C$), libera menor cantidad de gases con efecto invernadero en su producción (en el reformado de gas natural para producir 1 Kg de Hidrógeno se generan como residuos 11 Kg de CO_2), o el poder utilizar como materia prima los residuos sólidos o aguas residuales de diferentes orígenes, en lugar de otras fuentes de energía no renovables (como metano o carbón), contribuyendo además a la depuración de este tipo de aguas y residuos.

En teoría la producción biológica de Hidrógeno a través de la actividad microbiana solamente puede llevarse a cabo por dos vías:

35 Fotorreducción donde la energía luminosa es necesaria para que los microorganismos produzcan Hidrógeno. Esta vía es llevada a cabo por cianobacterias, bacterias fotosintéticas rojas y verdes, y por algunas algas verdes unicelulares;

40 Fermentación oscura o fermentación ácida: Donde la materia orgánica es fermentada a Hidrógeno, Dióxido de Carbono y ácidos orgánicos (fundamentalmente ácidos grasos volátiles). Esta vía es llevada a cabo por bacterias heterótrofas anaerobias (estrictas o facultativas).

Existen varios factores que influyen en el proceso de producción de hidrógeno por la vía fermentación y que habría que considerar para conseguir que fuera eficientemente aplicado a escala industrial. Entre los más estudiados están la selección del inóculo adecuado y algunos parámetros operacionales tales como el pH, la temperatura y presión parcial de H_2 .

Desde el punto de vista microbiológico en la vía fermentativa existen dos problemas fundamentales: la relación entre las bacterias productoras y consumidoras de hidrógeno, y la influencia de la presión parcial de hidrógeno en las bacterias productoras de hidrógeno.

50 Las bacterias consumidoras de H_2 disminuyen el rendimiento de las bacterias productoras de H_2 , lo que hace que en los reactores anaeróbicos que funcionan en la actualidad el porcentaje de hidrógeno no supere el 5%. Para evitarlo, se han utilizado diferentes estrategias que limiten el desarrollo de las bacterias consumidoras como por ejemplo mediante el uso de calor, ya que un choque térmico inicial promueve la producción de H_2 eliminando los microorganismos consumidores de H_2 no esporulantes y seleccionando bacterias productoras de H_2 esporulantes (Sung *et al.*, Proc. 2002 U.S. DOE *Hydrogen Program Review*. También se han ensayado otros métodos alternativos como tratamiento ácido, tratamiento alcalino, aireación parcial o inhibición mediante la adición de ácido 2-bromoetanosulfónico, de cloroformo o de yodo-propano. Tales tratamientos pueden a su vez ir en mayor o menor medida en detrimento de los productores de H_2 o no eliminar a algunos acetógenos consumidores de H_2 , por lo que su empleo se encuentra actualmente en discusión y sus resultados cuestionados (Zhu, H., Beland, M., 2006, *Int J Hydrogen Energy* 31, 1980-1988); Hu and Chen, *Int J Hydrogen Energ.* 2007, 32:3266-3273).

65 Partiendo de inóculos microbianos complejos que llevan a cabo la digestión anaerobia existen dos formas fundamentales de producir H_2 : favoreciendo la acumulación de H_2 (habitualmente escaso) en consorcios anaerobios degradadores de materia orgánica o mediante el aislamiento de bacterias productoras de H_2 a partir de ecosistemas anaerobios, que a su vez se podrían mezclar con otros microorganismos para formar consorcios artificiales.

La acumulación de H₂ se puede conseguir mediante la inhibición de microorganismos consumidores de H₂ de la digestión anaerobia. El establecimiento de un tipo de consumidor de H₂ depende principalmente del tipo de inóculo, la concentración de H₂, la fuente de carbono, la solubilidad del aceptor de electrones, etc. pero en la mayoría de ambientes anaerobios las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas son el grupo de microorganismos consumidores de H₂ más común Valdez-Vazquez I, 2009.. International Journal of Hydrogen Energy 34(9): 3639-3646). Por ello, para la acumulación de H₂ se intenta inhibir la metanogénesis. En la práctica se ha visto, en efecto, que un pH entre 5,5 y 6,5, tiempos de retención hidráulica cortos (<6h), los tratamientos por choque térmico (80-100°C 2-3h) y los inhibidores como el acetileno son eficientes minimizando la pérdida de H₂ por microorganismos metanogénicos en sistemas no estériles Valdez-Vazquez I, 2009.. International Journal of Hydrogen Energy 34(9): 3639-3646). Mediante la inhibición de microorganismos consumidores de H₂, por tanto, se consiguen comunidades microbianas productoras de H₂ estables. Numerosos autores estudian la estructura, diversidad y dinámica de estas comunidades ya que profundizar en el funcionamiento de los consorcios productores de H₂ es esencial para mejorar la eficiencia de este proceso. En estudios recientes se ha visto que los metabolitos más comúnmente formados durante la fermentación oscura por consorcios, son el acetato, propionato, butirato, etanol y butanol lo que sugiere que especies del género *Clostridium* sean las predominantes en estos sistemas productores de H₂ (Lay, 2000, Biochnol Bioeng 68, 269-78).

En estudios de enriquecimiento de inóculos por choque térmico y acidificación, se observó mediante microscopía electrónica de barrido, que los gránulos productores de H₂ estaban típicamente compuestos por bacterias de forma bacilar formadoras de esporas y bacilos fusiformes, sugiriendo que las especie dominante era *Clostridium sp.* junto con *Bacillus* Fang HHP, Liu H, Zhang T. 2002, Biotechnol Bioeng 78, 44-52).

El enfoque alternativo a la manipulación de consorcios degradadores de materia orgánica para la producción de biohidrógeno es el aislamiento de bacterias que liberan H₂ como subproducto de su metabolismo fermentativo, es decir, la producción de H₂ por cultivos aislados puros. Diversos autores han estudiado la producción de H₂ por cepas aisladas. (Wang et al. *J Appl Microbiol.* 2007, 103:1415-1423) y Chen Chen et al. 2006 *Int. J. Hydrogen Ener.* 31, 2170-2178., aislaron distintas cepas de *Clostridium* muy eficientes en la producción de H₂. También se han aislado varias cepas de *Enterobacter* y *Thermoanaerobacterium*). Además del aislamiento y la caracterización de cepas productoras de H₂, algunos autores han trabajado con cultivos puros en estudios en continuo con reactores. (Zhang et al. *Process Biochem* 2006, 41, 2118-2123), por ejemplo, estudiaron la producción de H₂ por un cultivo puro de *Clostridium acetobutylicum* en un reactor de filtro percolador.

En el proceso de producción de biohidrógeno a partir de cultivos puros hay que tener en cuenta que la cepa utilizada puede estar especializada en la degradación de un tipo de compuestos por lo que no podría utilizar sustratos complejos. Con cultivos puros será por tanto necesario usar sustratos simples, lo cual dificulta trabajar con residuos. No se dará la degradación total de materia orgánica ya que habrá acumulación intermediarios al faltar las últimas etapas de la degradación.

Tanto los estudios de estructura, diversidad y dinámica de comunidades productoras de H₂, como los aislamientos de bacterias productoras de H₂ ponen de manifiesto que las bacterias del género *Clostridium* son bacterias fundamentales para la producción biológica del H₂. Por ello, es imprescindible estudiar las rutas bioquímicas que sigue *Clostridium* para la conversión de carbohidratos a H₂, CO₂, ácidos orgánicos y disolventes en los procesos de producción de H₂, tanto por consorcios mixtos como por cultivos puros.

La capacidad de las especies del género *Clostridium* para formar endosporas en condiciones desfavorables ha sido ampliamente utilizada para seleccionarlas, tanto a partir de ambientes naturales como de lodos de depuradoras, sometiendo el inóculo a un choque térmico. Los aislados de este género, sin embargo, presentan una desventaja a la hora de operar en cultivos continuos: si la presión parcial de H₂ no se mantiene en niveles bajos, su metabolismo puede cambiar y dejar de producir H₂, para producir etanol o lactato, lo que reduce o anula la producción de H₂. Incluso en cultivos continuos mantenidos en condiciones no estériles durante largo tiempo, puede tener lugar un cambio de poblaciones: de productoras de H₂ a consumidoras o no-productoras, tales como acetógenas, productoras de propionato, lactato o metanógenas (Kim et al, *Process Biochem.* 2006, 41:199-207). Nuevamente la presión parcial de H₂ (PH₂) juega un papel clave en la evolución del proceso degradativo.

Una alternativa a este género son las bacterias anaerobias facultativas, especialmente las pertenecientes al género *Enterobacter* y otros miembros de la familia *Enterobacteraceae* como *Citrobacter* o *Klebsiella* (Ito et al, *J Biosc Bioeng.* 2005, 100: 260-265). A diferencia de los *Clostridium*, la producción de H₂ en las enterobacterias no se inhibe a presiones parciales de H₂ elevadas, pero su rendimiento es menos de la mitad del rendimiento de producción de H₂ de *Clostridium sp.* o *Rhodobacter sp.* Una amplia revisión bibliográfica sobre el tema, si bien centrada en las investigaciones realizadas en Japón, uno de los países punteros en la bioproducción de H₂, ha sido realizada por Nishio y Nakashimada (Nishio N et al. 2005. *J Biosc Bioeng* 100(3), 260-265).

Por otro lado, entre los parámetros operacionales más importantes a tener en cuenta durante la fermentación, el pH y la temperatura parecen jugar un papel clave en la producción de H₂. Ambos factores han sido estudiados en múltiples trabajos. En la mayor parte de los casos reportados, el pH óptimo se sitúa en 5.5 (Jun et al. *J microbiol Biotechnol.* 2008; 18:1130-1135; Tang et al. *J Biosci Bioeng.* 2008, 106:80-87) por lo que este pH se emplea de

forma rutinaria en múltiples trabajos. Con respecto a la temperatura, ésta tiene un efecto considerable sobre la producción de H₂. Así, empleando lodos albañales como inóculo para la generación de H₂ a partir de purines, (Tang *et al.* *J Biosci Bioeng.* 2008, 106:80-87) determinaron, para el rango mesofílico, la temperatura a la que se obtiene un rendimiento óptimo es de 45°C. La alternativa, trabajar en condiciones termofílicas (55-60°C), ha sido también investigada, tanto con cultivos puros de *C. uzonii* y *T. acidotolerans* (Koskinen *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 2008, 101:679-690), como mixtos (O-Thong *et al.* *Biores Technol.* 2009, 100:909-918) en los que predominan *Thermoanaerobacterium spp.* y *Clostridium spp.* Aunque la producción de H₂ es mayor a 55°C que a 37°C (Karlsson *et al.* *Int J Hydrogen Energy* 2008, 33:953-962) y disminuyen los problemas de contaminación por bacterias consumidoras de H₂, el proceso sólo tiene interés desde el punto de vista industrial para aquellos residuos (aguas residuales, principalmente) que se generan a alta temperatura, tales como ciertas industrias conserveras o papeleras.

A pesar de todo lo descrito anteriormente resulta necesaria aún la búsqueda de alternativas y/o mejoras para la producción de hidrógeno mediante microorganismos de forma que se mejoren los rendimientos de producción actuales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un consorcio microbiano formado por una cepa de *Clostridium roseum* y una cepa de *Streptomyces sp.* el cual, permite una elevada producción de hidrógeno (H₂) lo que convierte dicho consorcio en un elemento de alto interés en la industria de los biocombustibles.

En la presente invención se proporciona, por tanto, una mezcla de cepas, una perteneciente a la especie *Clostridium roseum* con número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) 8187 la cual se ha aislado mediante un método de aislamiento en condiciones de bajo vacío (lo que permite una mejor selección de las cepas altamente productoras al eliminarse la limitación que provoca la presión parcial de H₂ en la producción de este) y otra perteneciente a la especie *Streptomyces sp.* con número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) 8185, aislado a partir del lodo granular en condiciones aeróbicas. El consorcio de la invención, tal y como se muestra en los ejemplos, presenta como característica que mediante la unión de la cepa de H5 *Clostridium roseum* con número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 (productora de H₂) con la cepa EJ1 de *Streptomyces sp.* con número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 se produce mayor cantidad de H₂ que utilizando la cepa de H5 *Clostridium roseum* u otras cepas de forma independiente, a pesar de que la cepa de *Streptomyces sp.* no es productora de H₂.

Por otro lado, las cepas seleccionadas presentan ventajas como (i) que la cepa concreta de *Streptomyces sp.* no produce antibióticos de forma contraria a lo que ocurre con la mayor parte de los organismos del mismo género, y (ii) además permite la formación de biopelículas esféricas las cuales aglutinan el microorganismo y permiten un mejor uso en biorreactores. Además, la cepa seleccionada de *Streptomyces sp.* al ser consumidora de oxígeno, permite limitar la presencia de este, lo que en el consorcio provoca un mejor desarrollo de las otras cepas seleccionadas para la formación del consorcio. La cepa seleccionada de *Clostridium roseum*, por su parte, presenta una mayor producción de H₂ por separado que algunos organismos de otras especies del género *Clostridium*. El consorcio formado por al menos las 2 cepas tiene como ventaja adicional que al formarse biopelículas, el uso en bioreactores minimiza la pérdida de la cepa tanto por una mayor protección de la misma como por menor eliminación al cambiar el medio en los biorreactores y por tanto hacen el proceso de producción de hidrógeno más sencillo y rentable.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un consorcio microbiano de ahora en adelante consorcio microbiano de la invención, que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces sp.* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185.

La clasificación científica de la cepa CECT8187 o cepa H5 de la presente invención es: Dominio *Bacteria* / Filo *Firmicutes* / Clase *Clostridia* / Orden *Clostridiales* / Familia *Clostridiaceae* / Género *Clostridium* / Especie *Clostridium roseum*. Dicha cepa fue depositada el 19 de Julio de 2012 en la Colección española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia, España).

La clasificación científica de la cepa CECT8185 o cepa EJ1 de la presente invención es: Dominio *Bacteria* / Filo *Actinobacteria* / Orden *Actinomycetales* / Suborden *Streptomycineae* / Familia *Streptomycetaceae* / Género *Streptomyces* / Especie *Streptomyces sp.* Dicha cepa fue depositada el 19 de Julio de 2012 en la Colección española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia, España).

Se entiende por "consorcio microbiano" en la presente invención a una mezcla de al menos 2 cepas de microorganismos diferentes. El consorcio de la invención comprende la cepa de *Streptomyces sp.* EJ1 CECT8185 y la cepa de *Clostridium roseum* H5 CECT8187, y adicionalmente otras cepas de diferentes organismos. El consorcio de la invención funciona de forma más adecuada cuando la cepa *Streptomyces sp.* se encuentra en una proporción

adecuada para la formación de gránulos que integren las cepas productoras. De esta forma, la proporción adecuada puede ser por ejemplo de entre 1:1 y 1:1000 con el resto de las cepas que formen el consorcio microbiano, aunque puede variar en función de las condiciones experimentales. Por ello en una realización preferida de este aspecto de la invención, la proporción entre CECT8185 y CECT8187 es de entre 1:1 y 1:1000.

El consorcio de la invención puede incluir adicionalmente otros organismos que por ejemplo, aunque sin limitarse, permitan degradar otros sustratos diferentes y que por tanto permitan aprovechar mejor el material de partida utilizado aumentando el rendimiento del proceso de producción de H₂. En este caso de igual forma que en el consorcio inicial se podrán producir H₂, ácidos orgánicos o disolventes. Estos organismos pueden ser por ejemplo organismos pertenecientes al género *Clostridium*, los cuales pueden ser utilizados para producir H₂. Dentro de los organismos que se pueden añadir al consorcio se encuentran por ejemplo la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*.

Por todo ello, en una realización preferida del primer aspecto de la invención, el consorcio microbiano de la invención comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización más preferida, la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la proporción entre CECT8185 y las cepas CECT8187, CECT8186, CECT8188 y/o CECT8189 es de entre 1:1 y 1:1000.

Se entiende por cepa de *Clostridium* a una cepa perteneciente al Dominio *Bacteria*; División *Firmicutes*; Clase *Clostridia*; Orden *Clostridiales*; Familia *Clostridiaceae*; Género *Clostridium*.

La clasificación científica de la cepa CECT8186 o cepa H1 de la presente invención es: Dominio *Bacteria* / Filo *Firmicutes* / Clase *Clostridia* / Orden *Clostridiales* / Familia *Clostridiaceae* / Género *Clostridium* / Especie *Clostridium saccharobutylicum*. Dicha cepa fue depositada el 19 de Julio de 2012 en la Colección española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia, España).

La clasificación científica de la cepa CECT8188 o cepa R6 de la presente invención es: Dominio *Bacteria* / Filo *Firmicutes* / Clase *Clostridia* / Orden *Clostridiales* / Familia *Clostridiaceae* / Género *Clostridium* / Especie *Clostridium butyricum*. Dicha cepa fue depositada el 19 de Julio de 2012 en la Colección española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia, España).

La clasificación científica de la cepa CECT8189 o cepa RT2 de la presente invención es: Dominio *Bacteria* / Filo *Firmicutes* / Clase *Clostridia* / Orden *Clostridiales* / Familia *Clostridiaceae* / Género *Clostridium* / Especie *Clostridium diolis*. Dicha cepa fue depositada el 20 de Julio de 2012 en la Colección española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia, España).

El consorcio microbiano de la invención puede ser utilizado de forma independiente o bien en unión con otros elementos conocidos por el experto en la materia para, por ejemplo, aunque sin limitarse, hacer más fácil su aplicación, mantener sus características más tiempo, conferir protección frente a condiciones externas, o complementar su actividad. Estas composiciones que comprenden otros elementos adicionales al consorcio de la invención tendrían la misma utilidad que el consorcio de la invención. Por todo ello, otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende el consorcio microbiano de la invención.

Como se muestra en los ejemplos, el consorcio microbiano de la invención presenta utilidad para la producción de H₂, ya que presenta una elevada tasa de producción. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces* sp. de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la producción de H₂. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*.

El consorcio de la invención, es especialmente útil en procesos de fermentación oscura o ácida en los cuales se lleva a cabo degradación de materia orgánica en condiciones anaeróbicas. Por todo ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de

Streptomyces sp. de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la producción de H₂, donde la producción de H₂ se lleva a cabo mediante fermentación. En una realización más preferida el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización aun más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*.

Se entiende por “fermentación oscura o ácida” en la presente invención aquel proceso que lleva a la producción de H₂ a partir de la degradación por parte de microorganismos de materia orgánica.

La producción de H₂ se puede producir a partir de diferentes materiales de partida, como por ejemplo, aunque sin limitarse, a partir de sustratos puros como proteínas o azúcares, a partir de sustratos complejos o incluso a partir de mezclas como por ejemplo residuos. El uso de estos últimos resulta particularmente interesante ya que permite el aprovechamiento de materiales que de otra forma sería desechados. En la presente invención se muestra que el consorcio microbiano puede ser utilizado para la producción de H₂ en muestras complejas de sustratos, por lo que demuestra su utilidad para el uso de diferentes residuos como material de partida para la producción de H₂. Por tanto, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o de una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces sp.* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la producción de H₂, preferiblemente mediante fermentación donde el sustrato inicial son residuos urbanos, residuos industriales y/o residuos agroindustriales. En una realización más preferida el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización aun más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*.

Se entiende por “residuo urbano” en la presente invención, residuos procedentes de zonas urbanas exclusivamente.

Se entiende por “residuo industrial” en la presente invención, residuos procedentes de zonas industriales exclusivamente: Ejemplo: Agua residuales proveniente del proceso industrial de una cervecería.

Se entiende por “residuos agroindustrial” en la presente invención, residuos procedentes de explotaciones agrícolas y/o industriales

Además de para la producción de H₂, tal y como se demuestra en los ejemplos el consorcio microbiano presenta una mayor producción de diversos ácidos orgánicos que por ejemplo la cepa H5 de forma independiente.

Por esto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o de una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces sp.* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la producción de ácidos orgánicos. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*. En una realización aun más preferida los ácidos orgánicos se seleccionan de la lista que comprende ácido acético, ácido butírico ácido propiónico, ácido láctico, ácido fórmico o ácido succínico.

De igual forma que en el caso del H₂ estos ácidos orgánicos se pueden producir de forma preferible en procesos de fermentación oscura o ácida. Por todo ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces sp.* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la producción de ácidos orgánicos, donde la producción de ácidos orgánicos se lleva a cabo mediante fermentación. En una realización más preferida el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización aun más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*. En una realización aun más preferida los ácidos orgánicos se seleccionan de la lista que comprende ácido acético, ácido butírico ácido propiónico, ácido láctico, ácido fórmico o ácido succínico.

En el caso de la formación de los ácidos orgánicos, también se puede partir de diferentes sustratos puros o de sustratos complejos. Por esto, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la

Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces sp.* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la producción de ácidos orgánicos, preferiblemente mediante fermentación, donde el sustrato inicial son residuos urbanos, residuos industriales y/o residuos agroindustriales. En una realización más preferida el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*.
 5 En una realización aun más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*. En una realización aun más preferida los ácidos orgánicos se seleccionan de la lista que comprende ácido acético, ácido butírico ácido propiónico, ácido láctico, ácido fórmico o ácido succínico.
 10

Se entiende por "ácido orgánico" en la presente invención un compuesto que contiene, al menos un grupo carboxilo. En la presente invención se restringe a compuestos formados por C, H y O de bajo peso molecular que contienen, al menos, un grupo carboxilo, como por ejemplo, aunque sin limitarse, ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico, ácido láctico, ácido fórmico o ácido succínico.
 15

Además de ácidos orgánicos y H₂, el consorcio de la invención, tal y como se muestra en los ejemplos también presenta la capacidad de producir disolventes como por ejemplo, aunque sin limitarse, etanol, metanol, acetona y butanol. Por esto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces sp.* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la producción de disolventes, preferiblemente etanol, metanol, acetona y/o butanol. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*. En una realización aun más preferida los disolventes se seleccionan de la lista que comprende etanol, metanol, acetona y butanol.
 20
 25

La producción de disolventes, en el caso del consorcio de la invención se puede producir de forma preferible en procesos de fermentación oscura o ácida. Por todo ello, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o de una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces sp.* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la producción de disolventes, preferiblemente etanol, metanol, acetona y/o butanol, donde la producción de disolventes se lleva a cabo mediante fermentación. En una realización más preferida el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización aun más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*.
 30
 35
 40

Además, como en los casos anteriores también se puede partir de diferentes sustratos puros o de sustratos complejos. Por esto, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces sp.* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la producción de disolventes, preferiblemente etanol, metanol, acetona y/o butanol, y más preferiblemente mediante fermentación, donde el sustrato inicial son residuos urbanos, residuos industriales y/o residuos agroindustriales. En una realización más preferida el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización aun más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*.
 45
 50

Se entiende por "disolvente" en la presente invención, a disolventes orgánicos, compuestos orgánicos volátiles que se utilizan para disolver otros compuestos sin que ni solvente ni soluto sufran cambio químico.
 55

En los ejemplos de la presente invención también se demuestra que el consorcio presenta la capacidad de formar biopelículas. Estas biopelículas permiten aglutinar los microorganismos de forma que quedan mejor protegidos frente al estrés al que pueden estar sometidos por ejemplo en un biorreactor y por tanto permiten un mejor aprovechamiento de la capacidad productiva y mayor aprovechamiento de los recursos. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de un consorcio microbiano o de una composición que comprende la cepa de *Clostridium roseum* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8187 y la cepa de *Streptomyces sp.* de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8185 para la formación de biopelículas. En una realización preferida, el consorcio o la composición comprende además al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización aun más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la
 60
 65

Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*.

5 Se entiende por "biopelícula" o "*biofilm*" en la presente invención a una comunidad de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos. Estos *biofilms* se pueden encontrar adheridos a diferentes superficies o, como en esta invención, formar gránulos que permiten la agregación de los microorganismos.

10 En la presente invención, también se describe un procedimiento mediante el cual se obtienen cepas altamente productoras de H₂. Este procedimiento se realiza en condiciones de bajo vacío, lo cual evita la inhibición del crecimiento producida por la acumulación de H₂. Esto permite una mejor selección de organismos altamente productores de H₂. Por otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de cepas altamente productoras de H₂ que comprende:

- 15 a) cultivar en un bioreactor en condiciones aerobias una muestra de lodo,
 b) aislar colonias presentes en el lodo de (a), y
 c) cultivar las colonias de (b) y seleccionar las cepas más productoras,
 caracterizado porque se lleva a cabo en condiciones de bajo vacío.

20 En una realización preferida de este aspecto de la invención la cepa seleccionada en el paso (c) se selecciona de la lista que comprende la cepa H5 CECT8187, la cepa H1 CECT8186, la cepa R6 CECT8188 y la cepa RT2 CECT8189. En una realización aun más preferida la cepa la cepa seleccionada en el paso (c) es la cepa H5.

Se entiende por "bajo vacío" en la presente invención, una presión en el rango comprendido entre 100 kPa y 100 Pa, equivalente a 1-0,001 atmósferas.

25 Se entiende por "lodo" en la presente invención a un conglomerado o consorcio microbiano que puede tener una forma definida o no.

Se entiende por "lodo granular" en la presente invención lodo anaerobio en forma de gránulo que puede formarse por ejemplo, aunque sin limitarse, en reactores anaeróbicos UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*)

30 Se entiende por "cepas altamente productoras de H₂" en la presente invención, aquellas cepas capaces de producir una cantidad de H₂ superior a dos moles de H₂ por mol de glucosa consumida.

35 Para la obtención del consorcio de la invención, resulta necesario mezclar una cepa altamente productora de H₂ con la cepa EJ1 de *Streptomyces* sp. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener un consorcio microbiano, que comprende:

- 40 a) cultivar en un bioreactor en condiciones aerobias una muestra de lodo,
 b) aislar colonias presentes en el lodo de (a), y
 c) cultivar las colonias de (b) y seleccionar las cepas más productoras,
 d) independientemente cultivar lodo granular triturado en condiciones aerobias
 e) seleccionar los flóculos formados
 f) aislar en placa el microorganismo formador de los flóculos, que corresponde con *Streptomyces* sp.
 g) mezclar las cepas de los pasos (c) y (f)

45 caracterizado porque los pasos a, b y c se llevan a cabo en condiciones de bajo vacío. En una realización preferida de este aspecto de la invención la cepa seleccionada en el paso (c) es la cepa la cepa H5 CECT8187. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, adicionalmente se mezcla en el paso (g) al menos otra cepa de *Clostridium*. En una realización aun más preferida la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número de acceso a la Colección Española de Cultivos Tipo CECT8189 de *Clostridium diolis*.

50 En otra realización preferida, la cepa EJ1 de *Streptomyces* sp. se mezcla en el paso (g) en forma de biopelículas esféricas.

55 En otra realización preferida las cepas del paso (g) se mezclan en una proporción de entre 1:1 a 1:1000.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

65 **Fig. 1.** A y B Muestra la formación de partículas esféricas por parte de la cepa EJ1 (CECT8185) de *Streptomyces* sp.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la utilidad del consorcio microbiano para la producción de H₂, ácidos orgánicos y disolventes. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1: Aislamiento de los microorganismos productores de H₂ en condiciones de bajo vacío.

Para el aislamiento de bacterias productoras de H₂ y la obtención de un cultivo enriquecido, se trabajaron con diferentes tipos de biorreactores (Volumen: 20 – 300 mL). Inicialmente para el arranque se inocularon entre un 1% y hasta 20% de un lodo que puede proceder de diferentes orígenes como por ejemplo de la depuradora anaerobia de una cervecera (cepas H5 CECT8187 y H1 CECT8186), lodo de una depuradora aerobia de aguas residuales urbanas, lodo de un digestor anaerobio de residuos sólidos urbanos (cepa R6 CECT8188) y sedimento de río (cepa RT2 CECT8189) en medio de cultivo. El proceso transcurrió a 30 °C y siempre se aplicó bajo vacío (101325 Pa – 1,333 Pa) ó (760 torr- 0,01 torr). Durante la etapa de enriquecimiento se transfirió, cada 5-15 días, un volumen de inóculo, entre 0,1% y 5% del volumen útil, a otro biorreactor con Medio Reactor (MR), el cual se incubó en las mismas condiciones. De manera similar se hicieron entre 3 y hasta 15 pases sucesivos. Posteriormente, a partir del cultivo enriquecido obtenido se inocularon *roll-tubes* de 30 ml y placas petri (con el mismo medio de cultivo) utilizando jarras anaeróbicas y jarras en condiciones de bajo vacío (entre 100 kPa y 100 Pa), hasta obtener colonias aisladas. Finalmente, las colonias aisladas se reinocularon en biorreactores con medio líquido (Volumen: 20 mL – 120 mL), se crecieron a 30°C (en el mismo medio de cultivo) y se seleccionaron los cultivos que producían más H₂ (medidos con MDA Scientific Midas® Gas Detector de Honeywell y con un cromatógrafo de gases Bruker 450-GC). A los cultivos puros productores de H₂, se les extrajo el ADN (Fast DNA spin kit for soil, MPbiomedical) y se realizó una amplificación del 16S rRNA por PCR (cebadores 27F de secuencia SEQ ID NO:1 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R de secuencia SEQ ID NO:2 (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) y se envió a secuenciar (kit BIGDYE). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante la herramienta informática Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y con *Ribosomal Database Project* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>), para determinar su filogenia (tabla 2). Con este procedimiento de aislamiento se obtuvieron varias cepas de microorganismos altamente productores de H₂ (tabla 2), ya que se eliminó el problema causado por la inhibición producida por la presión parcial de H₂.

Tabla 1: Medios utilizados en los ejemplos:

Medio Extracto de Carne (EC)*	Se empleó para el crecimiento de <i>Streptomyces</i> sp y productores de H ₂ *4g DQO/L	Solución Macronutrientes 1mL de Solución de Micronutrientes Componente Carbohidrato: 4g/l Extracto de carne Enrasado hasta 1000 mL con dH ₂ O
Medio Reactor (MR)*	Se empleó para el crecimiento y enriquecimiento de cultivos productores de H ₂ y en la formación de consorcios *4g DQO/L	Solución Macronutrientes 1mL de Solución de Micronutrientes Componente Carbohidrato: 2g/l Sacarosa Componente Proteica: 1g/L Extracto de carne; 0,5 g/l Extracto de levadura Enrasado hasta 1000 mL con dH ₂ O
Medio glucosa (MG)	Se empleo en el estudio de la cinética de crecimiento de los productores de H ₂ *4g DQO/L	Solución Macronutrientes 1mL de Solución de Micronutrientes Componente Carbohidrato: 4g/l Glucosa Enrasado hasta 1000 mL con dH ₂ O Ajustar a pH7 Esterilizar en autoclave (120°C; 0,5 atm; 20 min) o por filtración (22µM)
Medio LB (1X)	Se empleó para el crecimiento de la cepa EJ1	Bacto-triptona 10 g /L, Extracto de Levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L. Ajustar a pH7 Esterilizar en autoclave (120°C; 0,5 atm; 20 min)

Tabla 2: Relación de Microorganismos productores de H₂ aislados.

Ejemplo	Cepa	Organismo filogenéticamente más próximo	Semejanza (%)
	H5 CECT8187	<i>Clostridium roseum</i>	100
	H1 CECT8186	<i>Clostridium saccharobutylicum</i>	99
	R6 CECT8188	<i>Clostridium butyricum</i>	100
	RT2 CECT8189	<i>Clostridium diolis</i>	100

5 Optimización de los parámetros físico-químicos de la fermentación para los microorganismos productores de H₂ aislados.

Todos los ensayos se hicieron por triplicado. Se inocularon todos los biorreactores con un inóculo de Densidad Óptica (DO) inicial de 0,001 a 610 nm. Los ensayos para la optimización de pH (5; 5,5; 6,5; 7,5) se incubaron a 30°C. Los ensayos para la optimización de la temperatura se realizaron a pH inicial de 6,5 y se incubaron a 25 °C, 30 °C, 35°C y 40°C. Se tomaron muestras a las 14h, 24h y 48h (y en algunos casos 72h) de incubación, determinándose en todos los casos los siguientes parámetros: H₂ producido, pH del medio, densidad óptica del medio (DO), demanda química de oxígeno del medio (DQO), y productos finales de la fermentación. Las medidas de H₂ se hicieron mediante un detector MDA Scientific Midas® Gas Detector de Honeywell y/o mediante cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo Bruker 450-GC acoplado a un detector TCD, con columna Varian CP2056 0,6m x1/8" Ultimetall Cromosorb GHP 100-120, trabajando en bypass. Las temperaturas del inyector, detector y columna fueron de 150, 200 y 50 °C respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas portador con una velocidad de flujo de 25 ml min⁻¹. Las medidas de pH se realizaron con el pH-metro ThermoScientific-Orion 2STAR, la Densidad Óptica se determinó con un espectrofotómetro Pharmacia LKB-Novaspec II y la Demanda Química de oxígeno con un equipo Hatch. Se cuantificaron los productos finales de fermentación (ácidos orgánicos volátiles, glucosa y sus derivados metabólicos) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un equipo Varian Prostar con el fin de estudiar los productos de las fermentaciones. Los resultados más relevantes se muestran en la tabla 3:

Tabla 3: Parámetros de las cepas

Cepa	pH óptimo de crecimiento	Temperatura óptima de crecimiento (°C)	Producción media de H ₂ (mL H ₂ / g DQO eliminada)	Producción de otros elementos (mM)
H5 CECT8187	5,5 - 7,5	35	397	En medio MR: 18,8 ácido butírico; 4,2 ácido acético; 0,7 ácido propiónico
H1 CECT8186	5,5 - 7,5	35	252	En medio MR: 13 ácido butírico; 7,6 ácido acético; 2,7 etanol
R6 CECT8188	6,5	35	264	En medio MG: 1,7 ácido butírico; 7,2 ácido acético; 3,3 ácido propiónico; 4,6 etanol
RT2 CECT8189	6,5	35	475	En medio EC: 4,9 ácido acético; 18, 2 etanol
H5 CECT 8187 + EJ1 CECT8185	7,0	30-35	480	En medio EC: 0,09 ácido fórmico, 4,4 ácido acético; 19,9 ácido butírico; 2,6 Etanol.

De manera general se observó en todos los biorreactores, un aumento paralelo en la producción de H₂ y la densidad óptica (610 nm), con un descenso del pH del medio provocado por la producción de ácidos orgánicos.

30 Ejemplo 3: Formación de un consorcio microbiano entre un microorganismo productor de H₂ (cepa H5 CECT8187) y el microorganismo consumidor de oxígeno (*Streptomyces* cepa EJ1 CECT8185).

Se inocularon 100 µL de la Cepa H5 (CECT8187) en un biorreactor (120 mL) en condiciones anaeróbicas en medio glucosa (2 g DQO/L) y se complementó con solución macronutrientes (g/l) (NH₄Cl (0,20 -0,4), KH₂PO₄ (0,1 - 0,55), MgSO₄ ·7H₂O (0,1-0,4)) y micronutrientes (mg/l) (2 FeCl₂·4H₂O; 0,05 H₃BO₃; 0,05 ZnCl₂; 0,04 CuCl₂·2H₂O; 0,5 MnCl₂·6H₂O; 0,05 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O; 0,09 AlCl₃·6H₂O, 2 CoCl₂·6H₂O; 0,09 NiCl₂·6H₂O; 0,16 Na₂SeO₃·5H₂O; 1 EDTA; 0,2 resazurina), hasta alcanzar la fase exponencial. Las condiciones anaerobias se obtuvieron gasificando el espacio de cabeza con N₂:CO₂ (80:20), y añadiendo L-cisteína (0,5 g/L) al medio, dejándolo hasta que el indicador redox, la resazurina, vira de rosa a incoloro, síntoma de que no hay oxígeno libre en el medio.

Por otro lado, se inocularon 100 μ L de la Cepa EJ1 (CECT8185) en un biorreactor (250 mL) en condiciones aeróbicas en MR (4 g-DQO/L) ó Medio LB 1X, en condiciones de agitación entre 80 - 150 rpm hasta alcanzar la formación de la biopelícula esférica. Posteriormente se trituraron varias biopelículas del cultivo de *Streptomyces* Cepa EJ1 (CECT8185) y se mezclaron con la cepa H5 (CECT8187) en proporción de DO (610 nm) entre EJ1:H5 (Entre 1:1 hasta 1-1000). Esta mezcla de microorganismos se cultiva en un biorreactor discontinuo en un medio MR 4 g DQO/L, suplementado por las soluciones de micronutrientes y micronutrientes. Este MR tiene una concentración inicial de oxígeno disuelto de entre 1 - 10 mg de O₂/L de H₂O. El crecimiento del consorcio se hizo a 30°C y con agitación horizontal (50 – 200 rpm) con un tiempo promedio de 96 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se obtuvo una biopelícula esférica donde la cepa H5 ha sido aglutinada por *Streptomyces* cepa EJ1. Este hecho fue confirmado por las técnicas de FISH y DGGE. Estas biopelículas (H5-*Streptomyces*) se inocularon en un biorreactor (120 mL) en condiciones anaeróbicas en medio MR (4 g-DQO/L) y en poco tiempo se detecto una producción de H₂ superior a la registrada por el cultivo pura H5 en las misma condiciones (tabla 4).

Tabla 4: Producción de H₂ de la cepa H5(CECT8187), del consorcio H5(CECT8187)+EJ1(CECT8185), y del consorcio H5(CECT8187) + H1(CECT8186) + R6(CECT8188) + RT2(CECT8189) + EJ1(CECT8185)

Cepa	Producción media de H ₂ (mL H ₂ / g DQO eliminada)	Producción media de H ₂ (%)
H5 (CECT8187)	397	100%
H5(CECT8187) +H1(CECT8186) +R6(CECT8188) +RT2(CECT8189) + EJ1 (CECT8185)	1185	298%
H5 (CECT8187) +EJ1 (CECT8185)	480	120%

Ejemplo 4: Formación de un consorcio microbiano entre cuatro microorganismos productores de H₂ (clostridios cepas H5, H1, R6 y RT2) y el microorganismo consumidor de oxígeno (*Streptomyces* sp. cepa EJ1).

Se inocularon por separado 100 μ L de cada una de las cepas productoras de H₂ (H5, H1, R6 y RT2) en biorreactores (120 mL) en condiciones anaeróbicas en medio glucosa (4 g-DQO/L) y se complementó con solución macronutrientes y micronutrientes, hasta alcanzar la fase exponencial. Las condiciones anaerobias se obtuvieron gasificando el espacio de cabeza con N₂:CO₂ (80:20) y añadiendo L-cisteína (0,5 g/L) al medio, dejándolo hasta que el indicador redox, la resazurina, vira de rosa a incoloro, síntoma de que no hay oxígeno libre en el medio. Por otro lado, se inocularon 100 μ L de la Cepa EJ1 en un biorreactor (250 mL) en condiciones aeróbicas en medio MR (4 g-DQO/L) ó medio LB (1X), en condiciones de agitación entre 80 - 150 rpm hasta alcanzar la formación de la biopelícula esférica.

Posteriormente se trituraron varias biopelículas del cultivo de *Streptomyces* Cepa EJ1 y se mezclaron a la vez con las cuatro cepas H5, H1, R6 y RT2 en proporción de DO (610 nm) entre EJ1:H5:H1:R6:RT2 (1:10:10:10:10). Esta mezcla de microorganismos se cultiva en un biorreactor discontinuo en un medio MR (4 gDQO/L), suplementado por las soluciones de micronutrientes y micronutrientes. Este medio mixto tiene una concentración inicial de oxígeno disuelto de entre 1 - 10 mg de O₂/L de H₂O. El crecimiento del consorcio se realiza a 30°C y con agitación horizontal (50 – 200 rpm) a un tiempo promedio de 96 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se obtuvo una biopelícula esférica donde las cuatro cepas H5, H1, R6 y RT2 han sido aglutinadas por *Streptomyces* cepa EJ1. Este hecho fue confirmado por las técnicas de FISH y DGGE. Estas biopelículas (H5-H1-R6-RT2-*Streptomyces*) se inocularon en un biorreactor (120 mL) en condiciones anaeróbicas en medio mixto (4 gDQO/L) y en poco tiempo se detecto una producción de H₂ significativa superior a la producción de la cepa H5 de forma independiente (tabla 4).

Ejemplo 5: Aislamiento de la cepa *Streptomyces* sp. cepa EJ1.

Se inoculó entre 0,5 y 1 gramo de lodo granular anaerobio triturado en 100 ml de medio MR (4 g DQO/L) ó medio LB. Posteriormente se crecieron los organismos en condiciones aerobias a 30 °C durante 24 horas a 120 rpm en agitación horizontal. Los microorganismos formadores de flóculos se separaron del medio líquido y se realizaron aislamientos sucesivos en placa en condiciones aerobias a 30 °C hasta obtener cultivos puros. Estos cultivos axénicos se crecieron de nuevo en condiciones aerobias en medio MR a 30 °C, 120 rpm en agitación horizontal y se seleccionó la cepa que forma flóculos, en forma de biopelículas esféricas (figura 1). El análisis de su 16S rRNA demostró que se trataba de *Streptomyces* sp. (cepa EJ1 CECT 8185).

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Consorcio microbiano que comprende la cepa H5 de *Clostridium roseum* de número CECT 8187 y la cepa EJ1 de *Streptomyces* sp. de número CECT 8185.
- 2.- Consorcio microbiano según la reivindicación 1, que además comprende al menos otra cepa del género *Clostridium*.
- 10 3.- Consorcio microbiano según la reivindicación 2 donde la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número CECT8189 de *Clostridium diolis*.
- 4.- Composición que comprende un consorcio microbiano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5.- Uso del consorcio microbiano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de una composición según la reivindicación 4 para la producción de hidrógeno.
- 6.- Uso del consorcio microbiano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de una composición según la reivindicación 4 para la producción de ácidos orgánicos.
- 20 7.- Uso según la reivindicación 6 donde los ácidos orgánicos son ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico, ácido láctico, ácido fórmico y/o ácido succínico.
- 8.- Uso del consorcio microbiano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de una composición según la reivindicación 4 para la producción de disolventes.
- 25 9.- Usó según la reivindicación 8 donde los disolventes son etanol, metanol, acetona y/o butanol.
- 10.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 donde la producción de hidrógeno, de ácidos orgánicos y/o de disolventes tiene lugar por fermentación.
- 30 11.- Uso del consorcio microbiano o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 donde el sustrato inicial son residuos urbanos, residuos industriales y/o residuos agroindustriales.
- 35 12.- Uso del consorcio microbiano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de una composición según la reivindicación 4 para formación de biopelículas.
- 13.- Procedimiento de obtención de una cepa altamente productora de hidrógeno que comprende:
- 40 a) cultivar en un bioreactor en condiciones aerobias una muestra de lodo,
 b) aislar colonias presentes en el lodo de (a), y
 c) cultivar las colonias de (b) y seleccionar las cepas más productoras,
 caracterizado porque se lleva a cabo en condiciones de bajo vacío.
- 45 14.-Procedimiento según la reivindicación 13 donde la cepa altamente productora aislada en el paso (c) es la cepa H5 de *Clostridium roseum* CECT8187.
- 15.- Procedimiento de obtención de un consorcio microbiano que comprende obtener una cepa altamente productora de hidrógeno según la reivindicación 14 que además comprende:
- 50 d) cultivar lodo granular triturado en condiciones aerobias
 e) seleccionar los flóculos formados
 f) aislar en placa el microorganismo formador de los flóculos, que corresponde con *Streptomyces* sp. CECT8185
 g) mezclar las cepas de los pasos (c) y (f).
- 55 16.- Procedimiento según la reivindicación 15 donde en el paso (g) se mezcla además al menos otra cepa del género *Clostridium*.
- 60 17.- Procedimiento según la reivindicación 16 donde la cepa del género *Clostridium* es la cepa H1 de número CECT8186 de *Clostridium saccharobutylicum*, la cepa R6 de número CECT8188 de *Clostridium butyricum* y/o la cepa RT2 de número CECT8189 de *Clostridium diolis*.

FIG. 1 A

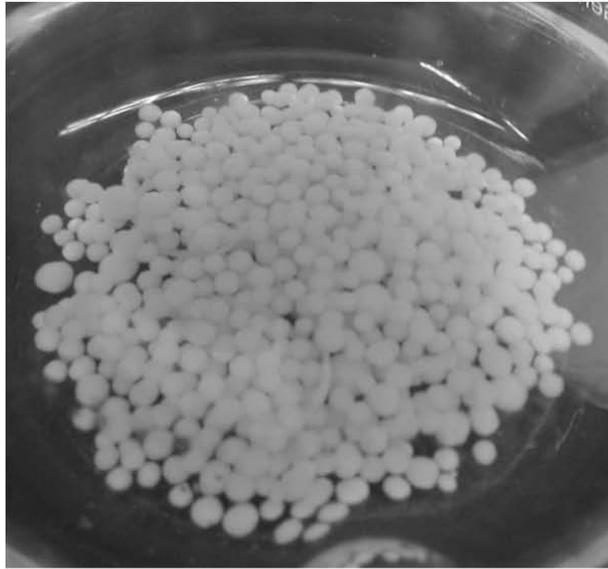


FIG. 1 B



ES 2 456 776 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid
MYGEN Laboratorio S.L.

<120> CONSORCIO MICROBIANO PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

<130> ES1595.42

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador 27F

<400> 1
agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador 1492R

<400> 2
tacggytacc ttgttacgac tt 22