



*Estudio de las causas de inestabilidad en la producción de  
bio – hidrógeno mediante fermentación oscura de  
carbohidratos*

Autora: Lic. Cs. Biol. Lucía Braga

Datos institucionales: Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Uruguay

Montevideo, 2017



***Título de la Tesis: Estudio de las causas de inestabilidad en la producción de biohidrógeno por fermentación oscura de carbohidratos***

Lic. Cs. Biol. Lucía Braga

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Magíster en Biotecnología, en el marco del programa del Posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias, UdelaR

**Directoras de Tesis:**

- Prof. Adjunto en Investigación, Dra. Elena Castelló.  
*Dpto. de Ingeniería de Reactores, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay.*
- Prof. Agregado en Investigación, Dra. Claudia Etchebehere.  
*Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay.*

**Tribunal:**

- Dra. Verónica Saravia.
- Dra. Ángela Cabezas.
- Dra. Sandra Maintinguer.

**Fecha y Lugar:** 2 de Octubre de 2017, Montevideo, Uruguay.

## Contenido

Agradecimientos .....	5
Índice de Figuras .....	6
Índice de Tablas.....	8
Lista de abreviaciones .....	9
Resumen de la Tesis .....	10
<b>1 – INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>12</b>
1.1 – El hidrógeno como energía .....	12
1.2 – Procesos de producción de hidrógeno.....	13
1.3 – Principios de la fermentación oscura de carbohidratos para producir hidrógeno .....	15
1.3.1 – Desintegración e hidrólisis .....	15
1.3.2 – Acidogénesis.....	15
1.3.3 – Acetogénesis .....	16
1.3.4 – Metanogénesis .....	16
1.4 – Reacciones involucradas en la producción de hidrógeno por fermentación oscura .....	17
1.4.1 – Reacciones productoras de hidrógeno.....	17
1.4.1 – Reacciones desfavorables para la producción de hidrógeno.....	22
1.5 – Microorganismos implicados en la producción de hidrógeno .....	23
1.5.1 – Microorganismos productores de hidrógeno. ....	24
1.5.2 – Microorganismos consumidores de hidrógeno .....	27
1.5.3 – Microorganismos competidores con la producción de hidrógeno .....	28
1.6 – Problemas asociados a la producción de hidrógeno por fermentación oscura.....	30
1.6.1 – Inestabilidad en la producción de hidrógeno por bacterias propiónicas.....	32
1.6.2 – Consumo de hidrógeno por homoacetogénesis .....	32
1.6.3 – Bacterias lácticas: ¿beneficiosas o perjudiciales? .....	35
1.7 – La producción de hidrógeno utilizando diferentes TRC .....	36
1.8 – Antecedentes del trabajo de Tesis .....	50
1.9 – Objetivo general de la Tesis .....	52
1.10 – Objetivos específicos de la Tesis .....	52
1.11 – Estrategia experimental .....	52
<b>2 - MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
2.1 - Operación del reactor CSTR a distintos tiempos de residencia celular. ....	55
2.2 – Inóculo y alimentación utilizada.....	56
2.3 – Monitoreo del líquido y del biogás.....	58

2.4 – Balance de electrones .....	59
2.4 – Análisis microbiológicos .....	61
2.5 – Análisis Estadísticos y Multivariados .....	64
3 – RESULTADOS.....	66
3.1 – Producción de Biogás .....	66
3.2 – Balance de electrones .....	68
3.2.1 – Remoción de glucosa y formación de biomasa .....	68
3.2.2 – Metabolitos producidos. ....	69
3.3 – Rendimiento en H <sub>2</sub> estequiométrico vs Rendimiento en H <sub>2</sub> experimental.....	71
3.4 – Análisis de la comunidad microbiana.....	76
3.4.1 – Análisis de la de la comunidad microbiana mediante T-RFLP del gen del ARNr de 16S.....	76
3.4.2 – Análisis de los microorganismos presentes en la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva de genes del ARNr de 16S .....	82
4. DISCUSIÓN.....	92
4.1 –Efecto del TRC sobre la producción de H <sub>2</sub> .....	92
4.2 – Influencia del TRC en las vías metabólicas .....	94
4.2.1 – Productos de fermentación.....	94
4.2.2 – Balance de electrones .....	96
4.3 – Remoción de glucosa y producción de biomasa en los diferentes TRC .....	97
4.4 – Comunidades microbianas seleccionadas en las operaciones con diferentes TRC .....	98
4.5 – Rol de microorganismos detectados en las comunidades microbianas .....	99
4.5.1 – Microorganismos productores de H <sub>2</sub> : <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , <i>Veilloneaceae</i> .....	100
4.5.2 – Microorganismos competidores por sustrato.....	102
4.5.3 – Microorganismos consumidores de H <sub>2</sub> .....	104
5 – Conclusiones generales y perspectivas a futuro .....	109
5.1 – Conclusiones Generales .....	109
5.2 – Perspectivas de trabajo a futuro .....	110
6 – REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	113
ANEXO I: Reporte de la pasantía realizada en el LBE, INRA, Narbonne, Francia. ....	131
ANEXO II: Resúmenes presentados en Congresos .....	154
AII.1 – Resumen presentado en el II Encuentro de Jóvenes Microbiólogos, Montevideo, Uruguay, 2016. ....	154
AII.2 – Resumen presentado en el Congreso Nacional de Biociencias, Montevideo Uruguay, 2017.....	155
Anexo III.....	157

AIII – Referencia de ecuaciones .....	157
AIII.1 – Introducción .....	157
AIII.2 – Materiales y Métodos .....	158
AIII.3 – Resultados .....	159
AIII.4 – Discusión .....	159

## Agradecimientos

En esta sección me gustaría agradecer a quienes de alguna manera u otra me han ayudado a la escritura y realización de esta tesis.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por financiar el proyecto de Investigación ANII – FSE 102488, en el cual estuvo enmarcada la tesis.

A las Instituciones donde se realizó la misma: El Laboratorio de Biotecnología y Procesos del Ambiente de la Facultad de Ingeniería y El Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”.

A mis dos tutoras Elena y Claudia por la paciencia, la confianza y principalmente por transmitirme sus conocimientos, enseñarme a investigar e inspirarme para que siga esta carrera.

Al tribunal Ángela Cabezas, Verónica Saravia y Sandra Maintinguer por sus valiosos aportes a la Tesis y por haber accedido a corregirme la Tesis tan velozmente.

A la embajada de Francia por financiar mi pasantía en el Laboratorio de Biotecnología del INRA en Narbonne y al Dr. Eric Trably por recibirme en su laboratorio en el LBE y guiarme durante el proyecto realizado.

A Djalma por los conocimientos transmitidos durante mi pasantía en el LBE y a Clémence por la ayuda brindada a la hora de realizar el trabajo en el laboratorio durante esta pasantía.

A la Red Cyted Tritón por financiar la pasantía de Clara Reino.

A Clara y a Vane por operar el reactor con TRC = 24 horas mientras estaba haciendo la pasantía. A Vane de nuevo por su ayuda durante las otras operaciones del reactor, el procesamiento de las muestras y de los datos.

A mis compañeros de la biblio, del Cante y del LEM por la buena disposición para ayudarme a procesar los datos de la tesis, pero más que nada por los buenos momentos compartidos tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mi familia y a mis amigos por su apoyo incondicional a través de los años.

Y a Flo por su amor y contención a pesar de la distancia.

## Índice de Figuras

Capítulo I	INTRODUCCIÓN GENERAL	Página
Figura 1.1	Procesos biológicos de generación de H <sub>2</sub>	13
Figura 1.2	Cadena de degradación anaerobia	17
Figura 1.3	Vías metabólicas de producción de H <sub>2</sub>	21
Capítulo II	MATERIALES Y MÉTODOS	
Figura 2.1	Esquema de configuración del reactor	55
Capítulo III	RESULTADOS	
Figura 3.1	Velocidad de la producción de H <sub>2</sub> de las tres operaciones	67
Figura 3.2	Boxplot realizado con los resultados de la VPH <sub>2</sub> y el RH <sub>2</sub> de las tres operaciones	68
Figura 3.3	Concentración de SSV en el reactor	69
Figura 3.4	Balace de e <sup>-</sup> de las diferentes operaciones	70
Figura 3.5	RH <sub>2</sub> experimental vs. RH <sub>2</sub> estequiométrico	72 y 73
Figura 3.6	Relación RH <sub>2</sub> exp./RH <sub>2</sub> esteq. en las diferentes operaciones	75
Figura 3.7	RH <sub>2</sub> estequiométrico vs. RH <sub>2</sub> máximo teórico de la fermentación oscura	76
Figura 3.8	Abundancia relativa de los T – RF obtenidos mediante el análisis de T – RFLP del gen del ARNr de 16S	77
Figura 3.9	Índice de Shannon e índice de equidad calculados a partir de los resultados obtenidos por T – RFLP del gen del ARNr de 16S	78
Figura 3.11	Análisis de componentes principales realizado con los datos obtenido por el análisis de T – RFLP del gen del ARNr de 16S	79
Figura 3.12	Matriz de correlaciones de Pearson entre los datos de la comunidad microbiana de las operaciones realizadas analizadas por T – RFLP del gen del ARNr de 16S y los datos de la producción de H <sub>2</sub> y metabolitos	80
Figura 3.13	Análisis de correspondencia canónica entre los datos de la comunidad microbiana de las operaciones realizadas analizadas por T – RFLP del gen del ARNr de 16S y los datos de la producción de H <sub>2</sub> y metabolitos	81
Figura 3.14	Curvas de rarefacción obtenidas en el análisis de secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S	83
Figura 3.15	Abundancia relativa de OTUs y Abundancia relativa de géneros obtenidos por la secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S	84
Figura 3.16	Abundancia relativa de los géneros encontrados en el análisis por secuenciación masiva y los valores de VPH <sub>2</sub>	87
Figura 3.17	Árbol filogenético realizado con las secuencias de las OTUs y la secuencias correspondientes a su microorganismo más emparentado	90

Capítulo IV	DISCUSIÓN	
Figura 4.1	Boxplot realizado con valores de RH <sub>2</sub> obtenidos de la bibliografía	92
ANEXO I		
Figure 1	MEtabolites produce by the operaed reactors	137 y 138
Figure 2	CE – SSCP Dendogram of the bacterial community of some samples of the operated reactors	140
Figure 3	Relative abundance of the CE – SSCP peaks	141
Figure 4	PCA of the CE – SSCP analysis data	142
Figure 5	CE – SSCP dendogram of the analysis of the <i>hydA</i> gene	143
Figure 6	Relative abundance of the <i>hydA</i> gene in the microbial community	144
Figure 7	PCA of the CE – SSCP <i>hydA</i> obtaines data	145
Figure 8 – 10	Biogas production of the rectora and the suggested sampling for further microbial community analysis	146 – 147

## Índice de Tablas

Capítulo I	INTRODUCCIÓN GENERAL	Página
Tabla 1.1	Comparación del $\Delta G^\circ$ de las reacciones consumidoras de $H_2$	23
Tabla 1.2	Valores de $V_{PH_2}$ , $R_{H_2}$ , metabolitos producidos y microorganismos encontrados reportados en bibliografía	38
Capítulo II	MATERIALES Y MÉTODOS	
Tabla 2.1	Operaciones fallidas del reactor CSTR operado con compost	56
Tabla 2.2	Concentraciones de glucosa utilizadas en las operaciones de arranque del reactor en secuencia batch y en las operaciones en continuo. Duración de cada una de las operaciones.	58
Capítulo III	RESULTADOS	
Tabla 3.1	Valores máximos y mínimos de % $H_2$ en el biogás, $V_{PH_2}$ y $R_{H_2}$ de las operaciones realizadas con diferente TRC	66
Tabla 3.2	Valores obtenidos del cociente entre el $H_2$ producido experimentalmente y el acetato y butirato producidos en cada una de las operaciones	74
Tabla 3.3	Abundancia relativa de los géneros encontrados por secuenciación masiva en las muestras analizadas y sus principales productos de fermentación según la bibliografía	85
Tabla 3.4	Secuencias de las OTUs obtenidas en el análisis de secuenciación masiva	88 y 89
Capítulo IV	DISUSIÓN	
Tabla 4.1	Coefficiente de variación calculado para las concentraciones de SSV de las operaciones	97
ANEXO I		
Table 1	Experimental set – up conditions	134
Table 2	Volumetric hydrogen production rate and Hydrogen yield of the operated reactors	137

## Lista de abreviaciones

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGV	Ácidos grasos volátiles
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico riosomal
CSTR	Continous stirred tank reactor, en español: reactor de tanque agitado
CE-SSCP	Capillary Electrophoresis – single strand conformation polymorphism
DQO	Demanda química de oxígeno
FISH	Fluorescence in situ hybridization
HAc	Producción de ácido acético cuantificado en mol d <sup>-1</sup>
HBu	Producción de ácido butírico cuantificado en mol d <sup>-1</sup>
HPr	Producción de ácido propiónico en cuantificado en mol d <sup>-1</sup>
HRT/TRH	Hydraulic retention time / Tiempo de retención hidráulico
mol glu_C	Mol de glucosa consumida
MM	Medio mineral
OTU	Operational taxonomic unit, en español: Unidad taxonómica operacional
PCR – DGGE	Polymerase chain reaction – Denaturing gradient gel electrophoresis
RH <sub>2</sub>	Rendimiento en H <sub>2</sub> cuantificado en mol H <sub>2</sub> producido por mol de glucosa consumida
RH <sub>2</sub> exp.	Rendimiento en H <sub>2</sub> experiemetal
RH <sub>2</sub> esteq.	Rendimiento en H <sub>2</sub> estequiométrico
RFLP	Restriction fragment lenght polymorphism
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
TA	Tratamiento ácido
TT	Tratamiento térmico
TRC	Tiempo de residencia celular
T – RFLP	Terminal restriction fragment polymorphism
VPH <sub>2</sub>	Velocidad de producción de H <sub>2</sub> cuantificada en LH <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket, en español: reactor anaerobio de flujo ascendente

## Resumen de la Tesis

El hidrógeno es una fuente de energía limpia y sustentable. Su utilización no genera gases con efecto invernadero y su producción sería inagotable, al contrario de los combustibles fósiles.

El hidrógeno se puede producir mediante el proceso biológico llamado fermentación oscura. El desafío de este proceso es seleccionar las bacterias productoras de hidrógeno y evitar los microorganismos que consumen hidrógeno así como otras bacterias no productoras de hidrógeno que compiten por el sustrato. Para ello se ha estudiado el uso de diferentes inóculos y diferentes condiciones de operación de los biorreactores. Si bien se ha demostrado la factibilidad del proceso para diferentes aguas residuales, no se han encontrado aún las condiciones para obtener un proceso estable. Se postula que la inestabilidad del proceso de producción de hidrógeno podría ser debido a la presencia de bacterias lácticas que compiten por el sustrato y/o bacterias que consumen hidrógeno por homoacetogénesis. El tiempo de residencia celular podría influir en la prevalencia de estos microorganismos en los reactores. En este trabajo nos planteamos estudiar la relevancia de la fermentación láctica y de la homoacetogénesis en la producción de hidrógeno a diferentes tiempos de residencia celular utilizando un reactor de tanque agitado (CSTR).

Para ello se realizaron tres operaciones utilizando diferente tiempo de residencia celular (6, 10 y 24 horas). Para evitar variaciones provenientes del sustrato, se utilizó una alimentación sintética a base de glucosa. Las operaciones fueron monitoreadas mediante medida del volumen, composición del biogás producido y concentración de los ácidos orgánicos producidos. La comunidad microbiana se analizó por T-RFLP y secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S.

Los resultados muestran que la producción de hidrógeno y la estabilidad de las operaciones dependieron del tiempo de residencia celular empleado. La mayor velocidad de producción de  $H_2$  se obtuvo cuando se utilizó un TRC de 24 h ( $2,84 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ) así como también el mejor rendimiento ( $0,65 \text{ mol H}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glu}_C$ ). Aunque, esta operación fue la más inestable, presentando una mayor dispersión de los datos de  $VPH_2$  y  $RH_2$ . Esto podría explicarse por la alternancia de dominancias en la comunidad microbiana durante períodos de alta y baja producción de hidrógeno, lo que se observó en el análisis de T – RFLP. Mediante secuenciación masiva se detectó, en todas las operaciones microorganismos del género *Lactobacillus*, llegando a dominar en todas las muestras con una abundancia de entre 60 y 90 % en la comunidad. Este resultado explica la predominancia de la fermentación láctica en todas las operaciones. Realizando una correlación entre el  $H_2$  experimental y el calculado estequiométricamente a partir de los metabolitos detectados, se detectó que hubo consumo de hidrógeno por homoacetogénesis en todas las operaciones, siendo más significativo en la operación con TRC 6 horas y 10 horas.

En conclusión, el TRC tiene una importante influencia sobre la producción de hidrógeno afectando la vía metabólica que prevalece en el reactor. Utilizando TRC largos se favorece la fermentación láctica con producción de hidrógeno mayor pero muy inestable, mientras que utilizando TRC cortos el proceso es más estable pero con menor eficiencia debido a la prevalencia de la homoacetogénesis. El control de estos dos procesos, que afectan la producción de hidrógeno, es crucial para lograr procesos estables que puedan ser utilizados a gran escala.

# Capítulo I – INTRODUCCIÓN GENERAL

# 1 – INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1 – El hidrógeno como energía

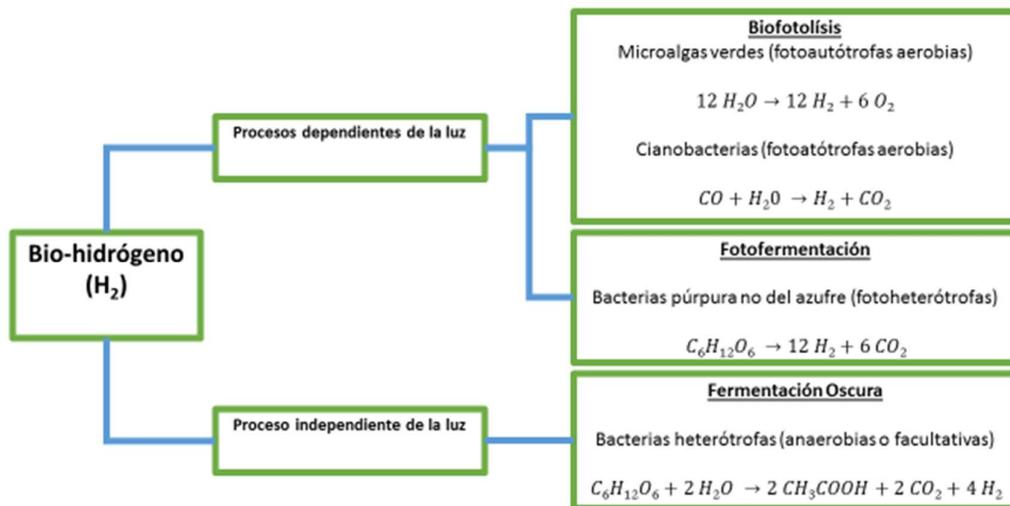
La demanda de energía va en aumento año a año y los combustibles fósiles siguen dominando la matriz energética mundial desde el siglo XX (Statistical Review of World Energy, 2017; Balat et al., 2010; Ruggeri et al., 2015). El uso excesivo de combustibles fósiles tiene impactos negativos en el ambiente debido a las emisiones de CO<sub>2</sub> y otros gases contaminantes como óxidos de carbono, azufre o nitrógeno; que contribuyen al efecto invernadero y así al cambio climático a nivel mundial (Dutta et al., 2014). Por otro lado, los combustibles fósiles son recursos finitos y solo algunos países los comercializan, por lo que la inestabilidad en los precios y la necesidad de independencia energética de dichos países proveedores han llevado a la búsqueda de diferentes fuentes de energías limpias y renovables (Ghimire et al., 2015; Tapia – Venegas et al., 2015a; Bundhoo et al., 2016).

La eficiencia energética de un combustible se mide por su relación H/C, cuánto más alta la relación, mayor es la eficiencia energética del combustible y menor es la cantidad de CO<sub>2</sub> que produce su combustión. El hidrógeno es un portador de energía interesante, ya que no tiene átomos de carbono en su composición por lo que la relación H/C es la máxima que puede tener un combustible (Balanchadar et al., 2013). Al ser un combustible libre de carbono la utilización del hidrógeno no contribuye al calentamiento global, a la lluvia ácida, ni destruye la capa de ozono; solamente genera agua, que luego puede ser reutilizada para generar más hidrógeno (Kapdan & Kargi, 2006). Además, es el combustible que tiene el mayor rendimiento en energía por unidad de masa (122 kJ g<sup>-1</sup>) de todos los combustibles conocidos hasta el momento (Dutta et al., 2014; Singh et al., 2015). Sin embargo, el hidrógeno gas no se encuentra libre en la naturaleza, por lo tanto el mayor desafío que tiene la producción de hidrógeno es encontrar una manera sustentable de producción y almacenamiento (Ghimire et al., 2015).

## 1.2 – Procesos de producción de hidrógeno

El hidrógeno puede ser generado a partir del gas natural y el petróleo por procesos de reformado, por gasificación de carbón o por electrólisis del agua, pero estos procesos utilizan energías no renovables y necesitan un gran aporte de energía, ya sea eléctrica (cuando no proviene de fuentes renovables como energía eólica o hidráulica) o calorífica para producir hidrógeno. No obstante, para que el H<sub>2</sub> sea un combustible limpio y sustentable debería ser producido por procesos que minimicen o no generen emisiones de CO<sub>2</sub> y que sean independientes de las reservas de combustibles fósiles (Ghimire et al; 2015).

El hidrógeno puede ser generado en procesos biológicos que son sustentables, amigables con el ambiente y pueden ser llevados a cabo por microorganismos que pueden vivir a temperatura ambiente y presión atmosférica (figura 1.1) (Das & Veziroglu, 2008; Wang et al., 2009). El CO<sub>2</sub> generado por estos procesos no contribuye al calentamiento global ya que su generación es parte del ciclo del carbono (Hawkes et al., 2007).



**Figura 1.1** – Procesos biológicos de generación de hidrógeno (Hallenbeck et al., 2009; Ghimire et al., 2015).

Existe una gran diversidad de microorganismos que pueden producir hidrógeno. Este puede ser generado por microorganismos fotosintéticos aerobios o anaerobios, en procesos que dependen de la luz o por microorganismos organótrofos anaerobios estrictos o facultativos

(figura 1.1). Los microorganismos fotosintéticos generadores de hidrógeno pueden ser tanto autótrofos como heterótrofos. Estos generan  $H_2$  utilizando energía proveniente de la fotosíntesis, ya sea a partir del  $H_2O$  (biofotólisis) o de un compuesto orgánico (fotofermentación). Estos procesos tienen la ventaja de que su materia prima es abundante (agua o algunas aguas residuales) y se generan productos simples como el  $H_2$ , el  $CO_2$  y el  $O_2$ . Las principales desventajas que presentan estos procesos son la baja eficiencia de conversión de la luz, la complejidad en el diseño y en el manejo de los reactores, las bajas tasas experimentales de producción de hidrógeno y además las enzimas involucradas en la formación de hidrógeno son sensibles al  $O_2$  y son inactivadas en presencia de bajas concentraciones del mismo (Hallenbeck et al., 2009; Hallenbeck et al., 2012; Elsharnouby et al., 2013).

Los microorganismos organótrofos productores de hidrógeno son anaerobios estrictos o facultativos y generan hidrógeno como producto de fermentación al degradar la materia orgánica, proceso que se denomina fermentación oscura.

La fermentación oscura es un proceso independiente de la luz, lo que disminuye costos y permite un diseño de infraestructura y operación más sencillo. Las enzimas involucradas en la generación de hidrógeno no podrán ser inactivadas por presencia de  $O_2$ , ya que el proceso ocurre en anaerobiosis (Hallenbeck et al., 2012). Permite la revalorización de los residuos porque se pueden utilizar desechos ricos en carbohidratos como materia prima y tiene una tasa de generación de hidrógeno mayor que la de los otros procesos (Wang et al., 2009; Lee et al., 2011; Balanchadar et al., 2013; Elsharnouby et al., 2013).

Dadas sus características, la fermentación oscura sería el proceso más promisorio para producir hidrógeno de manera biológica (Hallenbeck et al., 2012).

## 1.3 – Principios de la fermentación oscura de carbohidratos para producir hidrógeno

El proceso de producción de hidrógeno mediante fermentación oscura de carbohidratos se basa en la cadena de degradación anaerobia de la materia orgánica.

Este proceso ocurre en ausencia de aceptores externos de electrones (ej:  $O_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ). En la cadena de degradación anaerobia, la materia orgánica se va degradando en etapas, (desintegración e hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis), hasta formar  $CH_4$  y  $CO_2$  (figura 1.2) por la acción coordinada de diferentes grupos de microorganismos:

### 1.3.1 – Desintegración e hidrólisis

Primero ocurre la desintegración del material complejo particulado (por ejemplo desechos industriales) en polisacáridos, proteínas, lípidos y en material soluble inerte. Estos polímeros (almidón, celulosa, etc.) generados son hidrolizados en monómeros (mono o disacáridos, péptidos, aminoácidos, ácidos grasos y glicerol). Esta etapa es llevada a cabo por diversos grupos de microorganismos. En los reactores anaerobios los microorganismos más comúnmente encontrados son de los Filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fibrobacter*, *Spirochaetes* y *Thermotogae* (Azman et al., 2015).

### 1.3.2 – Acidogénesis

Los monómeros generados son fermentados produciendo ácidos grasos volátiles, lactato,  $H_2$  y alcoholes. Esta etapa es llevada a cabo por microorganismos denominados fermentadores primarios. Pueden ser tanto aerobios, anaerobios facultativos o anaerobios estrictos, como por ejemplo los géneros: *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Propionibacterium*, *Citrobacter* y *Alcaligenes* que son fermentadores de azúcares, proteínas y lípidos (Li et al., 2007; Christy et al., 2014).

### 1.3.3 – Acetogénesis

Los ácidos grasos volátiles, el lactato y el H<sub>2</sub> generados en la etapa anterior son fermentados por los microorganismos acetogénicos, en reacciones endergónicas dando acetato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> como productos principales. Esta etapa es realizada por microorganismos denominados fermentadores secundarios o sintróficos (Schink et al., 1997). Los microorganismos sintróficos, deben asociarse con otros microorganismos que consuman el hidrógeno que ellos producen para que su crecimiento sea posible (Madigan et al., 2015). En la cadena de degradación anaerobia, los microorganismos sintróficos se asocian con los microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos. Mediante el mecanismo de transferencia interespecífica de hidrógeno, le transfieren el hidrógeno producido para que lo consuman y formen CH<sub>4</sub> en una reacción exergónica que permite el crecimiento de ambos microorganismos. Se postula que es posible que esta transferencia también ocurra con microorganismos homoacetogénicos, pero aún no se ha documentado este hecho (Dinamarca & Bakke, 2009; Christy et al., 2014). Algunos microorganismos sintróficos descritos pertenecen a los géneros *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Syntrophobotulus*, *Syntrophus*, *Desulfovibrio*, *Thermoanaerobium*, *Pelobacter* y *Clostridium* (Schink, 1997, Madigan et al., 2015).

### 1.3.4 – Metanogénesis

La última etapa de la degradación anaerobia es la metanogénesis. Este proceso se lleva a cabo por microorganismos del dominio *Archaea*, que producen metano a partir de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos) o a partir de acetato (microorganismos metanogénicos acetoclásticos). Algunos géneros de arqueas metanogénicas descritos son *Methanobacterium*, *Methanocaldococcus*, *Methanosarcina*, *Methanoplanus*, *Methanospirillum* (Madigan et al., 2015).

Existe una estrecha dependencia entre los grupos microbianos de la cadena de degradación anaerobia, ya que los productos generados en una etapa son los sustratos de la siguiente y a su vez es necesario que dichos productos sean consumidos para que el proceso continúe (Schink,

1997).

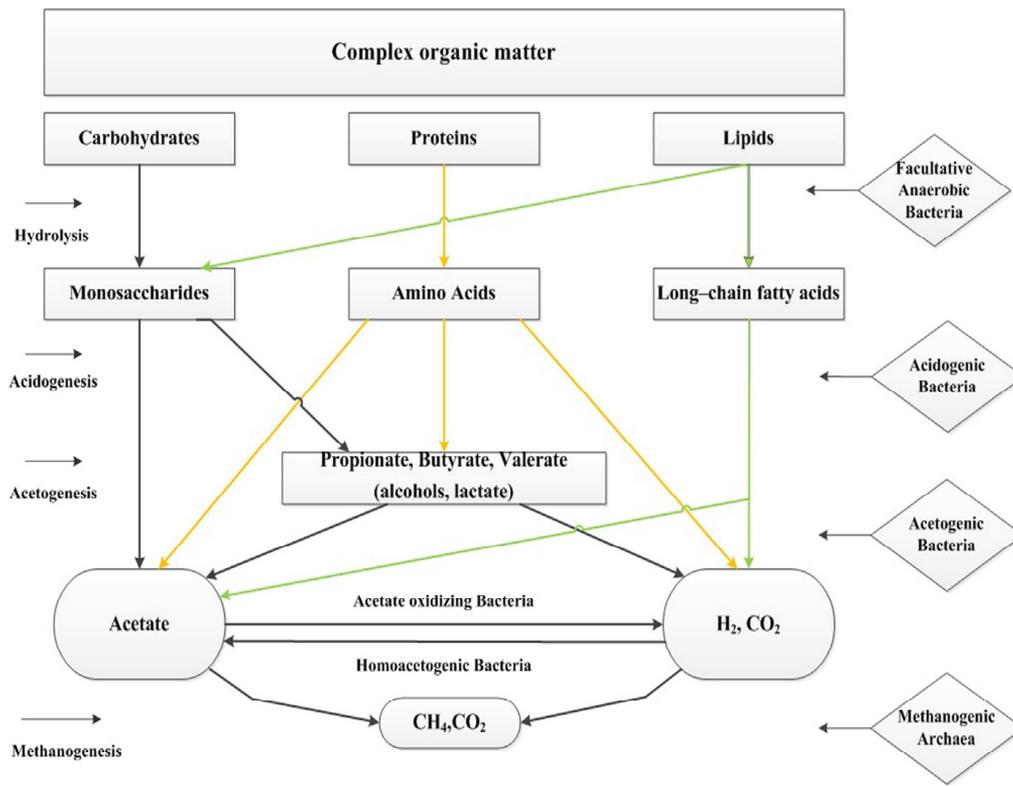


Figura 1.2 – Cadena de degradación anaerobia (Christy et al., 2014)

## 1.4 – Reacciones involucradas en la producción de hidrógeno por fermentación oscura

El hidrógeno es un intermediario reducido en la cadena de degradación anaerobia y sirve de sustrato para las etapas siguientes de la cadena. Es decir que, existen reacciones que generan hidrógeno y reacciones que lo consumen.

### 1.4.1 – Reacciones productoras de hidrógeno

El hidrógeno es formado por reacciones de fermentación en la etapa de acidogénesis de la cadena de degradación anaerobia.

La fermentación es un proceso redox que ocurre en ausencia de aceptores de electrones externos y los protones ( $H^+$ ) generados de la oxidación del sustrato fermentado actúan como aceptores de electrones y se reducen para reoxidar el NADH a  $NAD^+$  o la ferredoxina reducida

(Fd<sub>red</sub>) a ferredoxina oxidada (Fd<sub>ox</sub>), esta reacción da como resultado la formación de H<sub>2</sub> (Das & Veziroglu, 2008; Wang et al., 2009). La generación de hidrógeno sucede por la acción de metaloenzimas denominadas hidrogenasas.

Las hidrogenasas descritas hasta el momento se clasifican en tres clases según el contenido metálico presente en sus sitios de unión al hidrógeno: [NiFe], [FeFe] y [Fe] hidrogenasas (Greening et al., 2016). Estas enzimas son funcionalmente muy versátiles; como se mencionó anteriormente, generan H<sub>2</sub> para regenerar el poder reductor producto de la fermentación anaerobia y la fotofermentación. Por otro lado, también pueden consumir H<sub>2</sub> generando electrones que pueden ser utilizados para la fijación de carbono o transportados por cadenas respiratorias para conservar energía en forma de ATP (Schwartz et al., 2013). Algunas hidrogenasas son parte de complejos enzimáticos translocadores de iones de bajo potencial que utilizan los protones como aceptores de electrones. Estos complejos están involucrados en la conservación de energía en algunas especies microbianas. Este proceso se denomina bifurcación de electrones y se teoriza que fue uno de los primeros procesos de conservación de energía en los seres vivos (Buckel & Thauer, 2013).

Las vías metabólicas de producción de hidrógeno a partir de la fermentación de glucosa en condiciones anaerobias dependen del metabolismo de los microorganismos implicados en el proceso. En la mayoría de los microorganismos la glucosa es transformada en piruvato mediante la vía Embden – Meyerhof (glucólisis) o la vía de Entner – Doudoroff, en estas vías se produce también ATP y NADH (Angenent et al., 2004).

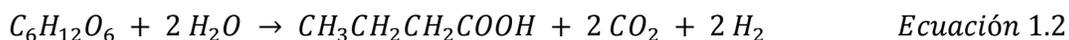
El piruvato puede ser transformado en acetyl-CoA y CO<sub>2</sub> generando una molécula de Fd<sub>red</sub>. Esta vía es catalizada por la enzima piruvato ferredoxina oxido – reductasa o PFOR. Luego la Fd<sub>red</sub> es nuevamente oxidada por una enzima [FeFe] hidrogenasa dependiente de ferredoxina. En los microorganismos anaerobios estrictos del género *Clostridium* el hidrógeno es generado por esta vía. Por otro lado, el piruvato también puede formar acetyl – CoA y formiato, luego el formiato puede ser convertido en H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por la vía piruvato – formiato liasa o PFL. En esta vía actúa el

complejo enzimático FHL formado por la enzima formiato – hidrógeno liasa y una [NiFe] hidrogenasa dependiente de formiato (Ech hidrogenasa). Esta vía de generación de hidrógeno está presente en las bacterias anaerobias facultativas, como las Enterobacterias (por ejemplo, *Esterichia coli*) (Tapia – Venegas et al., 2015a; Cabrol et al., 2017).

El acetil – CoA resultante de estas reacciones luego es oxidado a acetato formando una molécula de ATP. El poder reductor (NADH) generado en estas reacciones debe ser reutilizado de manera de que la glucólisis no se trunque. El NADH puede ser reoxidado por dos enzimas hidrogenasas adicionales en los microorganismos del género *Clostridium*, una hidrogenasa NADH – dependiente (NADH – [FeFe] hidrogenasa) y una hidrogenasa NADH – Fd<sub>red</sub> dependiente (NADH – Fd<sub>red</sub> – [FeFe] hidrogenasa) y producir hidrógeno al regenerar el NAD<sup>+</sup> (Hallenbeck et al., 2012) (Figura 1.3). Esta reacción da como producto final acetato y permite alcanzar el máximo rendimiento en hidrógeno de 4 moles de H<sub>2</sub> por mol de glucosa consumida (Ecuación 1.1). Sin embargo, esta reacción sucede solamente cuando la presión parcial de H<sub>2</sub> es < a 6,0 x 10<sup>-4</sup> atm y cuando no hay crecimiento de microorganismos (Angenent et al; 2004). Este rendimiento es el máximo de hidrógeno que se puede alcanzar mediante fermentación oscura.



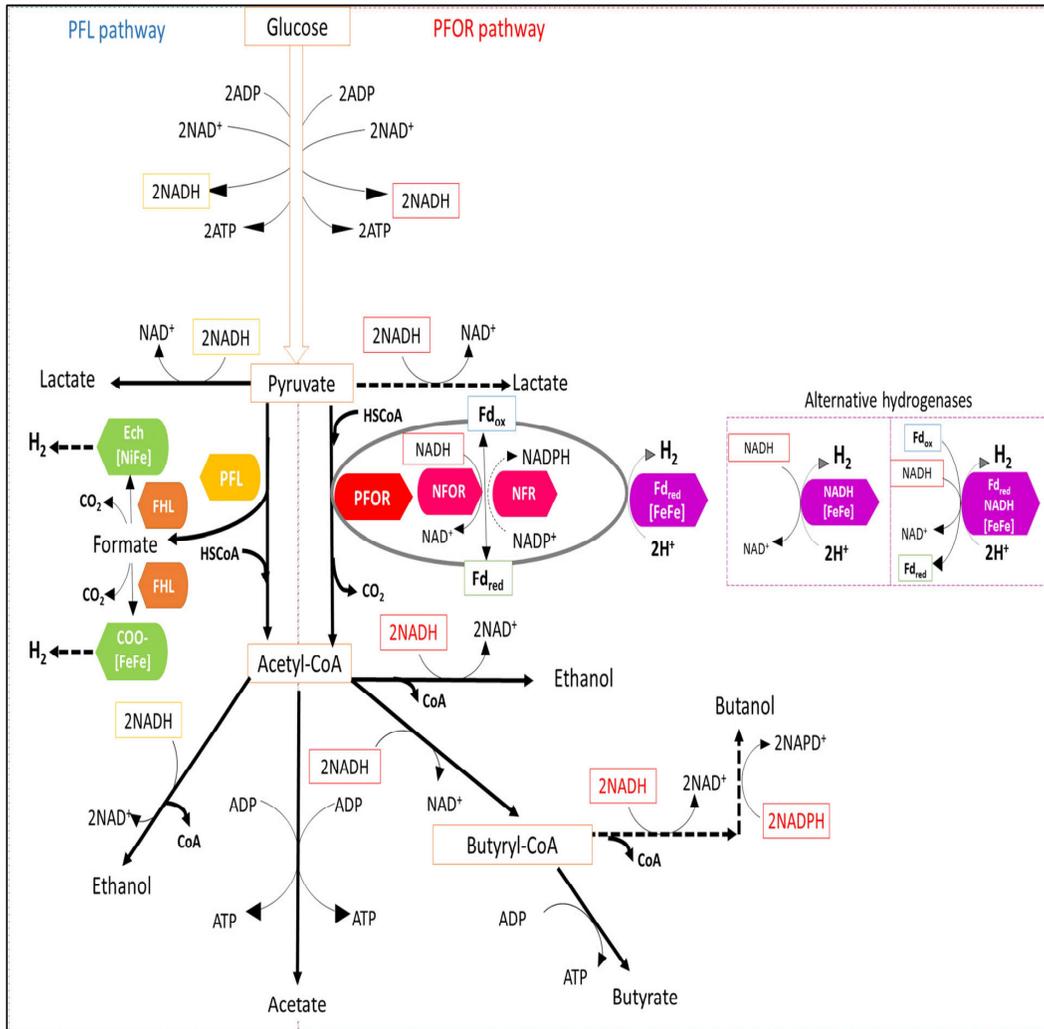
Si la presión parcial de H<sub>2</sub> es mayor a 6,0 x 10<sup>-4</sup> atm, el NADH es regenerado mediante la reducción del acetil – CoA en otros metabolitos distintos del acetato, como el butirato (Ecuación 1.2).



Estos son los productos más comunes en las fermentaciones del género *Clostridium* al generar hidrógeno. Los microorganismos que generan hidrógeno por la vía metabólica del complejo

enzimático PFL, producen hasta 2 moles de hidrógeno por mol de glucosa consumida, ya que no poseen las hidrogenasas necesarias para oxidar el NADH en más hidrógeno (Tapia – Venegas et al., 2015a; Ghimire et al., 2015). En estos microorganismos el acetil – CoA puede ser reducido en acetato o etanol (Figura 1.3).

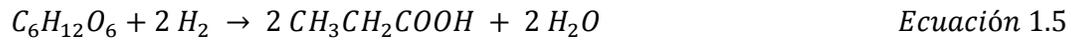
En un proceso de producción de hidrógeno mediante fermentación oscura el rendimiento en hidrógeno es menor que el rendimiento máximo teórico aquí mencionado. En general, varía entre 0,5 – 2,5 moles de H<sub>2</sub> por mol de glucosa consumida (tabla 1.2). El bajo rendimiento de este proceso se debe a que parte de la energía que proviene del sustrato empleado es utilizada para generar nuevos microorganismos y dependiendo de los microorganismos presentes en el proceso puede ser usada para la generación de otros productos metabólicos que no involucran la formación de H<sub>2</sub>. Los rendimientos teóricos solo pueden llevarse a cabo en condiciones cercanas al equilibrio lo que implica una generación de hidrógeno lenta (97,8 μmol/h) y presiones parciales de H<sub>2</sub> bajas (menores a  $6,0 \times 10^{-4}$  atm), estas premisas son muy difíciles de conseguir en las condiciones de operación de un reactor hidrogenogénico (Woodward et al., 2000; Angenent et al., 2004; Hawkes et al., 2007).



**Figura 1.3** – Vías metabólicas de generación de hidrógeno durante la fermentación anaerobia. PFOR: Vía de la piruvato ferredoxina óxido reductasa presente en bacterias anaerobias estrictas (ej. *Clostridium* spp). En esta vía el hidrógeno es generado por oxidación de la ferredoxina mediante una hidrogenasa dependiente de ferredoxina (Fd – [FeFe]) u oxidando el NADH, ya sea reduciendo ferredoxina (NFOR) o directamente reduciendo las hidrogenesas (NADH - [FeFe]). El NADH también puede ser usado como un co – sustrato de reducción de la ferredoxina (Fd-NADH-[FeFe]) para formar hidrógeno. El exceso de NADH es utilizado para formar metabolitos más reducidos que el acetato como butirato o etanol. PFL: Vía de la piruvato formiato liasa presente en microorganismos anaerobios facultativos (ej. Enterobacterias). El complejo FHL está formado por la enzima formiato liasa y una [NiFe] hidrogenasa (Ech) o por una [FeFe] hidrogenasa dependiente de formiato (COO-) (Cabrol et al., 2017).

#### 1.4.1 – Reacciones desfavorables para la producción de hidrógeno

Luego de que la glucosa es convertida en piruvato, este puede tener varios destinos, incluyendo reacciones que consumen NADH como donador de electrones evitando la formación de H<sub>2</sub>. La formación de ácido láctico (Ecuación 1.3) o etanol (Ecuación 1.4) a partir de la glucosa no genera H<sub>2</sub> y la formación de propionato (Ecuación 1.5) lo consume (Balanchadar et al., 2013; Guo et al., 2010).



Además existen microorganismos que consumen H<sub>2</sub> molecular, estas reacciones también son desfavorables para el proceso de producción de H<sub>2</sub>. Los microorganismos consumidores de hidrógeno más frecuentemente reportados en los reactores anaerobios hidrogenogénicos son: las arqueas metanogénicas, las bacterias homoacetogénicas y las bacterias sulfatoreductoras (Cabrol et al., 2017).

Los medios utilizados para la producción de hidrógeno están diseñados para evitar la proliferación de bacterias que respiran H<sub>2</sub> utilizando sulfato y en el caso de que se utilice un efluente real, se deberá considerar la concentración de sulfato en el mismo para evaluar si es un sustrato adecuado para la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura. Las bacterias sulfatoreductoras son muy afines al H<sub>2</sub> y lo consumen mediante una reacción que es más favorable energéticamente que la homoacetogénesis o la metanogénesis (tabla 1.1). Se postula que bajando el pH de la operación a valores menores que 6 y utilizando tiempos de residencia hidráulicos de 2 horas su crecimiento se ve limitado, pero no inhibido si hay sulfato en el medio o en el efluente utilizado (Guo et al., 2010; Saady, 2013; Ghimare et al., 2015)

**Tabla 1.1** – Comparación de la energía libre producida por las reacciones consumidoras de H<sub>2</sub> (adaptado de Saady, 2013).

Proceso	Reacción	$\Delta G^\circ$ (kJ)
Homoacetogénesis	$4H_2 + 2 CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$	-104,0
Metanogénesis hidrogenotrófica	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 H_2O$	-135,0
Sulfato reducción	$SO_4^{2-} + 4 H_2 \rightarrow H_2S + 4H_2O$	-152,2

Un producto resultante de la formación de hidrógeno es el CO<sub>2</sub>. El CO<sub>2</sub> puede ser combinado con el H<sub>2</sub> para formar metano o para formar acetato, mediante las reacciones de metanogénesis u homoacetogénesis (tabla 1.1) (Hawkes et al., 2007; Madigan et al., 2015).

Otras reacciones que influyen negativamente en la producción de hidrógeno son las reacciones de sintrofia para degradar ácidos orgánicos o alcoholes. Estas reacciones producen hidrógeno, pero solo pueden ocurrir si otra reacción consume el H<sub>2</sub> generado (Madigan et al, 2015).

En el proceso de producción de hidrógeno se desea que estas reacciones consumidoras de hidrógeno sean eliminadas o inhibidas, pero la acumulación de los productos resultantes de la fermentación oscura, como el H<sub>2</sub>, alcoholes y ácidos orgánicos producen cambios en las interacciones entre los microorganismos y en las vías metabólicas que se activan (Saady, 2013).

En presencia de una acumulación de acetato e H<sub>2</sub> los microorganismos fermentativos, activan rutas metabólicas que generan ácidos orgánicos más reducidos (butirato, lactato, propionato) o solventes (etanol, butanol, acetona o propanol), que disminuyen el rendimiento en H<sub>2</sub> (Lee et al., 2008).

## 1.5 – Microorganismos implicados en la producción de hidrógeno

La producción de hidrógeno mediante fermentación oscura es más factible de ser escalada utilizando cultivos mixtos que cultivos puros ya que no es necesario utilizar condiciones estériles.

Los cultivos mixtos permiten la utilización de sustratos complejos debido a que tienen una mayor capacidad de adaptación y resiliencia frente a perturbaciones. La mayor desventaja que tiene el uso de cultivos mixtos es la prevalencia de microorganismos que pueden competir por el sustrato

con las bacterias hidrogenogénicas disminuyendo el rendimiento en hidrógeno o que pueden consumir el hidrógeno generado (Carrillo – Reyes et al., 2014).

#### 1.5.1 – Microorganismos productores de hidrógeno.

Los microorganismos fermentativos productores de H<sub>2</sub> tienen una gran diversidad metabólica. Según las condiciones bióticas o abióticas a las que están expuestos son capaces de llevar a cabo diferentes tipos de fermentaciones; ya sea, dentro de una misma especie o entre especies distintas de microorganismos (Madigan et al, 2015).

Según Cabrol et al., 2017 las bacterias productoras de hidrógeno se podrían dividir en 3 grupos:

- Anaerobios estrictos formadores de esporas
- Anaerobios estrictos no esporuladores
- Bacterias facultativas

##### 1.5.1.1 – Bacterias hidrogenogénicas anaerobias estrictas formadoras de esporas.

Las bacterias del género *Clostridium* producen H<sub>2</sub> por fermentación acética (Ecuación 1.1) y por fermentación butírica (Ecuación 1.2).

Son consideradas como las productoras de hidrógeno más eficientes ya que en general son dominantes en las comunidades microbianas durante el período en que los reactores productores de hidrógeno tienen el mejor rendimiento (Kim et al., 2006; Wu et al., 2008; Dávila – Vázquez et al., 2009; Palomo – Briones et al., 2017). En el trabajo de Etchebere et al., 2016 se estudió por secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S, las comunidades microbianas de 20 reactores productores de hidrógeno a escala de laboratorio y encontraron una relación positiva entre los microorganismos *Clostridium* e indicadores de buena producción de hidrógeno, como la velocidad de producción de hidrógeno (LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) y el rendimiento en hidrógeno (mol de H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glu\_C).

Como son bacterias formadoras de esporas, mediante tratamientos realizados al inóculo, como el tratamiento por calor, pueden ser seleccionados de cultivos mixtos (Goud et al., 2014).

Existen diferentes especies del género *Clostridium* reportadas como productoras de hidrógeno, como por ejemplo: *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii* (Garrity et al., 2004).

Este género de bacterias tiene un metabolismo muy versátil, por tanto el sustrato y las condiciones de operación utilizadas determinarán las vías metabólicas que se expresarán y cuáles serán los metabolitos producidos durante la operación. *C. acetobutylicum* en condiciones de bajo pH y altas concentraciones de carbohidratos puede pasar de producir hidrógeno (acidogénesis) a producir acetona y butanol (solventogénesis), lo cual no es favorable para el rendimiento en H<sub>2</sub> (Lütke-Eversloh et al., 2011; Baghchehsaraee et al., 2008). Por otro lado *C. aceticum*, *C. ljungdahlii* y *C. carboxidivorans* pueden consumir hidrógeno mediante la vía homoacetogénesis de Wood – Ljungdahl (Drake et al., 1991; Hawkes et al., 2007; Lázaro et al., 2014).

#### 1.5.1.2 – Anaerobios estrictos hidrogenogénicos no formadores de esporas.

Los microorganismos anaerobios no esporuladores identificados como bacterias productoras de hidrógeno pertenecen principalmente a los Filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.

Dentro de los *Firmicutes*, se ha reportado que *Ethanoligenens harbinense*, *Acetanaerobacterium elongatum* y bacterias del género *Megasphaera* (familia: *Veillonellaceae*) producen hidrógeno, acetato, etanol y CO<sub>2</sub> a partir de glucosa (Ren et al., 2007; Guo et al., 2011). Las bacterias del género *Megasphaera* se asocian a un rendimiento en hidrógeno menor que el generado por los microorganismos del género *Clostridium*. En el trabajo de Etchebehere et al., 2016 se encontró que los organismos de la familia *Veillonellaceae* eran más abundantes en reactores con producción de hidrógeno media o baja.

Bacterias del *Phylum Bacteroidetes* pertenecientes al género *Prevotella* se han reportado como productores de hidrógeno de bajo rendimiento (Wu et al., 1992; Mariakakis et al., 2011; Tapia – Venegas et al., 2015b).

### 1.5.1.3 – Bacterias facultativas productoras de hidrógeno

Estas bacterias podrían ser importantes para el proceso de producción de hidrógeno porque pueden consumir oxígeno generando rápidamente un ambiente anaerobio durante el arranque del proceso de producción de H<sub>2</sub> o en caso de que haya una entrada accidental de O<sub>2</sub> al reactor, colaborando con la sobrevivencia de los microorganismos del género *Clostridium*. Estas bacterias son abundantes en inóculos de origen aerobio (Patel et al., 2014).

Los organismos del género *Enterobacteriaceae* generan H<sub>2</sub> mediante la vía de la enzima formiato liasa como se explicó en la sección 1.4. Según los productos generados además del formiato, realizan fermentación ácido mixta o fermentación butanodiólica. En la fermentación ácido mixta se genera H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etanol, succínico, láctico y acético, en la fermentación butanodiólica se forman principalmente butanodiol, etanol H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. En estas fermentaciones se pueden obtener hasta 2 moles de H<sub>2</sub> por mol de glucosa consumida (Madigan et al., 2015).

De la familia *Enterobacteriaceae*, los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* han sido reportados como productores de H<sub>2</sub> (Patel et al., 2014). En el trabajo de Argun et al., 2009 se reportó que cultivos puros de *Enterobacter aerogenes* tuvieron mejor rendimiento en H<sub>2</sub> (1,04 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glu\_C) que *Clostridium butylicum* (0,8 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glu\_C).

Los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* producen H<sub>2</sub> por la vía PFL al igual que los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* (Seol et al., 2008; Kumar et al., 2013). En el trabajo de Patel et al., 2014 se realizó un estudio de co – cultivos en batch utilizando cepas de *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.* y *Bacillus cereus*, en el cual se obtuvo un rendimiento en H<sub>2</sub> máximo de 3 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glu\_C cuando el co – cultivo estaba formado por *B. cereus* y *E. aerogenes*. Se postula que los microorganismos del género *Bacillus* podrían ayudar a los productores de H<sub>2</sub> es mediante la producción de enzimas hidrolíticas que desintegran sustratos complejos como la lignina, el almidón o la celulosa dejando disponibles moléculas más fácilmente degradables. Además toleran diferentes rangos de pH y salinidad (Liu & Wang et al., 2012; Song et al., 2013).

## 1.5.2 – Microorganismos consumidores de hidrógeno

En reactores hidrogenogénicos sin bacterias sulfato reductoras, los microorganismos que pueden consumir el H<sub>2</sub> molecular son las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y las bacterias homoacetogénicas.

### 1.5.2.1 – Arqueas metanogénicas hidrogenotróficas

Las arqueas capaces de producir metano pertenecen al Filo *Euryarchaeota*. Son los únicos microorganismos capaces de formar CH<sub>4</sub> mediante la respiración de H<sub>2</sub> para fijar CO<sub>2</sub>. En trabajos realizados sobre la producción de hidrógeno, utilizando diferentes tipos de reactores el consumo de H<sub>2</sub> por estos microorganismos ha sido ampliamente reportado (Castelló et al., 2009; Mariakakis et al., 2011; Carrillo – Reyes et al., 2013; Etchebehere et al., 2016).

Las arqueas metanogénicas pueden ser eliminadas de los reactores mediante:

- a) Tratamiento de los inóculos, en la mayoría de los estudios en producción de H<sub>2</sub> se utiliza el tratamiento térmico porque ha sido reportado como el más efectivo en eliminar la metanogénesis (Oh et al., 2003; Mohan et al., 2008; Luo et al., 2011; Carrillo - Reyes et al., 2014).
- b) Modificación de los parámetros de operación de los reactores, utilizando pH menores de 6 y tiempos de retención hidráulicos cortos ya que la tasa de crecimiento específica de las arqueas metanogénicas es menor que la de los microorganismos hidrogenogénicos (Houruchi et al., 2002; Lo et al., 2009; Balanchadar et al., 2013).

Sin embargo, estas estrategias no siempre han dado buenos resultados ya que, en algunos estudios se ha observado la persistencia de estos microorganismos a pesar de que se realice tratamiento térmico del inóculo (Carrillo – Reyes et al., 2014) y se utilicen tiempos de residencia hidráulicos menores a un día (Mariakakis et al., 2011) y pH menor a 6 (Castelló et al., 2009).

### 1.5.2.2 – Bacterias homoacetogénicas

Las bacterias homoacetogénicas pertenecen al Filo *Firmicutes*. Los microorganismos homoacetogénicos descritos hasta el momento pertenecen a los géneros *Clostridium*, *Moorella*, *Sporomusa*, *Acetobacterium*, *Butyribacterium*, *Eubacterium* y *Peptostreptococcus* (Saady, 2013).

Algunas bacterias homoacetogénicas reportadas en reactores hidrogenogénicos pertenecen a las especies *Acetobacterium woodii*, *Moorella thermoacetica*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermoautotrophicum*, *Clostridium thermoaceticum*, *Clostridium stercorarium*, *Clostridium ljungdahlii* (Ueno et al., 2006; Guo et al., 2010). Dentro del género *Clostridium* algunas bacterias homoacetogénicas pueden tanto formar H<sub>2</sub> como consumirlo debido a sus enzimas hidrogenasas bidireccionales (Das et al., 2006). En el trabajo de Huang et al., 2010 se describe la comunidad microbiana de un reactor CSTR mediante análisis de PCR – DGGE del gen del ARNr de 16S y se observó que la abundancia de *C. lundense*, *C. peptidivorans* y *C. vincentii* aumentaba cuando la producción de H<sub>2</sub> disminuía, por lo que se postuló que estos microorganismos podrían consumir H<sub>2</sub> mediante hidrogenasas reversas. Se ha reportado que *Citrobacter amalonaticus* también posee hidrogenasas bidireccionales (Kim et al., 2008).

### 1.5.3 – Microorganismos competidores con la producción de hidrógeno

Los procesos biológicos que se dan en los reactores productores de hidrógeno dependen del estado redox que exista en el ambiente en el cual están conviviendo, el cual es producto de las reacciones metabólicas que se están llevando a cabo. Como se explicó en la sección 1.3, a presiones parciales de hidrógeno mayores a  $6,0 \times 10^{-4}$  atm, el NADH es oxidado mediante la reducción del piruvato a butirato, propionato, lactato, etanol y/o en reacciones de biosíntesis. Estas reacciones se asocian a un bajo rendimiento en H<sub>2</sub> (Angenent et al., 2004).

En los reactores productores de H<sub>2</sub> se reporta como principales bacterias competidoras por sustrato a las bacterias propiónicas y a las bacterias lácticas (Guo et al., 2010; Sikora et al., 2013).

### 1.5.3.1 – Bacterias productoras de ácido propiónico

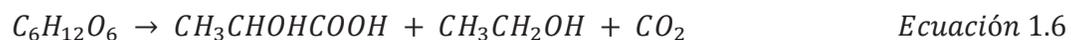
La acumulación de ácido propiónico en reactores productores de hidrógeno se atribuye a la presencia de bacterias que realizan fermentación propiónica. Géneros como *Propionospira* y *Selenomonas*, se han reportado en reactores productores de hidrógeno. Estas bacterias consumen glucosa, succinato o lactato formando propionato (Mariakakis et al., 2011; Cabrol et al., 2017). En el trabajo de Castelló et al., 2009 se reportó la formación de propionato a partir de lactato por miembros de los géneros bacterianos *Pectinatus* y *Megasphaera*. En el mismo sentido, Koskinen et al., 2007 reportaron a la especie *Schwartzia succinivorans* como productora de propionato en un estudio realizado en un reactor de lecho fluidizado alimentado con glucosa. En otro estudio realizado en un reactor CSTR alimentado con efluente de una fábrica de bebidas, la acumulación de propionato se asoció a las especies bacterianas *Selenomonas lactificifex* y *Bifidobacterium catenulatum* (Sivagurunathan et al., 2014).

Otras bacterias asociadas con la fermentación propiónica son *Propionibacterium acidipropionici* y *Clostridium propionicum* (Hernandez – Mendoza et al., 2014; Madigan et al., 2015)

### 1.5.3.2 – Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas (LAB) producen ácido láctico como producto principal de su metabolismo al fermentar carbohidratos.

El ácido láctico puede ser producido por 3 vías metabólicas, la fermentación láctica homofermentativa (mencionada anteriormente en la sección 1.4, Ecuación 1.3), la heterofermentativa (Ecuación 1.6) y la fermentación láctica de *Bifidobacteria* (Ecuación 1.7). Ninguna de estas vías produce hidrógeno (Gavala et al., 2006).





Ecuación 1.7

Muchos microorganismos pueden producir ácido láctico, pero las LAB son bacterias que pertenecen al orden *Lactobacillales*, que incluye los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, etc (Sikora et al., 2013; Cabrol et al., 2017). Estos microorganismos tienen un requerimiento nutricional alto, por lo que son encontrados frecuentemente en ambientes ricos en carbohidratos, aminoácidos y nucleótidos. Se ha reportado que tienen gran capacidad de adaptación a condiciones hostiles, por lo que pueden habitar un amplio rango de nichos (Sikora et al., 2013).

En varios trabajos de análisis de la comunidad bacteriana mediante diferentes métodos como PCR-DGGE o secuenciación masiva se ha encontrado que las LAB son frecuentemente uno de los grupos dominantes en la comunidad microbiana de reactores hidrogenogénicos (Hung et al., 2007; Ren et al., 2007; Jo et al., 2007; Chojnakca et al., 2011; Rafrafi et al., 2013). El rol de estas bacterias en los reactores productores de hidrógeno es discutido. Por un lado se ha reportado que las bacterias lácticas disminuyen la producción de hidrógeno mediante el consumo del sustrato, la producción de inhibidores y la disminución del pH y por otro lado se ha reportado que podrían actuar en sinergia con microorganismos productores de hidrógeno favoreciendo la producción. Los reportes de la bibliografía al respecto serán discutidos más adelante en la siguiente sección.

## 1.6 – Problemas asociados a la producción de hidrógeno por fermentación oscura

La producción de hidrógeno por fermentación oscura utilizando cultivos mixtos es un proceso promisorio para generar energía limpia de forma sustentable, por lo que ha sido ampliamente estudiada. De todas formas, se sigue estudiando en escala de laboratorio y hay muy pocas

plantas piloto debido a que no se ha logrado aún obtener procesos eficientes y estables (Tapia – Venegas et al., 2015a; Singh et al., 2015; Bundhoo et al., 2016).

La fermentación oscura es un proceso biológico llevado a cabo por microorganismos, las interacciones que ocurran en la comunidad microbiana dependerán del inóculo utilizado (tratado o no), los parámetros de operación (pH, temperatura, tiempo de retención celular) el tipo de reactor y el sustrato que se utilice (Ghimire et al., 2015). Las interacciones de la comunidad microbiana seleccionada pueden favorecer o no el proceso de producción de hidrógeno.

El principal desafío que tiene la producción de hidrógeno por fermentación oscura es dirigir la mayor cantidad de electrones posible, provenientes de la materia orgánica, a la formación de hidrógeno, tratando de evitar reacciones consumidoras de hidrógeno o competidoras por sustrato o por poder reductor (Saady, 2013).

La mayoría de los trabajos de investigación en el proceso de producción de hidrógeno se han enfocado en aumentar los rendimientos en hidrógeno mediante la inhibición de la metanogénesis, ya que en reactores anaerobios donde no hay aceptores externos de electrones es el principal proceso consumidor de hidrógeno (Dinamarca et al., 2011).

Como se explicó en la sección 1.5.2.1 las bacterias metanogénicas tienen características que permite eliminarlas o inhibirlas en los reactores de producción de H<sub>2</sub>. Sin embargo, el rendimiento en hidrógeno por fermentación oscura en reactores sin metanogénesis sigue siendo mucho más bajo que el rendimiento teórico máximo (Ecuación 1.1) y el proceso es inestable.

Se postula que la inestabilidad de la producción de hidrógeno puede deberse a la presencia de bacterias propiónicas, bacterias lácticas o bacterias homoacetogénicas (Cabrol et al., 2017).

### 1.6.1 – Inestabilidad en la producción de hidrógeno por bacterias propiónicas

En varios estudios se ha asociado la baja producción de hidrógeno a la formación de ácido propiónico. Esta vía compite por sustrato y consume  $H_2$  en su formación, según la ecuación 1.3 de la sección 1.4.

En el trabajo de Zhang et al., 2006 se operó un reactor CSTR alimentado con glucosa, y notaron que acortando el HRT del reactor de 12 horas a 6 horas, el rendimiento en hidrógeno aumentaba de  $1,6 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glucosa}$  a  $1,9 \text{ mol } H_2 \text{ mol}^{-1} \text{ glucosa}$ . Concluyeron que un HRT de 6 horas llevaba al lavado de las bacterias propiónicas. Otros estudios también llegaron a la conclusión que a menor HRT, menor es la producción de propiónico y mejor la producción de hidrógeno (Lin & Chang et al., 1997; Cha & Noike, 1999; Hussy et al., 2003).

Otros autores (Arooj et al., 2007; Arooj et al., 2008b y Hernandez – Medoza et al., 2014) trabajando con reactores anaerobios en batch secuencial, detectaron que las secuencias operadas con mayores tiempos de retención, tenían una mayor concentración de ácido propiónico y menor producción de hidrógeno.

Otra estrategia utilizada para suprimir a las bacterias propiónicas y mejorar el rendimiento en hidrógeno de los reactores fue aumentar la temperatura de operación. Sivagurunathan et al., 2014 reportó que al aumentar la temperatura de  $37^\circ\text{C}$  a  $45^\circ\text{C}$ , en un reactor CSTR con HRT = 8 horas, detectó un aumento en el rendimiento en hidrógeno de  $1,04 \text{ mol de } H_2/\text{mol glu}_C$  a  $1,68 \text{ mol de } H_2/\text{mol de glu}_C$ .

### 1.6.2 – Consumo de hidrógeno por homoacetogénesis

Las bacterias homoacetogénicas son bacterias versátiles metabólicamente y polifiléticas, por lo que son difíciles de identificar en los reactores hidrogenogénicos por secuenciación del gen del ARNr de 16S (Cabrol et al., 2017). Otra razón por la cual es difícil identificarlas es debido a que producen acetato a partir de  $H_2$  y  $CO_2$ , un producto común a otras reacciones que ocurren en la fermentación oscura. Si al analizar la comunidad microbiana de los reactores productores de  $H_2$  no se detectan especies reportadas como homoacetogénicas, este proceso se puede estimar

mediante la equivalencia entre el acetato y el butirato producidos y el hidrógeno detectado experimentalmente. La ecuación de equivalencia estequiométrica entre los moles de H<sub>2</sub> formados a partir de la degradación de la glucosa produciendo acetato y butirato se describe a continuación y se obtiene de las ecuaciones 1.1 y 1.2.

$$\frac{H_2}{HAc + HBU} = 2 \qquad \text{Ecuación 1.8}$$

La ecuación 1.8 indica que por cada mol de hidrógeno se forman 2 moles de acetato y 2 moles de butirato. Por lo tanto, si la relación es menor que 2, es posible que haya consumo por homoacetogénesis, ya que parte del acetato formado proviene de reacciones que no forman H<sub>2</sub> (Dinamarca & Bakke, 2009).

En el estudio realizado por Hussy et al., 2003 se observó un aumento de la producción de acetato y butirato pero no un aumento en la producción de hidrógeno en un reactor CSTR operado a tiempo de residencia celular 18 horas, al no detectar producción de metano, propusieron consumo de H<sub>2</sub> por homoacetogénesis.

Otros autores, Fontes – Lima & Zaiat, 2012; Fontes – Lima et al., 2013 observaron disminución de producción de hidrógeno y aumento de la producción de acetato en dos trabajos diferentes, operando reactores anaerobios de lecho fijo. En uno de los trabajos testearon diferentes HRT, mientras en el otro utilizaron diferentes sustratos carbonados. Al no detectar metano en las operaciones, atribuyeron la disminución en la producción de H<sub>2</sub> a su consumo por homoacetogénesis. Realizando la relación estequiométrica entre el H<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub> consumidos y el acetato generado teorizaron que podría deberse a la presencia del homoacetógeno *Clostridium ljungdahlii*.

La homoacetogénesis parecería ser un proceso independiente de la temperatura, el pH, el inóculo y el tratamiento aplicado al mismo (Saady, 2013). Se ha reportado consumo de hidrógeno por homoacetogénesis en estudios donde se ha realizado tratamiento térmico al

inóculo (Oh et al., 2003; Dinamarca et al., 2011; Luo et al., 2011). Tampoco se ha observado un efecto inhibitorio a temperaturas altas ya que se ha detectado homoacetogénesis en reactores termófilos (55°C) (Siriwongrungson et al., 2007; Dinamarca & Bakke, 2009).

Algunos autores postulan que la homoacetogénesis se favorece en reactores con alta densidad celular. Se postula que la alta densidad celular en los reactores favorecería el mecanismo de transferencia de hidrógeno interespecies, en el cual el hidrógeno es consumido antes de ser liberado, similar a la sintrofia que ocurre en la metanogénesis (Dinamarca & Bakke, 2009; Dinamarca et al., 2011). Gavala et al., 2006 realizó un estudio comparando la producción de H<sub>2</sub> entre un reactor CSTR y un reactor UASB en el cual estimó estequiometricamente el consumo de H<sub>2</sub> por homoacetogénesis. Observó que en el reactor UASB el H<sub>2</sub> consumido por homoacetogénesis era mayor que el consumido por la misma reacción en un reactor CSTR. Por otro lado, en el trabajo de Arooj et al., 2008a operando un reactor CSTR utilizando diferentes tiempos de residencia celular, observó que el acetato producido por homoacetogénesis aumentaba a medida que el TRC disminuía, en un rango desde 27 % para TRC = 18 horas hasta 57 % para el TRC = 6 horas. Por lo cual este tema aún no está claro y falta mucha investigación para poder dilucidar las condiciones en la cual esta vía se ve favorecida.

Se han planteado ecuaciones teóricas para calcular la cantidad de acetato que es producido por homoacetogénesis (Arooj et al., 2008a; Luo et al., 2011), así como se ha verificado mediante estrategias experimentales el consumo de hidrógeno por bacterias homoacetogénicas (Oh et al., 2003; Siriwongrungson et al., 2007; Dinamarca et al., 2011; Carrillo – Reyes, Tesis de Doctorado, 2013). Sin embargo, algunos autores que han detectado homoacetogénesis en sus estudios, no consideran que este proceso contribuya negativamente al rendimiento en hidrógeno (Kraemer & Bagley, 2008; Ryan et al., 2008).

Es posible que estas conclusiones discordantes se deban a las diferencias en las condiciones experimentales y operacionales de los estudios llevados a cabo (Saady, 2013).

Algunas estrategias planteadas para evitar el consumo de hidrógeno por homoacetogénesis han sido la captura de CO<sub>2</sub> del headspace de los reactores con KOH (Park et al., 2005) o la disminución de la presión parcial de H<sub>2</sub> mediante dilución con N<sub>2</sub> (Hussy et al., 2003; Kraemer & Bagley et al., 2008).

### 1.6.3 – Bacterias lácticas: ¿beneficiosas o perjudiciales?

Las LAB son frecuentemente encontradas en reactores productores de hidrógeno, aunque su función en ellos no es completamente clara.

Operaciones inestables y bajos rendimientos en hidrógeno han sido asociados a la presencia de las LAB. Varios estudios reportan que el aumento de ácido láctico va acompañado de una disminución en la producción de hidrógeno (Noike et al., 2002; Jo et al., 2007; Ren et al., 2007; Palomo - Briones et al., 2017). Además, se ha comprobado que producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de *Clostridium sp.* (Noike et al., 2002; Gomes et al., 2015; Gomes et al., 2016). Asimismo, la producción de ácido láctico baja el pH del medio generando condiciones no favorables para las bacterias productoras de hidrógeno (Kawagoshi et al., 2005; Jo et al., 2007). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la presencia de bacterias lácticas podría tener un efecto positivo sobre la producción de hidrógeno. Las LAB podrían mejorar la producción de hidrógeno mediante el consumo de oxígeno, ya que son facultativas generando un ambiente anaerobio beneficioso para los microorganismos productores de hidrógeno. Además, estas bacterias producen enzimas que hidrolizan compuestos complejos transformándolos en sustratos más simples de consumir para los microorganismos hidrogenogénicos (Cheng et al., 2008, Li et al., 2011).

Algunos estudios han demostrado una producción de H<sub>2</sub> eficiente durante la coexistencia de bacterias hidrogenogénicas y bacterias lácticas. Laathanachareon et al., 2014 observó la coexistencia *Clostridium* y bacterias lácticas (*Streptococcus* y *Weisella*) en períodos de alta producción de H<sub>2</sub> en un reactor UASB. En estudios realizados en un reactor CSTR alimentado con glucosa, se detectó al género bacteriano de LAB *Sporolactobacillus* como dominante en la

comunidad sin afectar negativamente la producción de hidrógeno (Wongtanet et al., 2007). En el trabajo de Etchebehere et al., 2016 se encontró que las muestras que mostraban una co-dominancia de LAB y *Clostridium* se asociaban a reactores con indicadores de buena producción de hidrógeno. Por otro lado, también observaron que si las LAB dominaban en la comunidad bacteriana las muestras se asociaban tanto a reactores con buenos como malos indicadores de producción de H<sub>2</sub>. Los autores atribuyeron este hecho a que no todas las especies de *Clostridium* serían sensibles a las bacteriocinas producidas por las LAB.

Otros estudios han planteado que el lactato puede funcionar como donador de electrones para producir hidrógeno, pero solamente si está acompañado de otra fuente de carbono como el acetato y en determinada concentración. Se ha observado que si este umbral de concentración es sobrepasado el lactato se acumula siendo perjudicial para la formación de hidrógeno. Esta vía metabólica ha sido observada en especies como *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium tyrobutyricum* (Baghchehsaraee et al., 2009; Cheng et al., 2010; Mariakakis et al., 2011; Kim et al., 2012).

Se postula que es posible suprimir a las bacterias lácticas mediante tratamientos térmicos, ya que no son bacterias productoras de esporas, aunque en varios trabajos donde se ha aplicado tratamiento térmico se ha detectado la persistencia de bacterias lácticas durante la operación de los reactores (Rafrafi et al., 2013; Laothanachareon et al., 2014).

## 1.7 – La producción de hidrógeno utilizando diferentes TRC

En algunos trabajos se ha postulado que el aumento del tiempo de residencia hidráulico es perjudicial para la producción de hidrógeno, principalmente debido a que ciertos procesos aparecen o son beneficiados cuando la densidad celular es alta como la fermentación propiónica, la fermentación láctica y la homoacetogénesis (Zhang et al., 2006; Dinamarca et al., 2009; Palomo – Briones et al., 2017).

En estos trabajos se utilizaron reactores de mezcla completa (CSTR) donde la densidad celular depende del tiempo de residencia celular. Utilizando un reactor CSTR es posible controlar el tiempo de residencia celular (TRC) mediante el control del tiempo de residencia hidráulico (TRH), ya que son equivalentes. En la tabla 1.2 se describen trabajos publicados utilizando reactores CSTR operados a distintos TRC.

Es probable que el TRC afecte sustancialmente las interacciones microbianas que se producen durante el proceso de fermentación oscura, seleccionando las vías metabólicas que predominan en el proceso (Palomo – Briones et al., 2017).

**Tabla 1.2** – Valores de VPH<sub>2</sub>, RH<sub>2</sub>, principales productos de fermentación y microorganismos encontrados en reactores CSTR productores de H<sub>2</sub> operados con diferentes tiempos de residencia celular reportados en bibliografía.

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH <sub>2</sub> (LH <sub>2</sub> /Ld)	RH <sub>2</sub> (mol H <sub>2</sub> / mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
8,5	Efluente de reactor anaerobio alimentado con sacarosa	Glucosa + MM	6	35	1,3	0,85	El butirato fue le metabolito más producido seguido del acetato	-	-	Mizuno et al., 2000
					2,07	1,43		-	Burbujeo con N <sub>2</sub>	
18	Lodo proveniente de digestor anaerobio de planta de tratamiento de agua municipales	Almidón de trigo + MM	5,2	30	no reportado	1,28	Días 1 a 7 - Butirato mayor producto de fermentación	-	-	Hussy et al., 2003
						1,06	Días 7 a 11 - Acetato mayor producto de fermentación sin aumento en RH <sub>2</sub> , sospecha homoacetogénesis como causa de la baja en RH <sub>2</sub>	-	-	
						1,25 - 0,50	A partir del día 6 aumenta concentración de acetato, RH <sub>2</sub> disminuye. Producción de propionato aumenta a partir de día 12. Sospecha propionogénesis como causa de baja en RH <sub>2</sub> .	-	-	
12			5,2			0,50 - 0,80	Disminución de TRC, aumenta concentración de butirato y RH <sub>2</sub> . Producción de propionato disminuye. Concentración de acetato se mantiene similar. Sospecha homoacetogénesis como causa de bajo RH <sub>2</sub>	-	-	
15			5,2			1,87	Burbujeo constante con N <sub>2</sub> . Butirato mayor metabolito producido, acetato aumento gradualmente, producción de propionato se mantuvo baja.	-	-	

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
8	Lodo proveniente de planta de tratamiento de aguas residuales municipales - TT y TA	Glucosa + MM	5,5	37	6,08	1,62	Butirato y acetato fueron los productos de fermentación mayoritarios También se detectó EtOH y propionato solo en la operación con TRC=8 horas	PCR – DGGE: Disminución TRC de 8 a 6 horas provocó: disminución de la diversidad microbiana en el reactor y aumento de la producción de H <sub>2</sub> por lavado de bacterias productoras de propionato. Después el aumento en TRC no influyó en la diversidad microbiana	-	Zhang et al., 2006
6					7,77	1,88				
8					6,92	1,93				
10					6,11	1,95				
12					4,95	1,91				
12	Cultivo enriquecido en medio rico + celulosa. Inóculo inicial del cultivo fue compost aerobio.	Desechos sólidos, mayormente compuestos por papel molido y comida de perro.	5	no reportado	1,4	no reportado	Butirato y acetato fueron los metabolitos más producidos, su concentración fue disminuyendo a medida que aumentaba el TRC. Bajas concentraciones de EtOH y propionato.	T-RFLP: Muestras TRC - 17 horas: <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i> y <i>Lactobacillus sp.</i> Muestra TRC - 144 horas: <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> y <i>Acetobacter lovaniensis</i> .	-	Ueno et al., 2006
17					2,5					
24					1,7					
48					0,6					
72					0,2					
96					0,15					
144					0,05					
6	inóculo aclimatado en sustrato a utilizar en la operación (3 gDQO/L.d)	Melaza de azúcar de remolacha	no controlado (efluente de entrada pH=7, pH reactor=4,75)	35	2,5	0,9	EtOH fue el metabolito más producido, plantean vía metabólica que produce H <sub>2</sub> y EtOH	-	-	Ren & Gong, 2006
	inóculo aclimatado en sustrato a utilizar en la operación (7 gDQO/L.d)	Melaza de azúcar de remolacha	no controlado (efluente de entrada pH=7, pH reactor=4,39)		5,4	2,01	Acetato fue el metabolito más producido seguido del EtOH	-	-	
	inóculo aclimatado en sustrato a utilizar en la operación (10 gDQO/L.d)	Melaza de azúcar de remolacha	no controlado (efluente de entrada pH=7, pH reactor=4,16)		0,18	0,23	Por acidificación rápida del reactor baja producción de H <sub>2</sub>	-	-	

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia	
12	Lodo de digester de planta de tratamiento de aguas residuales municipales – TT	Sacarosa + MM	5,3	35	no reportado	0,77	Butirato, lactato y acetato son los principales productos de fermentación, en menor proporción se detecta EtOH y propiónico	PCR - DGGE: Se encontraron varias especies de microorganismos del género <i>Clostridium</i> y competidores por sustrato como <i>Gluconacetobacter europeus</i> , <i>Lactobacillus sp.</i>	Burbujeo con biogás producido (300mL/min)	Kim et al., 2006	
					no reportado	0,95	Butirato, acetato y lactato son los productos mayoritarios de fermentación, se detecta también EtOH y propiónico	PCR - DGGE: La comunidad microbiana menos diversa, aunque se siguen encontrando microorganismos del género <i>Clostridium</i> y competidores como <i>Gluconacetobacter europeus</i> , <i>Lactobacillus sp.</i>	Burbujeo con N <sub>2</sub> (300mL/min)		
					no reportado	1,68	El butirato es el producto principal de fermentación seguido del EtOH, en menor proporción se detectó lactato, acetato y propionato	PCR - DGGE: Menor diversidad en la comunidad se favorecen las especies de <i>Clostridium tyrobutiricum</i> , <i>C. proteolyticum</i> , <i>C. acidisoli</i> .	Burbujeo con CO <sub>2</sub> (300mL/min)		
12	Lodo anaerobio proveniente de planta de tratamiento de aguas residuales municipales – TT	Glucosa + MM	(pH final = 4,9)	35	2,98	1,67	El butirato fue el producto de fermentación dominante en todas las operaciones, junto con el acetato, se detectó lactato en las operaciones con TRC = 12, 8, 6 y 2 h. También se detectó EtOH, en todas las operaciones, pero en baja proporción, menos en la operación con TRC=6 donde tuvo mayor concentración que el lactato	-	-	Gavala et al., 2006	
(pH final = 5,2)			3,36		1,6	-					
(pH final = 5,1)			4,46		1,5	-					
(pH final = 6,0)			5,15		1,83	-					
(pH final = 6,0)			4,52		1,26	-					
8			55	(pH final = 5,2)	2,73	1,95		El butirato y el lactato fueron los productos de fermentación predominantes seguidos del acetato, excepto en la operación con TRC=2 donde no se detectó lactato. El EtOH fue detectado en baja proporción comparado al resto de los metabolitos.			-
(pH final = 5,5)				3,86	1,91	-					
(pH final = 6,4)				3,97	1,13	-					
6											
4											
2											
12											
6											
2											

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
72	Lodo de digestor anaerobio de planta de tratamiento de efluentes domésticos - TT	Desechos alimentarios	5,2 - 5,5	35	0,001 - primeros 10 días, 0,58 entre día 10 y 17, luego variable entre 0,2 y 0,3 hasta día 55 cuando paro la producción.	no reportado	Lactato fue el metabolito predominante entre días 1-20 y después del día 40. Entre los días 20-40 el acetato y el butirato pasaron ser mayoritarios y no hubo producción de lactato.	PCR - DGGE y T-RFLP: Las muestras correspondientes a días con producción de H <sub>2</sub> mostraron más abundancia de microorganismos del género <i>Clostridium</i> ( <i>C. leptum</i> , <i>C. acetobutylicum</i> y <i>C. tyrobutiricum</i> ), mientras las muestras correspondientes a períodos de no producción mostraron abundancia de LAB ( <i>L. sakei</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. delbruekii</i> ) provenientes de la alimentación.	-	Jo et al., 2007
6	Enriquecimiento en sustrato a utilizar de un inóculo proveniente de efluente de planta de tratamiento de aguas domésticas	Melaza de azúcar de remolacha	6,0 - 6,5	35	1,71	no reportado	Fermentación propiónica fue la dominante: Propionato y acetato fueron los productos de fermentación más producidos.	PCR – DGGE: <i>Actinobacterium</i> , <i>Anaerofilum agile</i> , <i>Clostridium sp.</i> , <i>C. absonum</i> , <i>Micobacterium</i> , <i>Propionimonas</i> , <i>Segniliparus rotundus</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Bacteroidetes</i>	-	Ren et al., 2007
			5,0 - 5,0	35	no reportado	no reportado	Fermentación butírica fue la dominante: butirato y acetato como mayores productos de fermentación	PCR – DGGE: <i>Desulfovibrio ferrireducens</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Acidivorax</i> , <i>Actinomycetes</i> , <i>C.pasterianum</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>E.harabinense</i> , <i>Actinobacterium</i> , <i>Bacteroidetes</i> .	-	
			4,0 - 4,5	35	7,36	no reportado	Fermentación alcohólica fue la dominante: producción de EtOH y acetato	PCR – DGGE: <i>Lactococcus</i> , <i>Acatanarobacterium elongatum</i> , <i>C.tyrobutiricum</i> , <i>E. harabinense</i> , <i>C.cellulosi</i> , <i>C.acidisoli</i> , <i>Raoutella terrigena</i> , <i>Megasphaera cervisiae</i> , <i>Actinobacterium</i> , <i>Bacteroidetes</i> .	-	

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
24	Lodo de digestor anaerobio de planta de tratamiento de efluentes domésticos - TT	Glucosa + MM	5,5	35	3,34	1,24	El butirato fue el producto de fermentación más abundante en todas las operaciones. También se detectó acetato y propionato. La concentración de propionato fue disminuyendo y la de butirato aumentando, a medida que se disminuía la duración del TRC.	RFLP: <i>Sporolactobacillus inulinus</i> , dominante seguido por <i>Clostridium sp.</i> En menor proporción: <i>Brevondimonas diminuta</i> , <i>Bacteroides sp.</i> , <i>Flavobacterium mizutaii</i> , <i>Selenomonas lactificifex</i> , <i>Prevotella sp.</i> , <i>Olserella profusa</i>	-	Wongtare et al., 2007
48					2,49	0,9			-	
12	Efluente de reactor alimentado con sacarosa, inoculado con lodo de planta de tratamiento de aguas residuales municipales con TT	Glucosa + MM	6,7	40	0,19	0,89	Butirato fue el producto más abundante de los ácidos orgánicos detectados (sobre todo en op. con TRC= 6 y 8 h). El acetato y el propionato fueron producidos en igual proporción. También se detectó EtOH.	PCR - DGGE: <i>Clostridium ramosum</i> dominante en la comunidad cuando la operación fue con TRC 12 horas. Cuando el TRC se cambió a 8, 6 y 4 horas <i>C. indolis</i> pasó a ser dominante seguido por <i>C. pasteurianum</i> . En menores proporciones se encontraron otros microorganismos de género <i>Clostridium sp.</i> , <i>Klebsiella sp.</i> y <i>Streptococcus sp.</i>	-	Wu et al., 2008
10			6,5		0,45	1,63				
8			6,4		0,5	1,57				
6			6,4		0,6	1,53				
4			6,6		0,38	0,75				
10	Lodo metanogénico	Glucosa + MM	5,5	25	no reportado	1,31	El butirato y el acetato fueron los productos de fermentación mayormente producidos en ambas condiciones, aunque en condiciones de burbujeo con N <sub>2</sub> la concentración de butirato aumentó, mientras la de acetato disminuyó.	-	-	Kraemer & Bagley, 2008
					no reportado	1,87			Burbujeo con N <sub>2</sub>	
12	Lodo del tanque sedimentador de planta de tratamiento de aguas residuales municipales	Xylosa + MM	7,1	30	2,1	0,62	El EtOH, acetato, butirato y propionato se mantuvieron en las mismas proporciones y se encontró en baja concentración valerato.	no realizado	-	Lin et al., 2008
				35	2	0,54		PCR - DGEE: <i>C. intestinale</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> dominantes		
				40	1,4	0,34		PCR - DGGE: <i>Clostridium sulfatireducens</i> y <i>Bacillus sp.</i> especies dominantes		
				45	2,1	0,74	Butirato principal producto de fermentación, el acetato y EtOH en iguales proporciones. Disminuyó la concentración de ácido propiónico.	no realizado		
				50	5,7	1,5				
				55	4,5	1,16				

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
12	Lodo proveniente de planta de tratamiento de aguas residuales municipales aclimatado en sustrato a utilizar	CMS (sub-producto de la producción de lisina o glutamato)	5,5	35	3,4	2,1	En todas las operaciones se encontraron ácido butírico y ácido acético, la concentración de butírico disminuyó a medida que aumento e TRC y la de acético aumento	PCR - DGGE: <i>Chryseobacterium meningoseptum</i> , <i>Acidiminococcus</i> , <i>Corynibacterium</i> , <i>Bifidobacterium pseudocanelatum</i> , <i>Nisseria subflava</i> , <i>Alcalignes sp.</i> RT-PCR-DGGE: <i>Clostridium acetobutylicum</i> y <i>C. pasteurianum</i>	PCR-DGGE y RT-PCR-DGGE para gen de cluster I y II de hidrogenasa de <i>Clostridium</i>	Chang et al., 2008
8					4,2	0,3		PCR - DGGE: <i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Sphingomonas paracimobilis</i> , <i>Acidiminococcus</i> , <i>Corynibacterium</i> , <i>Bifidobacterium pseudocanelatum</i> , <i>Nisseria subflava</i> , <i>Alcalignes sp.</i> RT-PCR-DGGE: <i>Clostridium acetobutylicum</i> y <i>C. pasteurianum</i>		
6					6,7	0,3		PCR - DGGE: <i>Olsella uli</i> , <i>Acidiminococcus</i> , <i>Corynibacterium</i> , <i>Bifidobacterium pseudocanelatum</i> , <i>Nisseria subflava</i> , <i>Alcalignes sp.</i> RT-PCR-DGGE: <i>Clostridium acetobutylicum</i> y <i>C. pasteurianum</i>		
4					7,4	0,1		<i>Acidiminococcus</i> , <i>Corynibacterium</i> , <i>Bifidobacterium pseudocanelatum</i> , <i>Nisseria subflava</i> , <i>Alcalignes sp.</i> RT-PCR-DGGE: no clostridiales		
3					8,7	0,9		<i>Acidiminococcus</i> , <i>Corynibacterium</i> , <i>Bifidobacterium pseudocanelatum</i> , <i>Nisseria subflava</i> , <i>Alcalignes sp.</i> RT-PCR-DGGE: no clostridiales		

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
10	Lodo anaerobio proveniente de reactor metanogénico UASB escala real - TT	Suero de queso en polvo + MM	5,9	37	8,8	1,2	Butirato y acetato fueron los productos de fermentación encontrados.	PCR - DGGE: <i>Clostridium butyricum</i> fue dominante.	-	Dávila - Vázquez et al., 2009
6					10,4	0,85		PCR - DGGE: <i>Clostridium sp.</i> dominante, en menor proporción <i>C.peroputrificum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	-	
4					2,5	0,5	El propionato pasó a ser el producto de fermentación dominante, en menor proporción se detectó acetato	PCR - DGGE: Solamente se detectó a <i>Streptococcus sp.</i>	La biomasa se lavó del reactor, se reinocula el reactor	
6					12,5	1,1	Butirato y propionato principales productos de fermentación, también se detecta acetato pero en menor concentración	PCR - DGGE: <i>Clostridium butyricum</i> y <i>Clostridium sp.</i>	Cambio en la OLR, pero mantenimiento del HRT	
6					19,5	1,3				
6					25	1,4				
6					24,4	1				
10	Enriquecimiento en medio rico de una muestra de agua de un fuente termal	Glucosa + MM	5	37	2	0,7	El lactato dejó de detectarse al disminuir el tiempo de retención en la operación, el ácido butírico pasó a ser e ácido más abundante seguido del acetato y el formiato en similar concentración.	PCR - DGGE: <i>Clostridium butyricum</i> dominante en la población, <i>C. ramosum</i> , <i>C. chartatabidum</i> , <i>Bacillus coagulans</i>	-	Karadag & Puhakka, 2010
7,5					2,9	0,8		PCR - DGGE: <i>Clostridium butyricum</i> dominante en la población además se encontró a <i>C. ramosum</i>	-	
6					3,9	0,8		-		
5					4,6	0,8		-		
4	Lodo proveniente de planta de tratamiento de aguas residuales municipales	Glucosa + MM	4 - 4,5	35	3,8	0,25	EtOH fue el metabolito más producido, seguido del acetato. También se detectó propionato	<i>C. hystolicum</i> (48%), <i>C.litoseburens</i> (30%) y <i>Enterobacter</i> (22%). Postulan que la mayor producción de H <sub>2</sub> fue por la sinergia entre varias vías productoras de H <sub>2</sub> .	FISH con sondas para <i>C. hystolicum</i> , <i>C. litosiburens</i> y <i>Enterobacter</i>	Song et al., 2011
			6 - 6,5		3,5	0,23	Los metabolitos más producidos fueron butirato y acetato. También se detectó propionato	<i>C. hystolicum</i> (24%), <i>C. litoseburens</i> (55%), <i>Enterobacteria</i> (22%), postulan que la producción de H <sub>2</sub> fue por fermentación butírica		

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia	
36	Cultivo enriquecido con <i>C. butyricum</i>	Jarabe de caña de azúcar	6	37	0,13	0,05	El ácido láctico fue el producto de fermentación más producido durante todos los TRC. Al disminuir el tiempo de retención disminuyó la concentración de ácido butírico y de ácido propiónico y aumento la concentración de EtOH. También se detectó acetato durante toda la operación.	PCR - DGGE: <i>Lactobacillus harabinensis</i> estuvo presente en todos los TRCs, <i>Clostridium butyricum</i> no se encontró en la operación con TRC=36 horas, <i>Klebsiella pneumoniae</i> estuvo presente en todos los TRCs también, pero con menos dominancia en las operaciones con TRC=12 y 6 horas	-	Pattra et al., 2011	
24						0,26					0,1
12						0,23					0,08
6						0,99					0,4
4						1,8					1
48	lodo proveniente de digestor de planta de tratamiento de aguas residuales municipales	Sacarosa + MM	5,5	37	no reportado	0,26	El acetato y el butirato fueron los metabolitos más abundantes durante todos los TRCs, el propionato fue detectado en poca concentración, mientras el lactato también fue uno de los principales productos de fermentación detectados.	PCR - DGGE: <i>C. butyricum</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>C. mesophilicum</i> , <i>Selenomonas sp.</i>	-	Mariakakis et al., 2011	
53						0,94		PCR - DGGE: <i>C. butylicum</i> y <i>Slenomonas sp.</i>			
38						1,72		PCR - DGGE: <i>Ethanolingenens harabinense</i> , <i>C. acetobutyricum</i> , <i>C. ljungdahlii</i> , <i>Prevotella sp.</i>			
43						1		PCR - DGGE: <i>C. butyricum</i> , <i>C. acetobutyricum</i> , <i>C. ljungdahlii</i> , <i>Prevotella sp.</i>			
12						0,47		PCR - DGGE: <i>Ethanolingenens harabinense</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>C. acetobutyricum</i> , <i>C. ljungdahlii</i> , <i>Prevotella sp.</i>			
12						0,07		PCR - DGGE: <i>Ethanolingenens harabinense</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>C. acetobutyricum</i> , <i>C. ljungdahlii</i> , <i>Prevotella sp.</i> , <i>C. beijerinckii</i> , <i>Selenomonas sp.</i>			
12	Lodo de costa del mar	Sacarosa + MM	5,5	37	8,6	1,74	El butirato fue el metabolito mayormente producido seguido del acetato, hubo baja concentración de lactato y EtOH	-	La presión dentro del reactor se mantuvo a 0,38 atm.	Lee et al., 2012	
8						15					2,14
6						20,8	2,25				
4						44	2,03				EL butirato sigue siendo el producto de fermentación principal seguido por el lactato.

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
10	Enriquecimiento utilizando como inóculo lodo de fuente termal	Xylosa + MM	5,1	37	0,038	0,32	El butirato y el acetato fueron los productos de fermentación más producidos a ambas temperaturas. También se detectó EtOH, su concentración disminuyó significativamente con el aumento de la temperatura.	PCR - DGGE: <i>C. acetobutylicum</i> fue dominante en las dos operaciones, <i>C. butyricum</i> solo se encontró al comienzo de la operación, <i>C. tyrobutiricum</i> y <i>C. diolis</i> se mantuvieron durante toda la operación a 37° C. Solo <i>Citrobacter freundii</i> se detectó a 45° C además de <i>C. acetobutylicum</i> .	-	Makinen et al., 2012
				45	0,16	1,37				
24	Cultivo de <i>C. bifermentans</i>	Glucosa + MM con alta concentración de NaCl.	5,5	35	1,5	0,7	El acetato fue el metabolito más producido a TRC=24 horas, mientras el lactato fue el más producido a TRC= 18 horas. El butirato aumento su concentración a TRC=12 y 6 horas. También se detectó propionato en menor proporción que los otros ácidos	FISH: <i>C. bifermentans</i> no detectado	-	Zhang et al., 2013
18					2,2	0,8				
12					2,8	1,1				
6					2,7	0,9		FISH: <i>C. bifermentans</i> detectado		

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
6	Lodo anaerobio proveniente de reactor metanogénico - TT	Glucosa + MM	5,5	37	2,9	1,21	Butirato y lactato fueron los productos de fermentación más abundantes en todas las operaciones.	CE - SSCP: <i>Clostridium butyricum</i> fue la población más abundante, seguido de poblaciones menores como <i>C. beijerinckii</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>B. racemilacticus</i> , <i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	-	Rafrafi et al., 2013
6	Lodo anaerobio proveniente de reactor metanogénico	Glucosa + MM	5,5		4,9	1,92		CE - SSCP: <i>C.pasterianum</i> dominante, también se encontró <i>Bacillus racemilacticus</i>	-	
6	Harina de mandioca ferementada - TT	Glucosa + MM	5,5		4,3	1,79		CE - SSCP: <i>C. pasterianum</i> población dominante, en menor proporción <i>C. beijerinckii</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lacobacillus nagelii</i> , <i>Lactobacillus ghanensis</i>	-	
6	Harina de mandioca fermentada	Glucosa + MM	5,5		3,5	1,41		-	-	
6	Caecotrofos - TT	Glucosa + MM	5,5		4	1,72		-	-	
6	Caecotrofos	Glucosa + MM	5,5		3,5	2,32		CE - SSCP: <i>C. pasterianum</i> fue dominante en la comunidad, en menor proporción: <i>C. beijerinckii</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lacobacillus nagelii</i> , <i>Lactobacillus ghanensis</i> y <i>E.coli</i>	-	
6	Mezcla (lodo anaerobio + harina de mandioca fermentada + caecotrofos)	Glucosa + MM	5,5		4,3	1,87		CE - SSCP: <i>C. pasterianum</i> fue dominante en la comunidad, en menores proporcione se encontraron: <i>C. beijerinckii</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lacobacillus nagelii</i> , <i>Lactobacillus ghanensis</i>	-	

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
8	Compost	Efluente de industria de bebidas	5,5	37	8,58	1,04	Butirato y acetato fueron los productos de fermentación encontrados en mayor concentración. También se detectó propionato. Con el aumento de la temperatura disminuyó la concentración de propionato.	PCR - DGGE: <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>Selenomonas lactifex</i> , <i>Bifidobacterium canelatum</i> .	-	Sivagurunathan et al., 2014
				45	13,6	1,68		PCR - DGGE: <i>C. tyrobutyricum</i> fue dominante en la comunidad, seguido por <i>C. perfringens</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. acetobutylicum</i> y <i>Ethalonigenens harbinense</i>		
12	Enriquecimiento de <i>Clostridium butyricum</i>	Jarabe de caña de azúcar	5,0 - 6,0	37	1,18	0,3	El lactato fue dominante en las operaciones de 12 y 6 horas. Al disminuir el TRC, disminuyó la concentración de lactato y al de butirato aumentó. También se detectó acetato, succinato, citrato y trazas de formiato.	PCR - DGGE: <i>Clostridium sp.</i> y <i>Acetostipes sp.</i> fueron dominantes, <i>Olsenella sp.</i>	-	Nualsri et a., 2016
6					3,34	0,42				
4					8,67	0,82				
3					17,5	1,32				
2					17,4	1,28				
12	Enriquecimientos en PYG (galactosa) previamente inoculados con lodo de planta de tratamiento de aguas municipales - TT	Galactosa + MM	5,5	35	1,71	0,82	EL butirato, lactato y acetato fueron los productos de fermentación mayoritarios. También se detectó EtOH y propionato pero en menor concentración.	Pirosecuenciación 454: <i>Sporolactobacillus sp.</i> fue dominante en la comunidad, seguido de <i>Clostridium sp.</i> en menor proporción se encontró <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Sterotrophomonas sp.</i> y <i>Prevotella sp.</i>	-	Sivagurunathan et al., 2016

TRC (horas)	Inóculo	Sustrato	pH	Temperatura (°C)	VPH2 (LH2/Ld)	RH2 (mol H2/ mol hexosa)	Metabolitos detectados	Técnica utilizada para análisis de la comunidad microbiana y microorganismos reportados	Observaciones	Referencia
6	Lodo aclimatado en sustrato a utilizar	Lactosa + MM	5,9	37	1,04	0,3	Butirato y acetato fueron los productos de fermentación mayoritarios para TRC= 6, 12 y 18 horas, a medida que aumentó el TRC, la concentración de lactato también aumentó hasta ser el metabolito mayoritario (TRC=24 horas). También se detectaron: succinato (TRC=6 horas), formiato (TRC= 6 y 12 horas), EtOH (TRC= 6, 12 y 18) y propionato (TRC= 12, 18 y 24 horas).	Pirosecuenciación 454: La familia <i>Clostridiaceae</i> es dominante en la comunidad, seguido por <i>Enterobacteriaceae</i> , familias presentes en menor abundancias son <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Sporolactobacillae</i>	-	Palomo - Briones et al., 2017
12	Lodo aclimatado en sustrato a utilizar	Lactosa + MM	5,9	37	2,38	0,8		Pirosecuenciación 454: <i>Enterobacteriaceae</i> es dominante en la comunidad, seguido de <i>Sporolactobacillae</i> , en menor proporción se encuentran <i>Clostridiaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Pseudomonaceae</i> .		
18	Lodo aclimatado en sustrato a utilizar	Lactosa + MM	5,9	37	0,77	0,2		Pirosecuenciación 454: <i>Sporolactobacillae</i> es dominante en la comunidad, en menor proporción están <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> y <i>Enterobacteriaceae</i>		
24	Lodo aclimatado en sustrato a utilizar	Lactosa + MM	5,9	37	0,43	0,1		Pirosecuenciación 454: <i>Sporolactobacillae</i> es dominante en la comunidad, en menos proporción se encuentran microorganismos de las familias <i>Streptococcaceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> y <i>Lachnospiraceae</i> .		

## 1.8 – Antecedentes del trabajo de Tesis

El grupo de Investigación del Departamento de Ingeniería de Reactores, BioProA, liderado por la Dra. Liliana Borzacconi y el grupo de Investigación de Ecología Microbiana liderado por la Dra. Claudia Etchebehere han trabajado en colaboración por más de 20 años. De esta colaboración han surgido diferentes proyectos de investigación, tesis de grado y de posgrado y se han publicado artículos en conjunto sobre la investigación de sistemas de tratamiento de efluentes industriales (Cabezas et al., 2006; Borzacconi et al., 2008; Cabezas et al., 2009; Castelló et al., 2009; Castelló et al., 2011; Perna et al., 2013).

En este marco han surgido varios proyectos para el estudio de la producción de  $H_2$  a partir de suero de queso. Este subproducto se genera en grandes cantidades en nuestro país y por su alto contenido en materia orgánica es necesario tratarlo para su disposición final. El contenido de carbohidratos de este residuo lo hace un sustrato interesante para ser utilizado en el proceso de fermentación oscura para la producción de  $H_2$

En los primeros estudios realizados se testeó la factibilidad de producir hidrógeno a partir de suero de queso utilizando diferentes tipos de reactores (UASB, lecho fijo y CSTR). Se demostró que es posible producir hidrógeno a partir de este sustrato con las diferentes configuraciones de reactor y los distintos inóculos utilizados (Castelló et al., 2009; Castelló et al., 2011; Perna et al., 2013). Sin embargo, el rendimiento obtenido en estos trabajos de investigación estuvo por debajo del máximo teórico y del obtenido en otros trabajos de producción de  $H_2$  por lo cual se consideró necesario continuar los estudios para avanzar en este aspecto. Por lo tanto se planteó un proyecto de investigación en el cual se intentó dilucidar las condiciones operacionales que llevaran a un mejor rendimiento en  $H_2$  utilizando suero de queso como sustrato. Para cumplir con dicho objetivo se utilizó con un reactor de tanque agitado (CSTR) y compost como inóculo. De los resultados obtenidos en este trabajo se observó que la  $VPH_2$  y el  $RH_2$  seguían siendo más

bajos que el máximo teórico y el proceso tuvo la misma inestabilidad que en los estudios antes realizados (Castelló, 2014).

A partir de estos resultados nos planteamos que: 1) la inestabilidad en la producción de  $H_2$  y el bajo rendimiento en el mismo podrían deberse al consumo de hidrógeno por homoacetogénesis, ya que no se detectó metanogénesis durante la operación. Esta idea surgió porque en bibliografía se ha reportado que el consumo de  $H_2$  por este proceso podría ser importante en los reactores productores de  $H_2$  sin metanogénesis (Saady, 2013); Y 2) también nos planteamos que la interacción entre las bacterias lácticas y los productores de  $H_2$  podría ser la causa de la inestabilidad en la producción y el bajo rendimiento, ya que se ha reportado en bibliografía que la prevalencia de estas bacterias es perjudicial para la producción de  $H_2$  (Noike et al., 2002; Jo et al., 2007; Castelló et al., 2009).

Los reportes encontrados sobre la prevalencia de estas vías metabólicas son contradictorias, por un lado se ha reportado que, tanto la homoacetogénesis como la fermentación láctica se beneficiarían a tiempos de retención largos (Dinamarca et al., 2009; Karadag & Puhakka, 2010), mientras otros autores reportan la prevalencia de la fermentación láctica en un amplio rango de TRC aplicados (desde 72 horas hasta 4 horas, Jo et al., 2007; Pattra et al., 2011, respectivamente) y que la homoacetogénesis puede ser favorecida a TRC cortos de entre 6 y 4 horas (Arooj et al., 2008a).

De esta información obtenida por bibliografía y de nuestras experiencias en la producción de  $H_2$  a partir de suero de queso, surgió un proyecto de investigación en el cual uno de sus objetivos fue estudiar la influencia de estas vías metabólicas (fermentación láctica y homoacetogénesis) en la producción de  $H_2$ . En el marco de este proyecto de investigación se realizó esta Tesis de Maestría.

## 1.9 – Objetivo general de la Tesis

El objetivo general de esta Tesis de Maestría fue estudiar la influencia del tiempo de residencia celular en la producción de H<sub>2</sub> en un reactor de tanque agitado.

## 1.10 – Objetivos específicos de la Tesis

- 1) Estudiar el efecto del TRC en la velocidad de producción de H<sub>2</sub> y en el rendimiento en H<sub>2</sub>.
- 2) Determinar cuáles son las vías metabólicas que prevalecen en los diferentes TRC aplicados.
- 3) Analizar cuáles son los microorganismos que prevalecen en las operaciones del reactor a diferentes tiempos de residencia celular.
- 4) Estudiar el efecto de la prevalencia de las bacterias lácticas en la estabilidad de la producción de H<sub>2</sub>.
- 5) Estudiar el efecto de la homoacetogénesis en la estabilidad de la producción de H<sub>2</sub>.

## 1.11 – Estrategia experimental

Se operó un reactor CSTR inoculado con un lodo proveniente de un reactor metanogénico para tratar efluente lácteo. Se utilizó una alimentación sintética a base de glucosa, para disminuir la carga microbiana presente en la alimentación, y evitar el efecto de la misma en las diferentes operaciones, ya que se ha reportado que puede afectar la operación (Jo et al., 2007; Carrillo – Reyes et al., 2014). Se realizaron 3 operaciones a diferentes tiempos de residencia celular (24, 10 y 6 horas) para determinar cómo influye este parámetro en la producción de H<sub>2</sub>. La operación del reactor se monitoreó mediante el análisis de la producción de biogás y su composición, la detección y cuantificación de la concentración de los ácidos orgánicos como acetato, lactato, propionato y butirato y mediante la recolección de muestras de la biomasa microbiana. Mediante el análisis de T-RFLP del gen del ARN 16S se monitoreo la abundancia relativa y la dinámica de los grupos de microorganismos presentes en la comunidad microbiana del reactor a lo largo del tiempo de operación. Para conocer la identidad de los microorganismos

seleccionados durante las diferentes operaciones se utilizó la técnica de secuenciación masiva. En esta técnica se utilizó en dos muestras de cada operación tomadas durante períodos de alta y baja producción de hidrógeno. Los resultados de la operación de los reactores se correlacionaron con los resultados del análisis de las comunidades microbianas de manera de entender los procesos que ocurrieron durante la operación.

## **CAPÍTULO II – MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2 - MATERIALES Y MÉTODOS

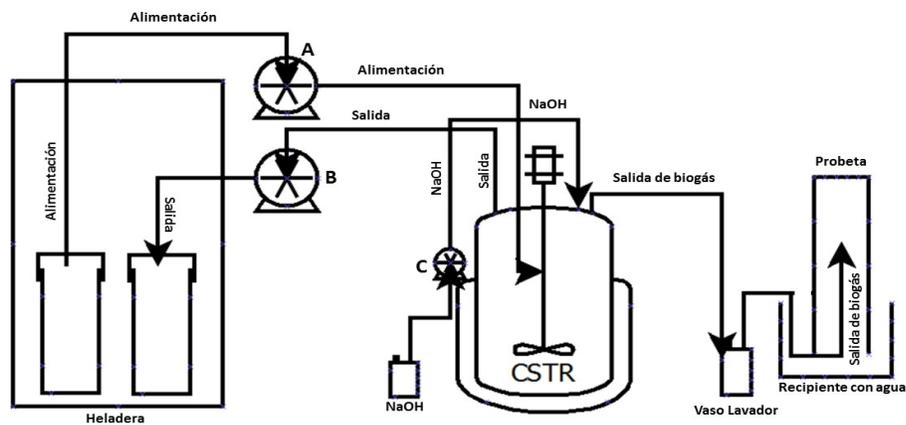
### 2.1 - Operación del reactor CSTR a distintos tiempos de residencia celular.

Se operó un reactor CSTR en modo continuo con diferentes TRC con el objetivo de estudiar la influencia de este parámetro en la inestabilidad y el rendimiento de la producción de hidrógeno. Un esquema del reactor utilizado se observa en la figura 2.1.

Los TRC ensayados fueron 6, 10 y 24 horas. En todos los casos la temperatura, el pH de operación y la agitación fueron de 35°C, 5,5 y 200 rpm respectivamente. El reactor CSTR utilizado tiene un volumen total de 5 L, el volumen de trabajo fue de 3L.

La alimentación y descarga de líquido se realizó mediante bombas peristálticas ajustando el caudal entregado para que el volumen de líquido en el reactor permaneciera constante.

La producción de biogás fue medida por desplazamiento de volumen de agua (figura 2.1). La salida de gas del reactor fue conectada a un vaso lavador conteniendo agua acidificada con HCl para evitar la disolución del CO<sub>2</sub> en el agua (Ren & Gongaret, 2006).



**Figura 2.1** – Esquema de la configuración del reactor empleada para la operación en los distintos TRC. A: Bomba peristáltica reguladora de la velocidad de entrada de NaOH. B: Bomba peristáltica reguladora de la velocidad de entrada de la alimentación. C: Bomba peristáltica reguladora de la velocidad de entrada de NaOH en el vaso lavador.

reguladora de la velocidad de salida del efluente del reactor. C: Bomba peristáltica regulada por pH, si el pH era menor que 5,5, la bomba se encendía e ingresaba NaOH al reactor.

## 2.2 – Inóculo y alimentación utilizada.

En principio se pensaba utilizar como inóculo compost, ya que en un estudio realizado anteriormente se comprobó que tenía una buena capacidad de producción de H<sub>2</sub> (Castelló, 2014, Tesis de Doctorado). Para esta experiencia se utilizaría un compost comercial adquirido a la empresa Tresa. Se realizaron algunas operaciones con este inóculo pero el material no fue adecuado para las condiciones de operación utilizadas. Estos inconvenientes experimentales son detallados en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1** – Operaciones fallidas del reactor CSTR inoculado con compost: causas del fallo, tratamientos aplicados y duración de las operaciones.

Operación	TRC	Inóculo	Tratamiento	Inconvenientes	Duración
1	24 horas	Compost Tresa	Ninguno	Oclusión de mangueras. Crecimiento de hongos. Lavado de Biomasa	5 días
2	24 horas	Compost Tresa	Secado ON* a 105°C.	Oclusión de mangueras. Lavado de biomasa.	25 días
3	10 horas	Compost Tresa	Secado y mortereado. Aclimatación con operación secuencia batch	Oclusión de mangueras. Lavado de biomasa.	9 días
4	10 horas	Compost Tresa	Secado, mortereado y tamizado por malla nº 20 (0,824mm diámetro de poro). Aclimatación con operación secuencia batch.	Oclusión de mangueras y lavado de biomasa.	10 días

\*ON: de un día al otro (del inglés: *Over night*)

Por estos inconvenientes se decidió utilizar como inóculo el lodo de un reactor UASB para tratamiento de efluente lácteo (Passeggi et al., 2012). El inóculo fue pre-tratado térmicamente para seleccionar a los microorganismos productores de H<sub>2</sub> del género *Clostridium* y eliminar a las arqueas metanogénicas y otros microorganismos competidores por sustrato como las bacterias lácticas (Mohan et al., 2008, Carrillo-Reyes et al., 2014). Según lo reportado en bibliografía no hay un método estándar para realizar los tratamientos térmicos a los inóculos, éstos varían la duración desde 15 minutos (Kim et al., 2006), hasta 12 horas (Dinamarca et al.,

2009) y la temperatura desde 80°C (Sivagurunathan et al., 2014), hasta 121°C (Rafrafi et al., 2013). En nuestro estudio, se disgregaron los gránulos del inóculo mediante mortereado y luego fue hervido por 90 minutos similar a lo reportado por Wongaret et al., 2007. Se utilizó el mismo tratamiento térmico para los inóculos de las tres operaciones.

Antes de comenzar las operaciones en continuo con el TRC deseado se realizó una etapa de aclimatación. Durante la misma el reactor se operó en modo secuencia batch, ya que se ha reportado que por este método se favorece la producción de H<sub>2</sub> (Buitrón et al., 2010). Para ello, diariamente se dejaba sedimentar la biomasa contenida en el reactor por 1 hora, de forma de evitar pérdidas importantes de biomasa al intercambiar el líquido del reactor por alimentación nueva. Aproximadamente, se intercambiaban 2,0 L del volumen del reactor por nueva alimentación. La operación de aclimatación se continuaba hasta tener una cantidad de sólidos mayor de 1,0 gSSV L<sup>-1</sup> para el arranque en modo continuo y hasta la detección de producción de H<sub>2</sub>. En la tabla 2.2 se detalla la duración de cada una de las operaciones de aclimatación en modo secuencia batch.

Como sustrato para la alimentación de los reactores, en cada operación se utilizó glucosa. Durante la etapa de aclimatación del inóculo la concentración de sustrato fue 15 gDQO L<sup>-1</sup>. Para las operaciones en modo continuo la concentración de glucosa se ajustó de modo que la carga orgánica aplicada fuera en todos los casos 30 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. En la tabla 2.2 se muestran las concentraciones de glucosa utilizadas para la operación en modo continuo para cada uno de los TRC ensayados.

**Tabla 2.2** – Concentraciones de glucosa utilizadas en la alimentación durante el período de aclimatación en modo secuencia batch y durante la operación en modo continuo. También se muestra la duración de cada una de las operaciones en modo secuencia batch y en modo continuo.

TRC	Periodo de aclimatación en modo de operación - batch (días)	Concentración de glucosa en operación batch (g L <sup>-1</sup> )	Duración de la operación en modo continuo (TRC)	Concentración glucosa (g L <sup>-1</sup> ) en la operación en modo continuo
6 horas	4	14	20	7
10 horas	7	14	24	12,5
24 horas	8	14	23	28

La alimentación, (tanto en las operaciones de aclimatación como en modo continuo) consistía de sustrato (glucosa), fuente de vitaminas y coenzimas: extracto de levadura (3,0 g L<sup>-1</sup>) y medio mineral modificado de Dávila – Vázquez et al., 2011, compuesto por: (g L<sup>-1</sup>) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 19,2; NH<sub>4</sub>Cl 2,1 y NaCl 2,6; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,125; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,100; MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,0088; FeCl<sub>3</sub> 0,0179; CuCl 0,0025; NiCl<sub>2</sub> 0,0553; ZnCl<sub>2</sub> 0,075.

## 2.3 – Monitoreo del líquido y del biogás

Se determinó la DQO, SST y SSV de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 1995).

Los ácidos orgánicos volátiles fueron determinados por cromatografía gaseosa, en GC 14B Shimadzu, con detector FID (hidrógeno y aire, con presión en el equipo de 50 kPa cada uno) y Columna Nukol (15 M x 0,53mm ID, 0,5 µM film). Se utilizaron los siguientes parámetros para el análisis: Temperatura inicial de la columna: 104°C mantenida por 3 minutos, temperatura final de la columna: 190°C mantenida por 2 minutos, velocidad de calentamiento: 25°C min<sup>-1</sup>. El carrier utilizado fue nitrógeno. Preparación de las muestras: se acidificó 1,5 mL de muestra con HCl 1M hasta alcanzar un pH=2, luego se centrifugó a 13400 rpm (centrifuga eppendorf® minispin®), el sobrenadante fue posteriormente filtrado por 0,22 µM. El volumen de muestra analizado fue de 0,2 µL. El ácido láctico fue detectado por HPLC en equipo Shimadzu compuesto por bomba LC 20 AT, horno CTO 10 AS VP, detector RID-10 A y SPD-20 A, inyector automático SIL 20 AC HT. Software utilizado: Lab Solutions. Columna: Aminex HPX-87H (7,8mm x 300mm),

pre-columna: Aminex-87H. La fase móvil utilizada fue H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 N filtrada por 0,22 µm. Previo al análisis las muestras fueron acidificadas con una solución de ácido sulfosalicílico (20g dL<sup>-1</sup>), centrifugadas y luego filtradas por filtros de 0,22µm. El análisis fue realizado a 45°C, el flujo de la fase móvil 0,3mL min<sup>-1</sup> a una presión de 28 kgf, con una duración de 30 minutos.

La composición del biogás (H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>) se determinó por cromatografía gaseosa en GC 2014 Shimadzu con inyección manual. El carrier utilizado fue gas argón con flujo 25mL min<sup>-1</sup>, presión de 8 bar. La temperatura del detector, pre-calentador e inyector fue de 120°C. La temperatura inicial de la columna fue de 30°C y se mantuvo por 1,5 minutos, la temperatura final de la columna fue de 120°C y se mantuvo por 2 minutos y la velocidad de calentamiento fue de 35°C min<sup>-1</sup>. El volumen de biogás analizado en cada caso fue de 1 mL.

La concentración de glucosa fue determinada kit enzimático de Weiner Lab.

## 2.4 – Balance de electrones

El balance de electrones se realizó tomando en cuenta que lo que la cantidad de electrones ingresados en la alimentación del reactor, debe ser igual a la cantidad de electrones detectados a la salida del reactor.

Siguiendo este razonamiento, los gDQO d<sup>-1</sup> ingresados en la alimentación, deberían ser iguales a los gDQO d<sup>-1</sup> detectados a la salida del reactor:

$$DQO_E \left( \frac{gDQO}{d} \right) = DQO_S \left( \frac{gDQO}{d} \right) \quad \text{Ecuación 2.1}$$

$DQO_E$  corresponde a los gDQO d<sup>-1</sup> ingresados en la alimentación y fueron calculados como:

$$DQO_E \left( \frac{gDQO}{d} \right) = \text{Glucosa de entrada} \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

$DQO_S$  corresponde a la suma de la gDQO d<sup>-1</sup> de los metabolitos detectados a la salida del reactor, la biomasa formada y la glucosa remanente (glucosa no utilizada que fue detectada a la

salida del reactor). Los metabolitos detectados fueron: Lactato, acetato, propionato, butirato, OTROS e H<sub>2</sub> y se calcularon de la siguiente manera:

$$DQO_S \left( \frac{gDQO}{d} \right) = Lactato \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + Acetato \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + Butirato \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + Propionato \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + OTROS \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + H_2 \left( \frac{gDQO}{d} \right) + glucosa remanente \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + Biomasa \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} \quad Ecuación 2.3$$

$v_{op}$  corresponde al caudal de líquido promedio entre el caudal de salida de líquido del reactor y el caudal de entrada de la alimentación al reactor, de cada una de las operaciones. Este caudal varío según el TRC de cada una de las operaciones. OTROS es la suma de las concentraciones (gDQO L<sup>-1</sup>) de los ácidos isobutírico, valérico isocaproico y heptanoico. La DQO correspondiente a la concentración de la biomasa se calculó utilizando el factor de conversión de la biomasa 1,42 gO<sub>2</sub> gbiomasa<sup>-1</sup> (Rittman & Mc Carthy, 2001)

La cantidad de hidrógeno producido por día en gDQO d<sup>-1</sup> se calculó de la siguiente manera:

$$H_2 \left( \frac{gDQO}{d} \right) = v_{H_2} \left( \frac{LH_2}{d} \right) * DH_2 \left( \frac{gH_2}{LH_2} \right) * FC_{H_2} \left( \frac{gO_2}{gH_2} \right) \quad Ecuación 2.4$$

DH<sub>2</sub> = densidad del H<sub>2</sub>; FC<sub>H<sub>2</sub></sub> = factor de conversión del H<sub>2</sub> a DQO.

Finalmente para transformar los gDQO d<sup>-1</sup> de entrada y de salida en electrones ingresados por día o e<sup>-</sup><sub>E</sub> (e<sup>-</sup>d<sup>-1</sup>) y en electrones detectados por día o e<sup>-</sup><sub>S</sub> (e<sup>-</sup>d<sup>-1</sup>) multiplicamos por el número de electrones del oxígeno:

$$DQO_E \left( \frac{gDQO}{d} \right) * 8 = e^-_E \left( \frac{e^-}{d} \right) \quad Ecuación 2.5$$

$$DQO_S \left( \frac{gDQO}{d} \right) * 8 = e^-_S \left( \frac{e^-}{d} \right) \quad Ecuación 2.6$$

Análogamente a la ecuación 2.1 los electrones ingresados deberían ser iguales a los detectados, entonces:

$$e^-_E \left( \frac{e^-}{d} \right) = e^-_S \left( \frac{e^-}{d} \right) \quad \text{Ecuación 2.7}$$

$$e^-_E \left( \frac{e^-}{d} \right) = 100\% \quad \text{Ecuación 2.8}$$

Como se observa en la ecuación 2.8 los electrones de entrada corresponden al 100% de los electrones disponibles del sustrato para utilizar.

Se calculó el % de electrones de la glucosa de entrada que fue destinado a cada metabolito detectado, tomando como ejemplo el lactato se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Lactato} \left( \frac{gDQO}{d} \right) * 8 * 100}{e^-_E \left( \frac{e^-}{d} \right)} = \% e^-_{\text{Lactato}} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

La misma ecuación se utilizó para calcular el % de los electrones de la glucosa de entrada destinado a los otros metabolitos detectados, a la biomasa y al H<sub>2</sub>. También se calculó de la misma forma el % de electrones no utilizados correspondiente a la glucosa remanente detectada a la salida del reactor.

El balance de electrones se calculó de la siguiente manera:

$$\% e^-_s = \% e^-_{\text{Lactato}} + \% e^-_{\text{Acetato}} + \% e^-_{\text{Butirato}} + \% e^-_{\text{Propionato}} + \% e^-_{\text{OTROS}} + \% e^-_{\text{H}_2} + \% e^-_{\text{Glucosa remanente}} + \% e^-_{\text{Biomasa}} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

$$100 - \% e^-_s = \% \text{ de electrones no determinados} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

El porcentaje de electrones no determinado a la salida del reactor puede deberse a la producción de metabolitos no detectados por las técnicas utilizadas en esta tesis.

## 2.4 – Análisis microbiológicos

La frecuencia de muestreo de las muestras de biomasa para extraer ADN de la comunidad microbiana del reactor fue de aproximadamente cada 4 TRC en cada operación. Las muestras de biomasa se obtuvieron mediante centrifugación de 1,2 L del líquido de la salida del reactor

(este líquido fue conservado a 4°C antes de ser centrifugado, figura 2.1). Se utilizó una centrifuga Sigma 3-16 KL, rotor 1800 a velocidad máxima (4500 rpm) por 45 minutos. El pellet resultante fue conservado a -20°C, para su posterior utilización.

Previo al análisis de la comunidad microbiana de los reactores se realizaron las extracciones de ADN provenientes de las muestras de biomasa tomadas de los mismos. El ADN fue extraído utilizando el kit de extracción de ADN ZR Soil Microbe DNA kit™ (Zymo Research, Orange, CA, USA). La comunidad microbiana presente en los reactores fue analizada por el método de fingerprinting T – RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) del gen codificante para el ARNr 16S. La reacción de PCR se realizó utilizando primers universales para el dominio Bacteria, 27 – forward (5' – AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3' marcado con el fluoróforo 6-FAM en el extremo 5') y 1492 – reverse (5' – TACGGYTACCTTGTTACGACTT – 3'). La digestión con enzimas de restricción se realizó con la enzima *MspI* (Fermentas) (Castelló et al., 2011). El ciclado de PCR fue el siguiente: 94°C por 5 min (desnaturalización inicial) + 30 ciclos (94°C por 1 min (desnaturalización) + 55°C por 1 min (annealing) + 72°C por 3 min (extensión)) + 72°C por 7 minutos (extensión final). El producto de PCR fue analizado por gel de agarosa, para verificar que hubo amplificación. Luego este producto de PCR fue purificado con el kit™ DNA Clean and Concentrator (Zymo Research, Orange, CA, USA). Luego fue cuantificado el DNA en el producto de PCR mediante espectrofotómetro Nanodrop ND – 1000 (Thermo Scientific™). Para la digestión con la enzima *MspI* se utilizó una concentración de ADN de 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . La digestión se realizó a 37°C ON. La enzima luego fue inactivada mediante calor a 80°C por 10 min como es sugerido por el fabricante. Los fragmentos terminales se analizaron en la plataforma de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (Uruguay), según el siguiente protocolo: los fragmentos de DNA fueron secados y re-suspendidos en 8 mL de formamida y 0,3 mL del estándar de tamaño (GeneScan-500 Liz Standard, Applied Biosystems). Los fragmentos terminales (T – RF) fueron separados en un secuenciador automático ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados manualmente utilizando el software PeakScanner v 1.0 (Applied Biosystems). Se tomaron en cuenta solamente los fragmentos entre 50 y 600 pb. Las alturas de los picos se estandarizaron al mínimo de la muestra como se describe en Dunbar et al., 2001. El alineamiento resultó en una matriz donde cada T – RF fue considerado como un gen del ARNr de 16S diferente y la altura de cada T – RF en el cromatograma como indicativo de la abundancia relativa de ese gen en la muestra. Las abundancias relativas de los diferentes T – RF fueron calculadas como la relación entre la altura del T – RF y la suma de todas las alturas de todos los T – RF presentes en esa muestra.

De las muestras de las que se extrajo ADN se eligieron dos muestras de cada una de las operaciones para que fueran analizadas por secuenciación masiva utilizando la plataforma ION Torrent. Las muestras elegidas eran correspondientes con períodos de alta y baja producción de hidrógeno. Se amplificó la región V4 del gen del ARNr de 16S a partir del ADN genómico previamente extraído, utilizando los primers: 520 – forward (5' – AYTGGGYDTAAAGNG – 3') and 802 – reverse (5' – TACNVGGGTATCTAATCC – 3'). Los adaptadores y los códigos de barras (10 pb) para la secuenciación masiva mediante la plataforma ION Torrent fueron incluidos en los oligómeros de los primers (Claesson et al., 2009).

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,8 %. Aquellos amplicones de tamaño esperado (entre 200 – 300 pb) fueron purificados del gel de agarosa usando un kit comercial (ZR Zymoclean TM® Gel DNA Recovery Kit, USA). La secuenciación de las librerías de amplicones del gen del ARNr de 16S fue realizada en la plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

El análisis de los datos obtenidos fue realizado con el software QIIME v. 1.9.1 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso et al., 2010). Las secuencias fueron clasificadas según sus muestras en base al código de barra único asignado a cada una de las muestras. Se aplicó un filtro de calidad a los reads obtenidos que consistió en descartar las secuencias con largos

menores a 200 pb y con un indicador de calidad  $Q > 25$  al mismo tiempo se removieron los códigos de barras, adaptadores y primers. Luego, la remoción de quimeras y ruido se realizó utilizando USEARCH 6.1 (Edgar, 2010). Las OTUs fueron creadas utilizando un criterio de similitud del 95%, con este criterio se crearon 917 OTUs de novo. Las OTUs con 1 sola secuencia o menos (singletons) fueron removidas del análisis, con este filtro obtuvimos un total de 529 OTUs. Las secuencias fueron alineadas utilizando el algoritmo PyNAST (Caporaso et al., 2010). La asignación taxonómica fue realizada usando en algoritmo Uclast (Edgar, 2010), utilizando la base de datos curada Silva (<https://www.arb-silva.de/>) versión 128.

## 2.5 – Análisis Estadísticos y Multivariados

Los análisis multivariados y estadísticos se realizaron utilizando el programa PAST 3 v 1.0.0.0 (Hammer et al., 2001).

Las gráficas de boxplot se realizaron para visualizar gráficamente la variabilidad de la producción de hidrógeno en las diferentes operaciones y para analizar los datos obtenidos sobre el rendimiento en hidrógeno de la bibliografía. En estas gráficas los cuartiles 25 – 75 % son dibujados usando un rectángulo (caja), la media se indica con la línea horizontal dentro del rectángulo.

A partir de los resultados obtenidos por T – RFLP se realizaron análisis de clúster y de componentes principales para determinar la similitud entre las muestras. Para el análisis de componentes principales se utilizó una matriz de varianza – covarianza.

Para correlacionar los datos obtenido del análisis de la comunidad microbiana por T – RFLP con los datos de producción de  $H_2$  y de metabolitos producidos, se realizó una matriz de correlaciones de Pearson, utilizando los datos de abundancia de los T – RF obtenidos para cada una de las muestras analizadas, la  $VPH_2$ , el  $RH_2$ , y el porcentaje de electrones provenientes de la glucosa consumida destinados a ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido láctico. Utilizando estos mismos datos se realizó un análisis de correspondencia canónica.

## CAPÍTULO III - RESULTADOS

### 3 – RESULTADOS

En este trabajo se operó un reactor CSTR utilizando tres tiempos de residencia celular distintos: 6, 10 y 24 horas. El reactor fue operado por al menos 20 tiempos de retención celular en cada una de las operaciones con distinto TRC. A continuación se presentan los principales resultados obtenidos.

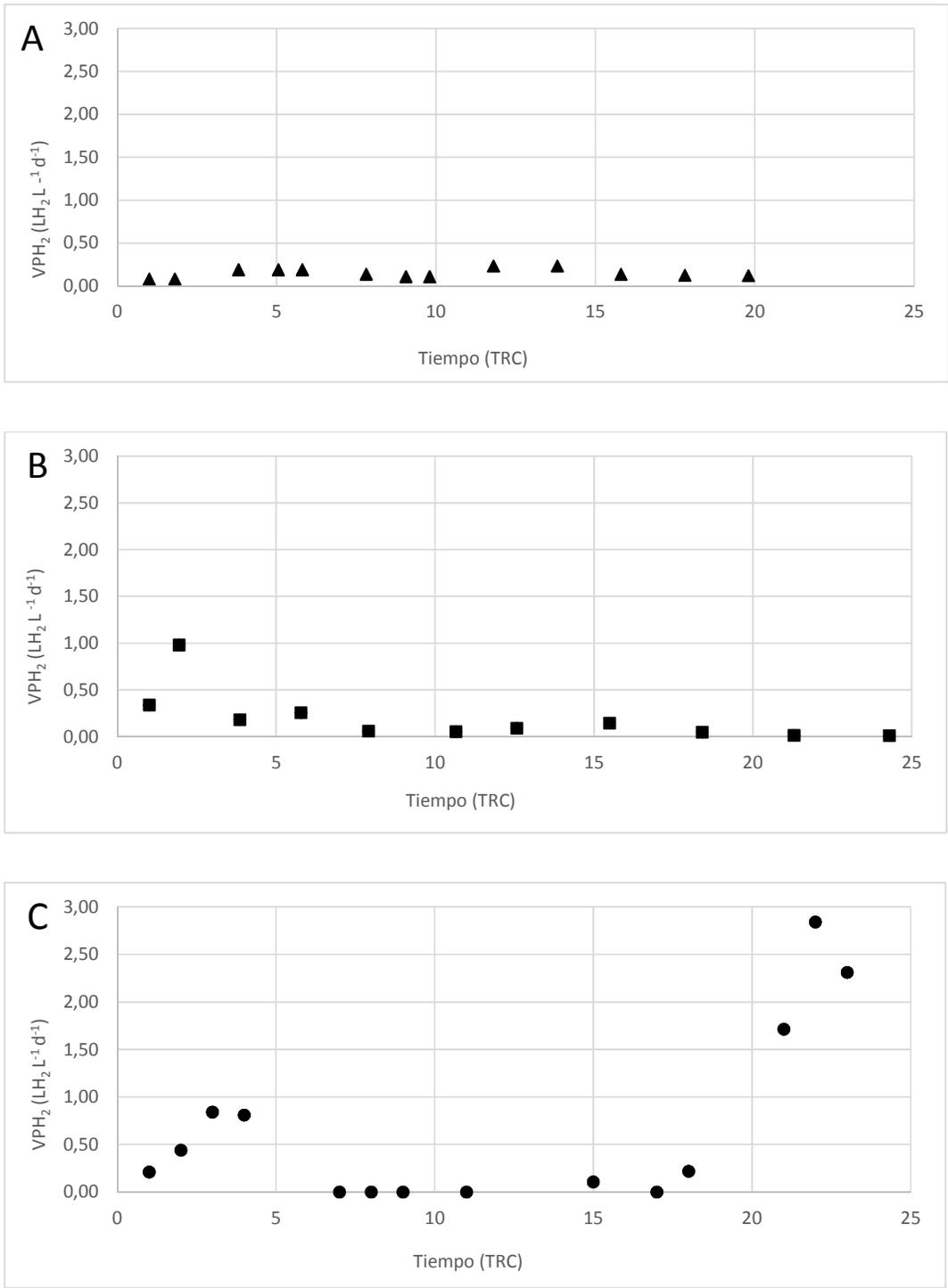
#### 3.1 – Producción de Biogás

El biogás estuvo compuesto únicamente por CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, pero la concentración de estos gases en el mismo fue variable a lo largo de todas las operaciones. En la tabla 3.1 se muestran los valores máximos y mínimos del porcentaje de H<sub>2</sub> en el biogás de todas las operaciones. No se detectó metano en ninguna de las operaciones.

La producción de biogás fue inestable principalmente en las operaciones a tiempos de residencia celular mayores, con períodos de alta y baja producción (Figura 3.1 A, B y C). Los rendimientos en hidrógeno (RH<sub>2</sub>) fueron más bajos que el máximo teórico que se puede obtener cuando el único producto de fermentación es el acetato, que es 4 moles de H<sub>2</sub> por mol de glucosa consumida (tabla 3.1).

**Tabla 3.1** – Valores máximos y mínimos de la velocidad de producción de hidrógeno (VPH<sub>2</sub>) y del rendimiento en H<sub>2</sub> (RH<sub>2</sub>) de las operaciones realizadas.

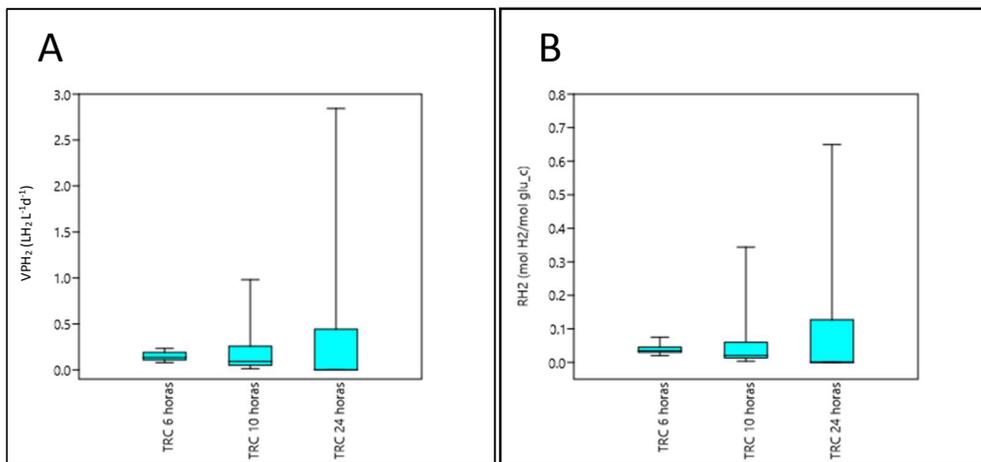
	VPH <sub>2</sub>		RH <sub>2</sub>	
	(LH <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )		(mol H <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup> glu_C)	
	Máx	Mín	Máx	Mín
TRC 6 horas	2,33E-01	7,91E-02	7,54E-02	2,12E-02
TRC 10 horas	9,81E-01	1,44E-02	3,44E-01	3,71E-03
TRC 24 horas	2,84E+00	0	6,49E-01	0



**Figura 3.1** – Velocidad de producción de H<sub>2</sub> (LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) de las tres operaciones: A) TRC 6 horas, B) TRC 10 horas, C) TRC 24 horas.

Como se observa en la figura 3.1 y en la tabla 3.1 la operación con TRC 24 horas fue la que tuvo la mayor VPH<sub>2</sub> y el mayor RH<sub>2</sub>, aunque en esta operación hubo un período de 10 días sin

producción de hidrógeno. Durante ese período el pH disminuyó a valores cercanos a 4 debido a una falla en el control del pH. En cambio, en las operaciones con TRC de 6 y 10 horas siempre hubo producción de hidrógeno, aunque presentaron menores valores de  $VPH_2$  y  $RH_2$ . Para visualizar la dispersión de los datos se realizó una gráfica de boxplot a partir de los datos de  $VPH_2$  y  $RH_2$  de todas las operaciones (Figura 3.2 A y B). Se utilizó la dispersión de los datos como criterio para establecer qué operación fue la que presentó mayor inestabilidad en la producción de hidrógeno. Por lo tanto, se estableció que a mayor dispersión de los datos, mayor fue la inestabilidad de esa operación.



**Figura 3.2** – Gráficas de boxplot construidas a partir de los datos de la  $VPH_2$  (A) y del  $RH_2$  (B) de las tres operaciones.

De acuerdo con las gráficas de boxplot utilizando datos de  $VPH_2$  y  $RH_2$  es posible visualizar que la operación más inestable en cuanto a la producción de hidrógeno fue la de TRC 24 horas.

## 3.2 – Balance de electrones

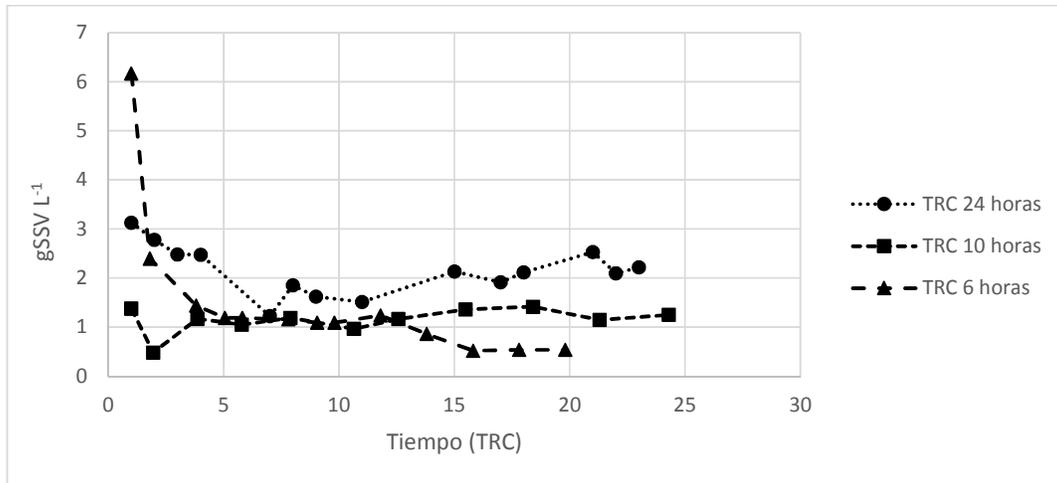
### 3.2.1 – Remoción de glucosa y formación de biomasa

Los valores de remoción de glucosa para todas las operaciones estuvieron entre 90 y 100%. El promedio de remoción de glucosa para la operación con TRC = 6 horas fue de  $90,4 \pm 0,9$  %, para

la operación con TRC = 10 horas fue de  $94,8 \pm 10,7\%$  y para la operación de 24 horas fue de  $99,6 \pm 1,3\%$ .

Todas las operaciones en continuo comenzaron con una concentración de sólidos mayor de  $1,0 \text{ gSSV L}^{-1}$  y fueron variando durante el período de tiempo que fue operado el reactor (Figura 3.3).

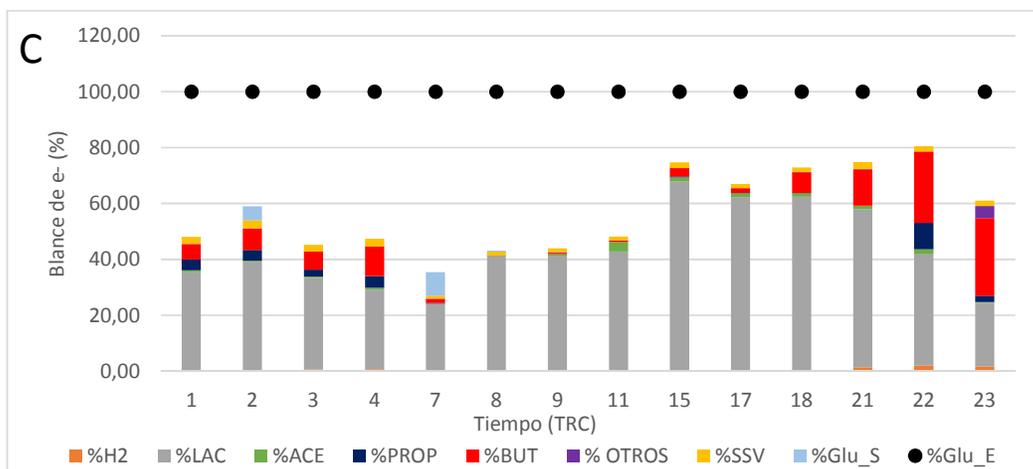
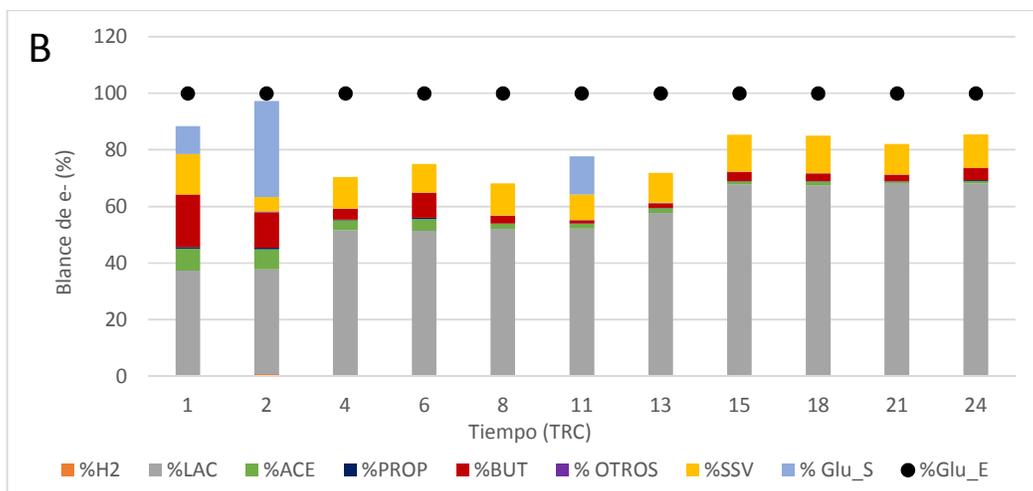
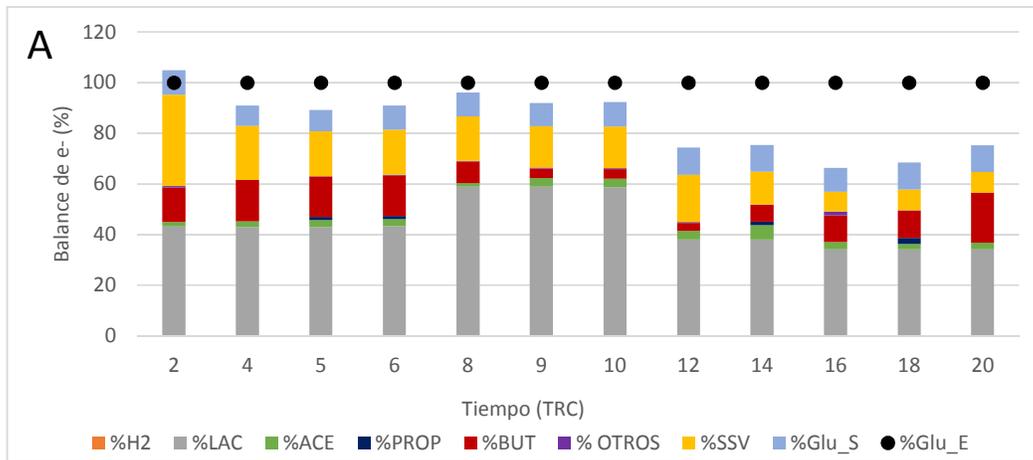
La operación con TRC = 24 horas fue la que presentó mayor concentración de sólidos.



**Figura 3.3** – Concentración de sólidos en el reactor en las diferentes operaciones durante la duración de las operaciones con diferente TRC.

### 3.2.2 – Metabolitos producidos.

En las tres operaciones se detectaron como productos de fermentación mayoritarios, ácido acético, butírico, propiónico y láctico. Además, también se detectaron de manera variable otros ácidos como isobutírico, valérico, isocaproico, heptanoico, aunque en menor proporción, aportando en total entre 1 y 2 % a la DQO de salida, por lo que en el balance de electrones serán representados juntos como OTROS (figura 3.4 A, B y C).



**Figura 3.4** – Balance de electrones de las operaciones con diferente TRC: A) operación con TRC=6 horas, B) operación con TRC=10 horas y C) operación con TRC=24 horas.

El balance de electrones de la operación con TRC = 6 h explica en promedio el 87 % del destino de los electrones ingresados (figura 3.4 A), mientras que en la operación con TRC = 10 h explica en promedio el 80 % (Figura 3.4 B) del destino de los electrones provenientes de la glucosa de la alimentación. El restante 13 % y 20 % (respectivamente) de los electrones podrían explicarse por errores experimentales de las técnicas empleadas.

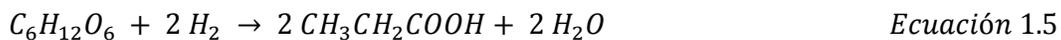
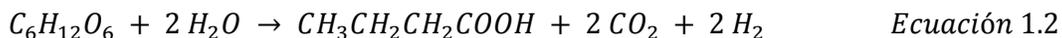
En las operaciones con TRC = 10 y 6 horas la mayoría de los electrones ingresados en el sistema fueron a formar ácido láctico. La fermentación dominante fue la fermentación láctica. Se detectó también producción de ácido butírico y ácido acético. El butirato, detectado durante toda la operación, fue el segundo ácido más producido. También fue detectado ácido propiónico, aunque en menor proporción en comparación con la proporción de los ácidos previamente mencionados.

Para a operación con TRC = 24 horas el balance de electrones realizado entre los ingresados al sistema por la alimentación y los detectados a la salida del mismo (producción de hidrógeno, biomasa y metabolitos) fue de 56,14 % en promedio. El 43,86 % restante, pueden ser atribuidos a la formación de productos que no se hayan determinado con las técnicas utilizadas como el etanol o butanol (figura 3.4 C).

En esta operación la mayoría de los electrones provenientes de la glucosa fueron a formar parte del ácido láctico, que fue el metabolito más abundante, del ácido butírico en segundo lugar y en tercer lugar del ácido propiónico.

### 3.3 – Rendimiento en H<sub>2</sub> estequiométrico vs Rendimiento en H<sub>2</sub> experimental

Como se explicó en las introducción, por cada dos moles de ácido acético formado a partir de la glucosa se pueden formar 4 moles de H<sub>2</sub> (Ecuación 1.1) y por cada mol de ácido butírico formado a partir de la glucosa se pueden formar 2 moles de H<sub>2</sub> (Ecuación 1.2), mientras que, por cada mol de propiónico producido se consume 1 mol de H<sub>2</sub> (Ecuación 1.5):



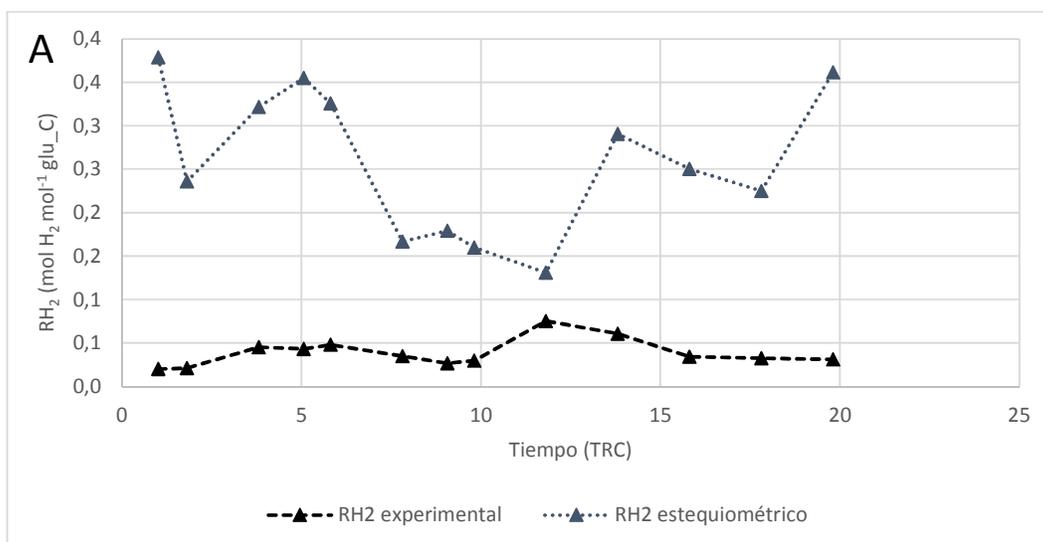
Teniendo en cuenta la estequiometría de dichas ecuaciones, podemos calcular los moles de  $H_2$  que se producirían en función de los ácidos producidos, como:

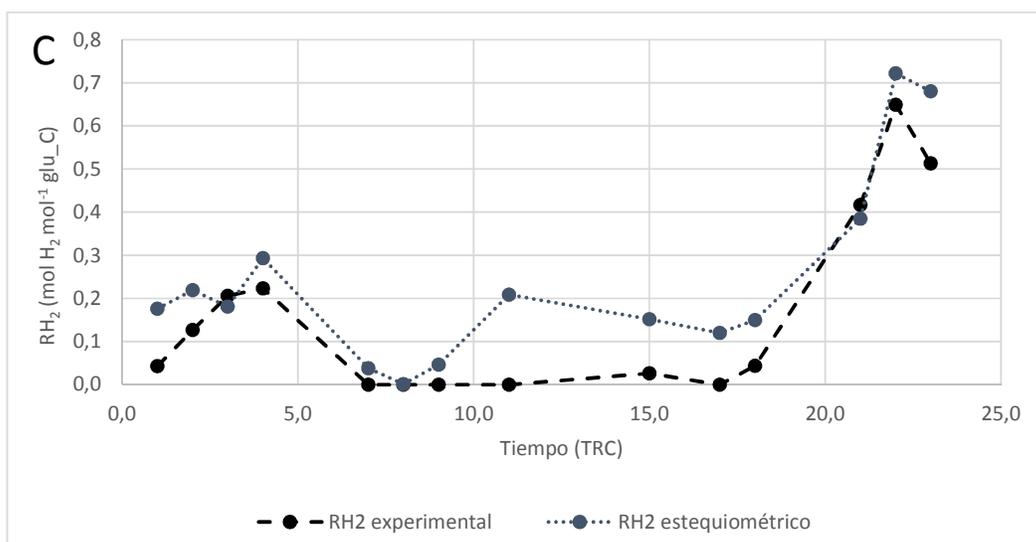
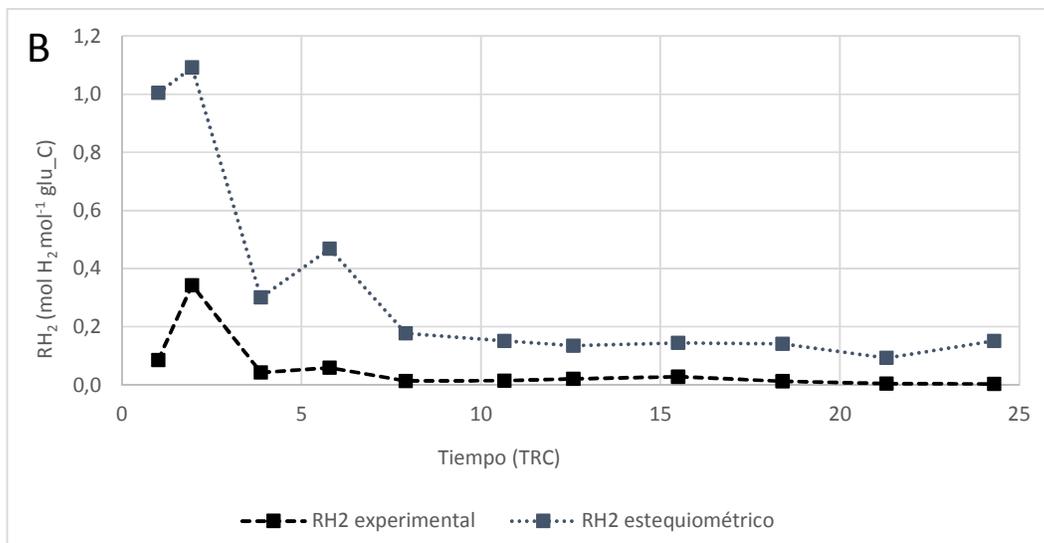
$$H_2 \text{ esteq.} = 2 \times \left( HAc \left( \frac{\text{mol}}{d} \right) + HBu \left( \frac{\text{mol}}{d} \right) \right) - HPr \left( \frac{\text{mol}}{d} \right) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Entonces el rendimiento en  $H_2$ , que llamaremos estequiométrico ( $RH_2$ ), se puede calcular como:

$$RH_2 \text{ esteq.} = \frac{H_2 \text{ esteq.} \left( \frac{\text{mol}}{d} \right)}{\text{Glucosa consumida} \left( \frac{\text{mol}}{d} \right)} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Para comparar estos rendimientos se graficó el rendimiento en hidrógeno experimental ( $RH_2$  exp.) vs. el rendimiento en hidrógeno calculado estequiométricamente ( $RH_2$  esteq.) (Figura 3.5 A, B y C).





**Figura 3.5** – Rendimiento en H<sub>2</sub> experimental vs rendimiento en H<sub>2</sub> estequiométrico, para las operaciones con TRC= 6 horas (A), TRC=10 horas (B) y TRC= 24 horas (C).

El rendimiento estequiométrico en las operaciones con TRC = 6 y 10 horas es mayor que el observado experimentalmente, esto no sucede en la operación con TRC = 24 horas, donde ambos rendimientos son similares, excepto en el período donde no hubo producción de hidrógeno.

Otra manera de visualizar este resultado es realizando el cociente entre los moles de hidrógeno detectados experimentalmente sobre la suma de los moles de acetato y butirato detectados

experimentalmente. Este cociente tendría que ser igual a dos si cuando se produjo acetato o butirato también se produjo H<sub>2</sub>:

$$\frac{H_2 \text{ experimental } \left(\frac{\text{mol}}{\text{d}}\right)}{\left(HAc \left(\frac{\text{mol}}{\text{d}}\right) + HBu \left(\frac{\text{mol}}{\text{d}}\right)\right)} = 2 \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Los valores calculados utilizando la ecuación 3.3 para las operaciones realizadas se muestran en la tabla 3.2.

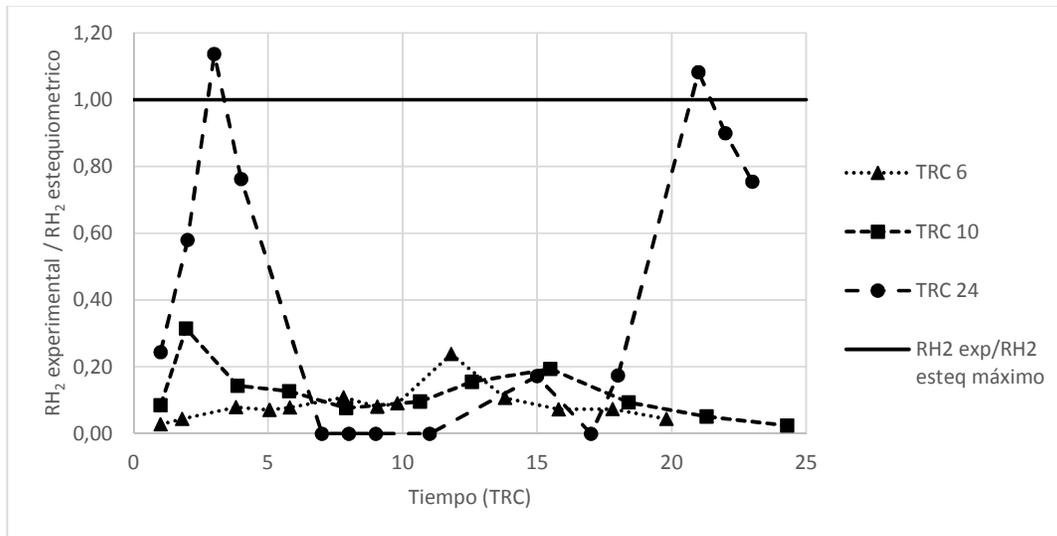
**Tabla 3.2** – Valores obtenidos para el cociente entre el H<sub>2</sub> producido experimentalmente (mol d<sup>-1</sup>) y la suma del ácido acético y butírico producidos experimentalmente (mol d<sup>-1</sup>).

$\frac{H_2 \text{ exp. } \left(\frac{\text{mol}}{\text{d}}\right)}{\left(HAc_{\text{exp}} \left(\frac{\text{mol}}{\text{d}}\right) + HBu_{\text{exp}} \left(\frac{\text{mol}}{\text{d}}\right)\right)}$		
HRT 6 horas	HRT 10 horas	HRT 24 horas
0,06	0,17	0,49
0,09	0,63	1,16
0,16	0,29	2,27
0,14	0,26	1,53
0,16	0,15	0,35
0,22	0,19	0,59
0,16	0,31	2,17
0,18	0,39	1,80
0,48	0,19	1,51
0,22	0,10	
0,15	0,05	
0,15		
0,09		

Como se observa en la tabla 3.2 para las operaciones con tiempos de retención 6 y 10 horas todos los cocientes calculados son menores que dos, sobretodo en la operación con TRC = 6 horas mientras para la operación de 24 horas los cocientes son cercanos o iguales a dos.

Para poder visualizar la magnitud de las diferencias entre el RH<sub>2</sub> estequiométrico y el RH<sub>2</sub> experimental para cada una de las operaciones y poder compararlas, se realizó el cociente entre

los dos rendimientos (Figura 3.6). El máximo valor para este cociente será uno si  $RH_2$  estequiometrico =  $RH_2$  experimental. Cuanto más alejado de 1 sea el cociente, mayor diferencia habrá entre los rendimientos.

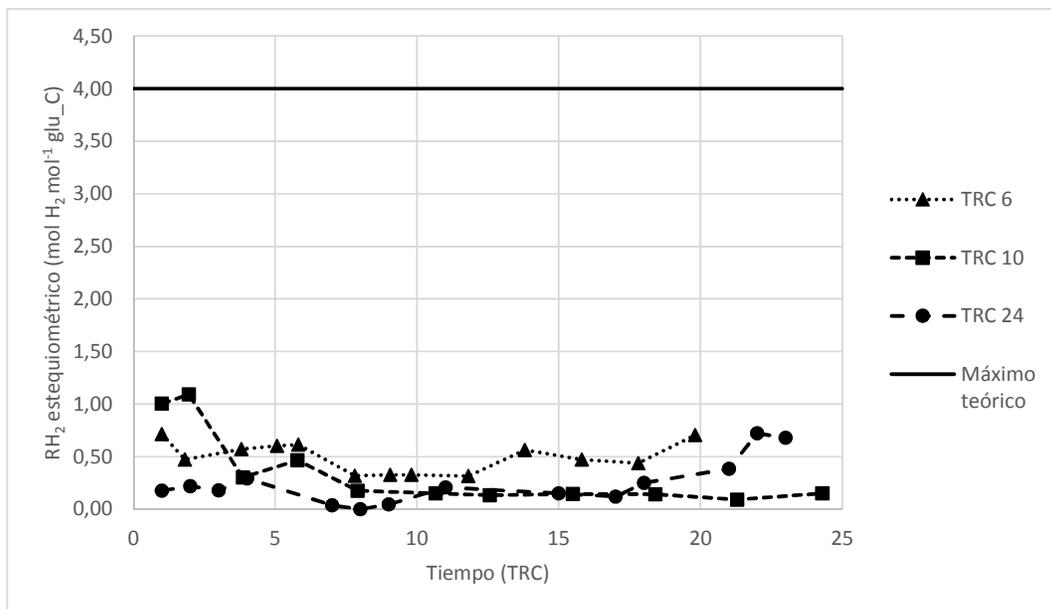


**Figura 3.6** – Relación entre el  $RH_2$  obtenido experimentalmente y el  $RH_2$  calculado estequiometricamente.

El máximo del cociente entre los rendimientos es uno, como se indica en el gráfico. En los puntos donde la relación es igual es cero, se debe a que durante ese período de operación no hubo producción de  $H_2$ .

Las operaciones con  $TRC = 10$  y  $6$  horas presentarían las mayores diferencias entre los rendimientos en  $H_2$  experimental y estequiométrico. En la operación  $TRC = 24$  horas durante dos TRCs la producción de  $H_2$  fue mayor que la esperada por estequiometria.

Aunque los rendimientos experimentales obtenidos fueron más bajos que los esperados en función a la concentración de ácidos orgánicos, estos rendimientos estequiométricos calculados tampoco llegaron al máximo teórico posible por fermentación acética (Ecuación 1.1) de 4 moles de  $H_2$  por mol de glucosa consumida (figura 3.7).



**Figura 3.7** – Comparación entre el RH<sub>2</sub> estequiométrico calculado para cada una de las operaciones con el rendimiento en H<sub>2</sub> máximo teórico que se puede obtener en el proceso de fermentación oscura.

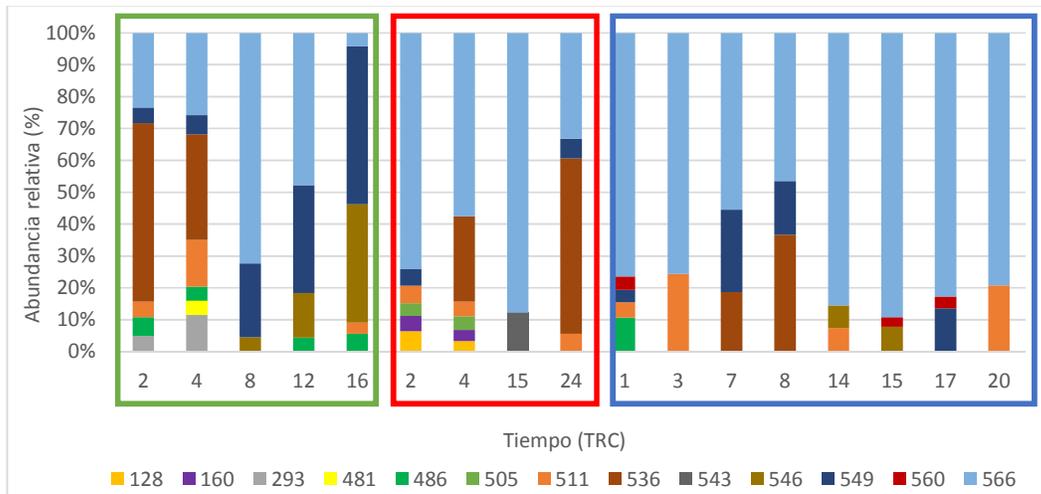
### 3.4 – Análisis de la comunidad microbiana

Para determinar el efecto del TRC sobre las comunidades microbianas seleccionadas en las diferentes operaciones, se analizaron las comunidades en muestras tomadas de las tres operaciones utilizando la técnica de T-RFLP del gen del ARNr de 16S. Para determinar la identidad de los organismos seleccionados se utilizó la técnica de secuenciación masiva de amplicones del gen del ARNr de 16S. Esta última técnica se aplicó en dos muestras de cada operación.

#### 3.4.1 – Análisis de la de la comunidad microbiana mediante T-RFLP del gen del ARNr de 16S

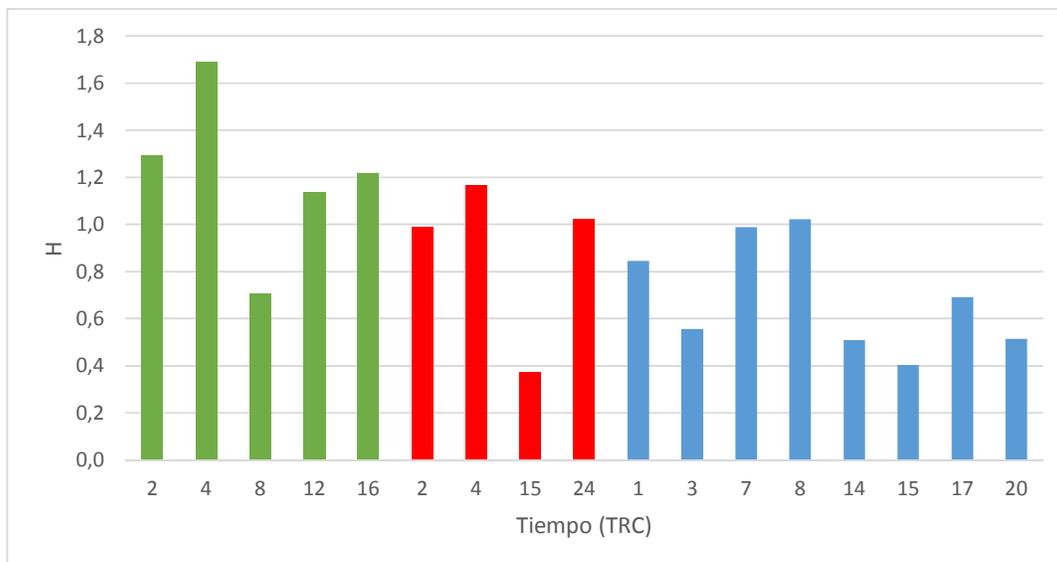
En la figura 3.8 se muestra la abundancia relativa de los picos obtenidos en el análisis de T-RFLP de las muestras analizadas de las distintas operaciones con diferente tiempo de retención celular. El máximo de T – RF detectados en una muestra fue de 7 T – RF y el mínimo fue de 2 T – RF. Se observa que en todas las operaciones aparecen mayoritariamente los mismos picos,

aunque la abundancia relativa es diferente. El pico 566 estuvo presente en todas las muestras de todas las operaciones y en la mayoría de ellas fue el pico con más abundancia relativa, sobre todo en la operación con TRC de 24 h.



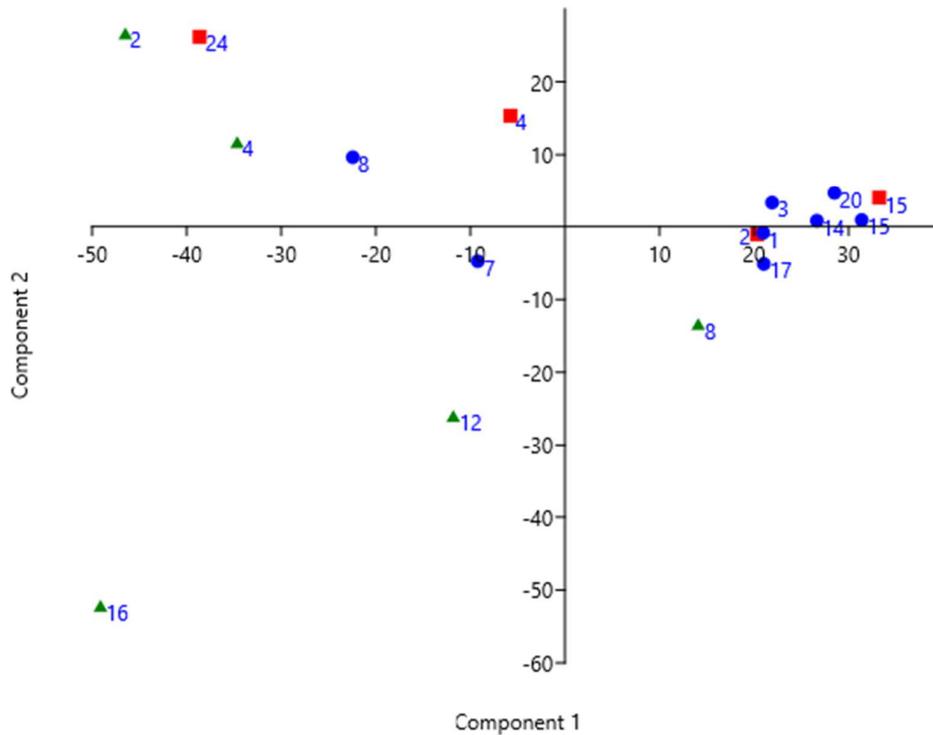
**Figura 3.8** – Abundancia relativa de los T – RF encontrados en las comunidades microbianas del reactor operado a distintos tiempos de retención de acuerdo con el análisis de T – RFLP del gen del ARN de 16S. En verde se recuadrada las muestras correspondientes a la operación con TRC = 6 horas, recuadradas en rojo se indican las muestras correspondientes a la operación con TRC = 10 horas y con el rectángulo azul se indican las muestras correspondientes a la operación con TRC = 24 horas. Los números en el eje de las x indican el tiempo medido en tiempos de retención celular para cada una de las operaciones, durante el cual se obtuvo la muestra.

A partir de los resultados obtenidos por el análisis de T-RFLP de las distintas operaciones se calculó el índice de diversidad de Shannon (H). Las muestras tomadas durante la operación a TRC = 24 horas fueron las que presentaron menores índices de diversidad de Shannon (figura 3.9), ya que cuanto menor es el índice, menor es la diversidad de la muestra.



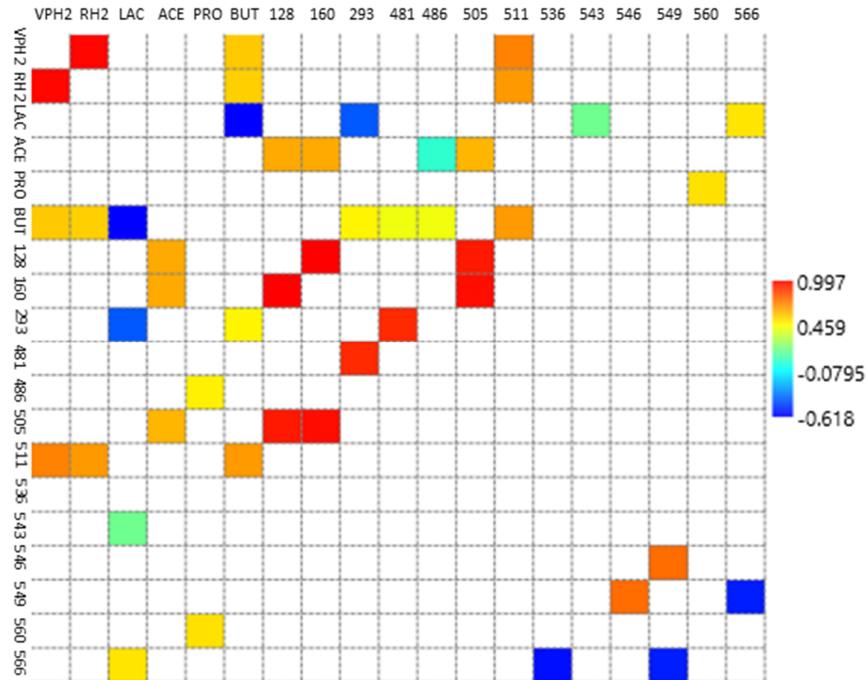
**Figura 3.9** – Índice de Shannon de las comunidades microbianas de las distintas operaciones con diferente TRC. Las barras en verde indican el valor del índice de Shannon para las muestras tomadas en la operación con TRC = 6, las barras en rojo representan los valores para la operación con TRC= 10 horas y las barras en azul para la operación con TRC= 24 horas. Los números en el eje de las x indican el TRC en el cuál la muestra fue obtenida. El índice se calculó a partir de los datos de las abundancias de los T – RF obtenidos en el análisis de T – RFLP utilizando en programa PAST 3 v 1.0.0.0.

Para analizar la similitud y agrupamiento de las muestras tomadas durante los distintos tiempos de retención celular sobre las comunidades microbianas seleccionadas durante las diferentes operaciones del reactor, se realizó un análisis de componentes principales realizado con los mismos resultados de T – RFLP (figura 3.10). Este análisis muestra también la separación de las muestras de acuerdo con la operación del reactor. La mayoría de las muestras tomadas durante la operación a TRC = 24 horas se agruparon en el plano, mientras que las muestras tomadas durante las operaciones a TRC = 10 y 6 horas están más dispersas. Hay cierta agrupación entre las muestras con TRC = 6 de los primeros tiempos de retención y cierta agrupación con los del final de la operación.



**Figura 3.10** – Análisis de componentes principales (ACP) a partir de los datos obtenidos por el estudio de T-RFLP de muestras de la comunidad microbiana de las operaciones realizadas con diferente tiempo de retención celular. El análisis de ACP se realizó con el programa PAST 3 versión 1.0.0.0 utilizando la matriz de varianza – covarianza. El componente 1 explica el 64,5 % de las diferencias entre las muestras mientras el componente 2 explica el 26,2 % de las diferencias entre ellas.

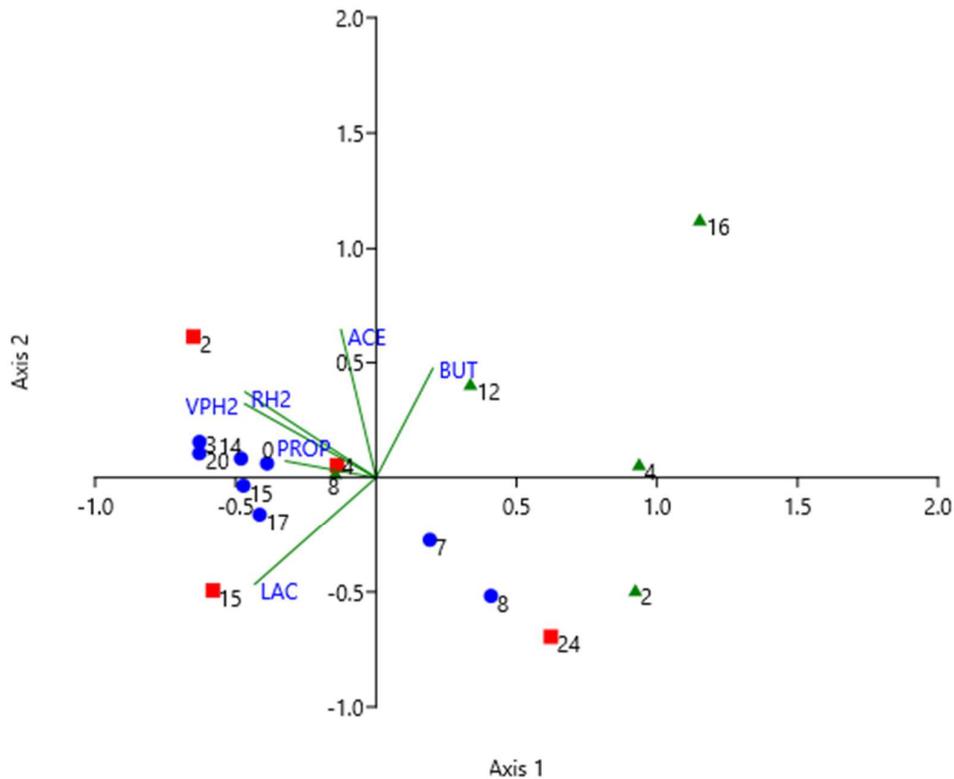
Se realizó un análisis de correlación de Pearson utilizando los datos obtenidos por T-RFLP de la comunidad microbiana y los datos obtenidos de la producción de ácidos orgánicos y de la producción de hidrógeno (Figura 3.11).



**Figura 3.11** – Matriz de correlaciones de Pearson ( $r$ ,  $p$ ). Se presentan solamente las correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ). Las correlaciones se realizaron con los datos obtenidos por el análisis de T – RFLP y las variables operacionales VPH<sub>2</sub>, RH<sub>2</sub> y producción de LAC, PRO, ACE, BUT (lactato, acético, propiónico y butirato, respectivamente). Las correlaciones de Pearson se realizaron utilizando el software estadístico PAST 3 versión 1.0.0.0. Virando al rojo se observan las correlaciones positivas ( $r > 0$ ), mientras virando al azul las correlaciones negativas ( $r < 0$ ).

En la matriz de correlaciones de Pearson se observan una correlación positiva entre la velocidad de producción de hidrógeno y el rendimiento en hidrógeno, estas dos variables también son correlacionadas positivamente con la producción de butirato, pero en menor magnitud que entre ellas. La producción de butirato se correlaciona negativamente con la producción de lactato.

Se realizó también un análisis de correspondencia canónica utilizando las siguientes variables ambientales: rendimiento en H<sub>2</sub>, concentración de ácido butírico, ácido acético y ácido láctico para cada una de dichas muestras (figura 3.12).



**Figura 3.12** – Análisis de correspondencia canónica realizado a partir de los datos de las muestras analizadas por T – RFLP, las producciones de los ácidos orgánicos (acetato, propionato, butirato y lactato), el rendimiento en H<sub>2</sub> (RH<sub>2</sub>) y la velocidad de producción de H<sub>2</sub> (VPH<sub>2</sub>) obtenidos para cada una de las operaciones con diferente TRC. El análisis fue realizado con el software PAST 3 versión 1.0.0.0. El eje 1 explica el 50,25 % de las diferencias, mientras el eje 2 explica el 21,71%. Los triángulos verdes representan a las muestras de la operación con TRC = 6 horas, los cuadrados rojos a las muestras de la operación con TRC= 10 horas y los puntos azules a las muestras de la operación con TRC=24 horas.

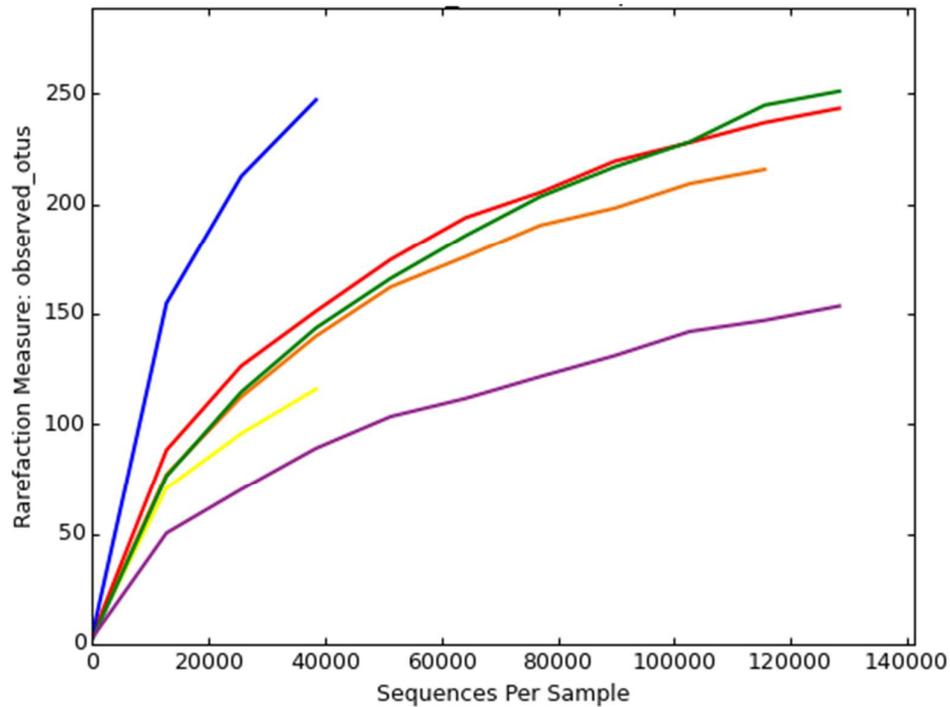
En este análisis se observa que la mitad de las muestras de la operación con TRC = 24 horas se agrupan en el plano y se separan por el RH<sub>2</sub> y la VPH<sub>2</sub> obtenido. Las muestras con TRC = 6 (que se recolectaron durante los TRC = 4, 12 y 16 de dicha operación) parecerían separarse del resto por su producción de ácido butírico. Las muestras en las que el RH<sub>2</sub> y la VPH<sub>2</sub> tienen la mayor influencia para su agrupamiento, se diferencian de aquellas en las que la mayor influencia la tiene el ácido láctico o el ácido butírico.

### 3.4.2 – Análisis de los microorganismos presentes en la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva de genes del ARNr de 16S

Para determinar la identidad de los microorganismos seleccionados durante las operaciones se analizaron dos muestras de cada una de ellas mediante la técnica de secuenciación masiva. Una de las muestras elegidas para el análisis fue recolectada durante un período de buena producción de hidrógeno, mientras la otra se recolectó durante un período de baja o nula producción de hidrógeno.

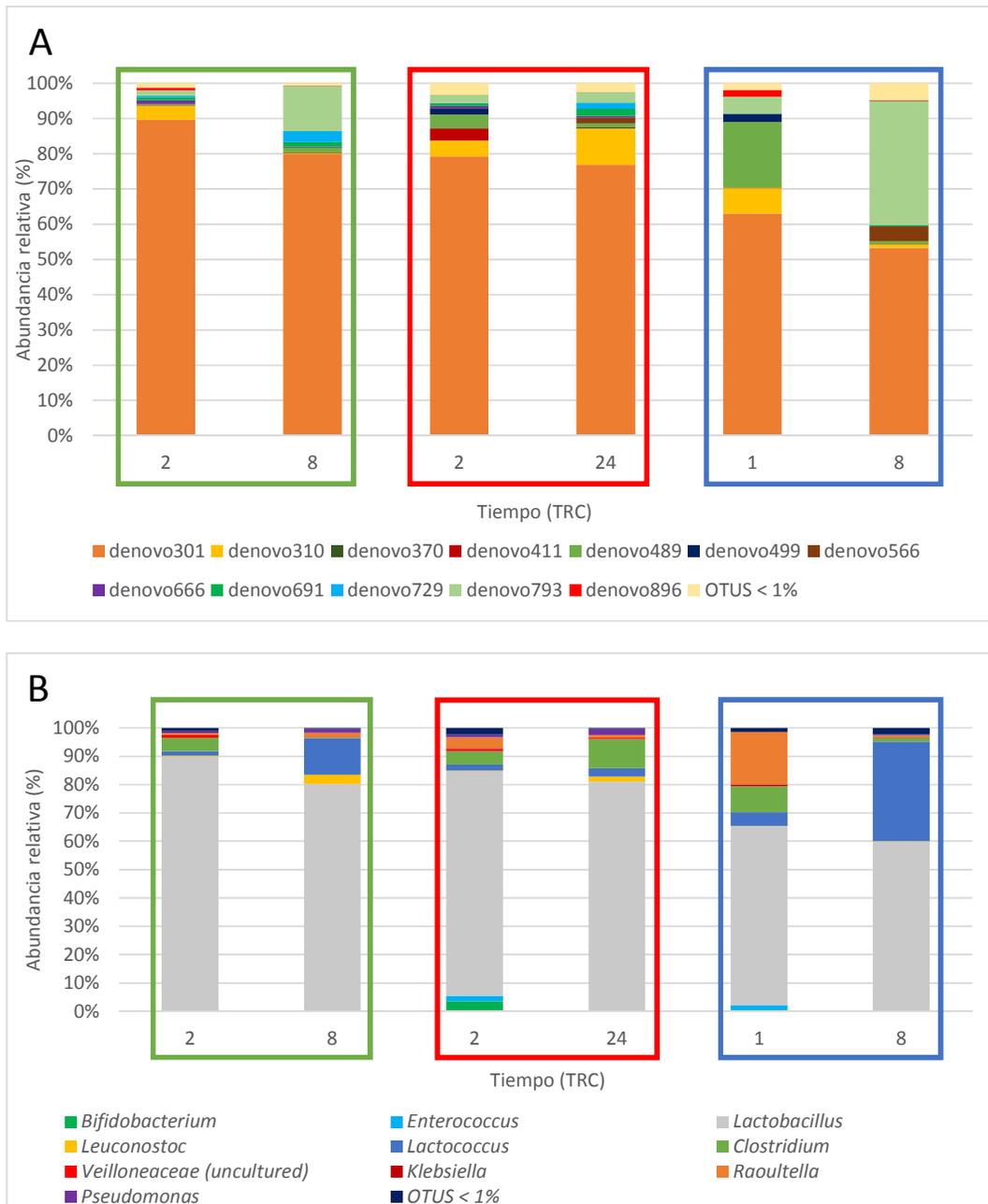
En este análisis se obtuvo un total de 756395 reads de buena calidad ( $Q > 25$ ) entre todas las muestras, con un mínimo de 42841 y 211169 reads por muestra. Los reads se agruparon en un total de 529 OTUs. Estas secuencias se clasificaron en 243 géneros del dominio *Bacteria* o del dominio *Archaea*.

En la figura 3.13 se observan las curvas de rarefacción obtenidas para cada muestra, se observó la mayor cantidad de OTUs en la muestra con TRC=10 en el tiempo de residencia 2 (curva azul), por otro lado la muestra con menos OTUs también pertenece al final de la operación con TRC=10 (tiempo de residencia 24). Las muestras de las operaciones con TRC = 6 y 24 también presentan un mayor número de OTUs cuando se corresponden con el principio de la operación (curvas roja y verde, respectivamente) que cuando se corresponden con períodos avanzados de operación (curvas amarillo y naranja, respectivamente).



**Figura 3.13** – Curvas de rarefacción de acuerdo a las OTUs encontradas en las muestras analizadas por secuenciación masiva. En rojo y en amarillo se representan las muestras de la operación con TRC=6 horas (tiempos de residencia 2 y 8 respectivamente). Las curvas azul y violeta corresponden a las muestras de la operación con TRC=10 horas (tiempos de residencia 2 y 24 respectivamente). Las muestras de la operación con TRC=24 horas se representan con las curvas color verde (tiempo de residencia 1) y naranja (tiempo de residencia 8).

De las OTUs obtenidas por muestras solamente 12 de ellas tuvieron una abundancia relativa mayor o igual a 1% en las comunidades de las muestras analizadas (figura 3.14 A). Las OTUs con abundancia relativa menor al 1% se agruparon en OTUs < 1%, ya que solamente nos enfocaremos en analizar las poblaciones dominantes de microorganismos en las comunidades de las muestras analizadas. Las OTUs encontradas mayores o iguales al 1% se clasificaron dentro de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterobacteria*, *Leuconostoc*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Pseudomonas* y un microorganismo no cultivado de la familia *Veilloneaceae* (figura 3.14 B).



**Figura 3.14** – Abundancia relativa de las OTUs detectadas en las muestras analizadas de las operaciones realizadas con diferente TRC (A) y de los géneros asignados a ellas (B). Recuadradas en verde se indican las muestras de la operación con TRC = 6 horas, en rojo las muestras de la operación con TRC = 10 horas y en azul las muestras de la operación con TRC = 24 horas. En el eje de las x se indica el número de TRC durante el cual se sacó la muestra.

Los resultados muestran que el género dominante en la comunidad microbiana de todas las operaciones fue *Lactobacillus*, con una abundancia de entre el 60 y 90 %. Las muestras con más abundancia de *Lactobacillus* fueron las muestras tomadas durante de la operación con TRC = 6 horas con el 90 % (TRC=2) y el 80% (TRC=8). En la operación con TRC = 10 horas el género *Lactobacillus* estuvo en una abundancia del 79 y el 81 % en la comunidad microbiana. Las muestras tomadas para el TRC=24 horas fueron las que tuvieron menos abundancia del género *Lactobacillus* (63% a TRC = 1, y 60% a TRC = 8) (tabla 3.3).

**Tabla 3.3** – Se observa el porcentaje de la abundancia relativa (%) de los géneros encontrados en las muestras analizadas para cada una de las operaciones realizadas con diferente TRC y sus principales productos de fermentación de acuerdo con la bibliografía.

	TRC = 6 horas		TRC = 10 horas		TRC = 24 horas		Productos de Fermentación
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
	M1 <sup>a</sup>	M2 <sup>a</sup>	M1 <sup>b</sup>	M2 <sup>b</sup>	M1 <sup>c</sup>	M2 <sup>c</sup>	
<i>Bifidobacterium</i>	0	0	4	0	0	0	LAC, ACE
<i>Enterococcus</i>	0	0	2	0	2	0	LAC
<i>Lactobacillus</i>	90	80	79	81	63	60	LAC
<i>Leuconostoc</i>	0	3	0	2	0	0	LAC, EtOH
<i>Lactococcus</i>	2	13	2	3	5	35	LAC
<i>Clostridium</i>	5	0	5	10	9	1	H <sub>2</sub> , ACE, BUT, solventes
<i>Veillonaceae</i>	1	0	1	0	0	0	H <sub>2</sub> , ACE, EtOH, PROP
<i>Klebsiella</i>	0	0	0	0	1	0	H <sub>2</sub> , ACE, SUC, EtOH, FOR, LAC, butanodiol
<i>Raoultella</i>	0	2	4	1	19	1	H <sub>2</sub> , ACE, SUC, EtOH, FOR, LAC, butanodiol
<i>Pseudomonas</i>	1	1	1	2	0	0	no fermentadora
OTUS < 1%	1	0	2	0	1	2	

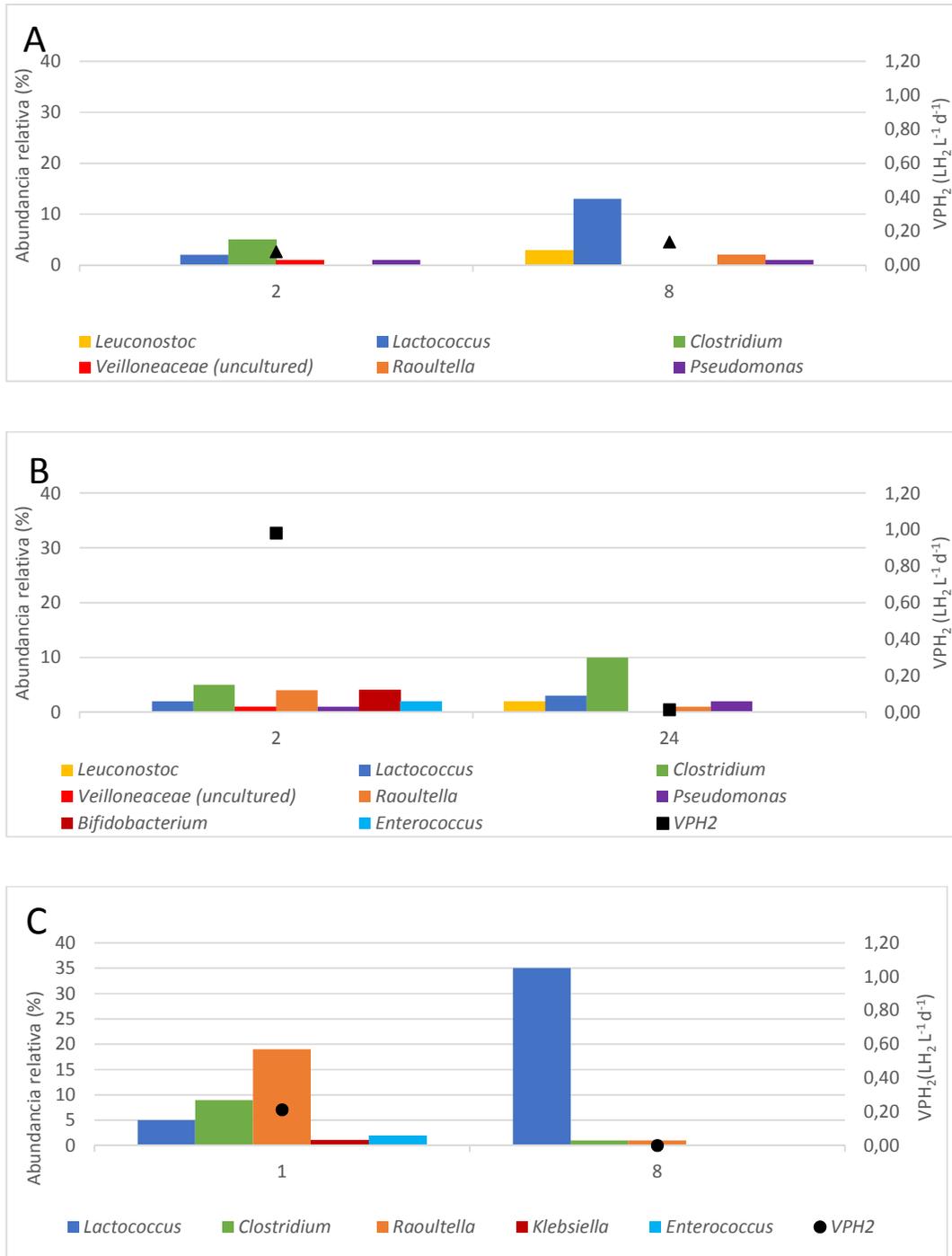
Las muestras analizadas fueron tomadas durante los tiempos de residencia celular: M1<sup>a</sup>=2, M1<sup>b</sup>=8 (Op. TRC=6 h), M1<sup>b</sup>=2, M2<sup>b</sup>=24 (Op. TRC=10 h) y M1<sup>c</sup>=2, M2<sup>c</sup>=8 (Op. TRC=24 h).

En la figura 3.15 A, B y C se observa la relación entre la VPH<sub>2</sub> y los géneros bacterianos encontrados en las muestras tomadas en las operaciones con los distintos tiempos de retención. No se tomó en cuenta para la comparación el género *Lactobacillus*, para visualizar mejor las abundancias relativas de las demás poblaciones minoritarias. Se observa que *Lactococcus* aumentó en las muestras de las operaciones con TRC = 6 y 24 horas, de 2 a 13 % y de 5 a 35 %

respectivamente, en la operación con TRC= 10 también aumentó pero en menor proporción (de 2 a 3 %). *Bifidobacterium* solamente se encontró en la operación con TRC = 10 horas al principio de la operación (figura 3.15 B, tabla 3.3). Microorganismos del género *Leuconostoc*, aumentaron su abundancia en la comunidad de las operaciones con TRC = 6 y 10 horas.

Los microorganismos del género *Clostridium* en las operaciones con TRC = 6 y 24 horas se encontraban en proporciones de 5 y 9 %, respectivamente al comienzo de las operaciones. En la muestra tomada en el tiempo de retención 8, las proporciones de *Clostridium* disminuyeron a menos de 1 % en la operación con TRC = 6 horas y a 1 % en la operación con TRC = 24 horas. Mientras que para la operación con TRC=10 horas aumentó de 5 %, al inicio de la operación, a 10 % al final de la misma, por más que la  $VPH_2$  durante ese período era de  $0,01 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (figura 3.15 B). Los microorganismos del género *Raoultella* se encontraron en una proporción del 19 % al comienzo de la operación con TRC = 24 horas cuando la  $VPH_2=0,21 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , mientras que para la muestra tomada en el tiempo de retención 8 su proporción disminuyó estrepitosamente a 1%, cuando la  $VPH_2$  era 0. En la operación con TRC = 10 horas este género de microorganismos se encontró en un 4% al comienzo de la operación, luego su proporción disminuyó a 1%, en cambio en la operación con TRC = 6 horas se observa un aumento de la proporción de estos microorganismos a 2% para la muestra del tiempo de retención 8 en esta operación (Figura 3.15 A, B y C; tabla 3.3).

Los microorganismos posiblemente productores de hidrógeno como *Enterococcus* y *Klebsiella* se encontraron en proporciones del 2% y 1% respectivamente al comienzo de las operaciones de con TRC=10 y 24 horas. *Klebsiella* solo se encontró en la operación con TRC=24 horas (tabla 3.3).



**Figura 3.15** – Abundancia relativa de las OTUs encontradas en las muestras de las operaciones con TRC = 6 horas (A), TRC = 10 horas (B), TRC = 24 horas (C) analizadas por secuenciación masiva y el valor de VPH<sub>2</sub> correspondiente al tiempo de retención durante el cual se sacó la muestra. No se tuvieron en cuenta las abundancias de *Lactobacillus* ni de las OTUs con representación menor al 1%.

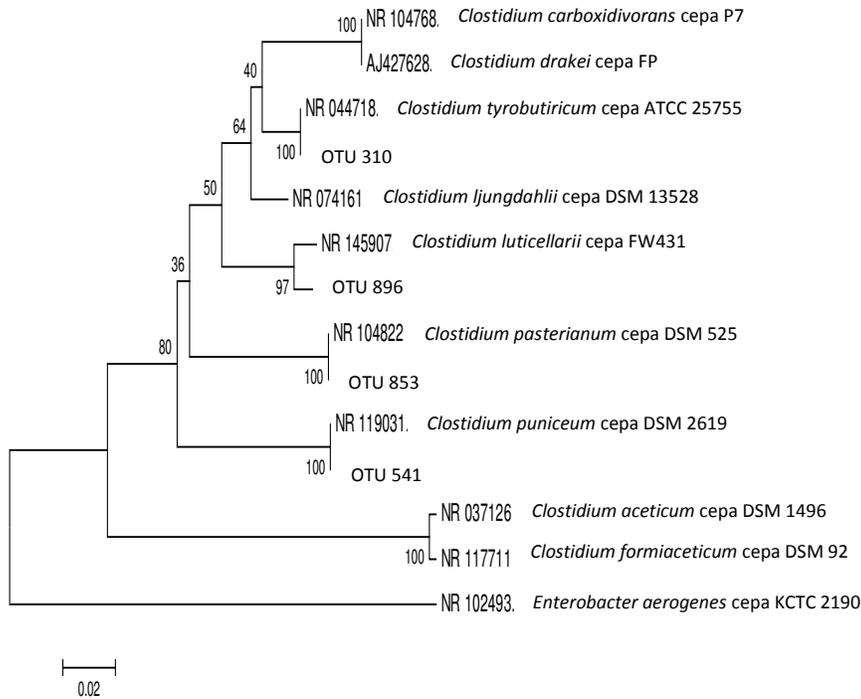
En la tabla 3.4 se observa a qué especie bacteriana estarían emparentados las OTUs iguales o mayores al 1% en la comunidad.

**Tabla 3.4** – Resultados de la comparación de la secuencia de las OTUs con representación mayor o igual al 1 % con secuencias de las bases de datos. Se indica la muestra en la que se encontró la OTU, el porcentaje de la misma en la comunidad, el porcentaje de similitud con la secuencia más relacionada, el e-value y el N° de de la secuencia en el NCBI (N° ID). La búsqueda se realizó utilizando la base de datos de ARN ribosomal de 16S para *Archaea* y *Bacteria* del NCBI y el algoritmo BLAST.

OTU	Muestra	Ab. Rel. (%)	Especie más relacionada	% Similitud	e-Value	N° ID	
denovo 301	6H_TRC=2	80	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa NBRC 15883	100	2e-106	NR_113337.1	
	6H_TRC=8	90					
	10H_TRC=2	79					
	10H_TRC=24	77					
	24H_TRC=1	63					
	24H_TRC=8	53					
denovo 310	6H_TRC=2	4	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> cepa ATCC 25755	100	2e-106	NR_044718.2	
	10H_TRC=2	5					
	10H_TRC=24	10					
	24H_TRC=1	7					
	24H_TRC=8	1					
denovo 370	10H_TRC=24	1	<i>Lactobacillus nagelli</i> JCM 12492	100	2e-106	NR_112754.1	
denovo 411	10H_TRC=2	3	<i>Bifidobacterium crudilactis</i> cepa FR621613	93	2e-81	NR_115334.1	
denovo 489	6H_TRC=8	2	<i>Raoultella electrica</i> cepa 1GB	100	2e-106	NR_125461.1	
	10H_TRC=2	4					
	10H_TRC=24	1					
	24H_TRC=1	19					
		24H_TRC=8					1
denovo 499	10H_TRC=2	2	<i>Enterococcus gallinarum</i> cepa LMG 13129	100	2e-106	NR_104559.2	
	24H_TRC=1	2					
denovo 566	10H_TRC=24	2	<i>Lactobaillus herbarum</i> cepa TF032-E4	99	4e-103	NR_145899	
	24H_TRC=8	4					
denovo 666	6H_TRC=2	1	<i>Pelosinus propinicus</i> cepa DSM13327	90	2e-72	NR_109388.1	
		10H_TRC=2					1
denovo 691	6H_TRC=2	1	<i>Pseudomonas lini</i> cepa DLE411J	100	2e-106	NR_02902422.2	
		6H_TRC=8					1
		10H_TRC=2					1
	10H_TRC=24	2					

OTU	Muestra	Ab. Rel. (%)	Especie más relacionada	% Similitud	e-Value	Nº ID																										
<b>denovo 729</b>	6H_TRC=8	3	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> cepa LMG 11482	99	9e-105	NR_109041.1																										
	10H_TRC=24	2					<b>denovo 793</b>	6H_TRC=2	2	<i>Lactococcus taiwanensis</i> cepa 0905C15	100	2e-106	NR_114327.1	6H_TRC=8	13	10H_TRC=2	2	10H_TRC=24	3	24H_TRC=1	5	<b>denovo 896</b>	24H_TRC=8	35	<i>Clostridium luticellari</i> cepa FW 431	98	9e-100	NR_119031.1	6H_TRC=2	1		24H_TRC=1
<b>denovo 793</b>	6H_TRC=2	2	<i>Lactococcus taiwanensis</i> cepa 0905C15	100	2e-106	NR_114327.1																										
	6H_TRC=8	13																														
	10H_TRC=2	2																														
	10H_TRC=24	3																														
	24H_TRC=1	5																														
<b>denovo 896</b>	24H_TRC=8	35	<i>Clostridium luticellari</i> cepa FW 431	98	9e-100	NR_119031.1																										
	6H_TRC=2	1																														
	24H_TRC=1	2																														

La secuencia de la OTU más abundante presentó alta similitud con la secuencia de *Lactobacillus paracasei*, se detectó otras OTUs cuyas secuencias fueron relacionadas con secuencias de organismos del género *Lactobacillus* pero en menor abundancia. Dos OTUs con abundancia de 1% o más en la comunidad presentaron secuencias que se relacionaron con secuencias de microorganismos del género *Clostridium*. Sin embargo, cuando las secuencias se analizaron mediante QIIME, se encontraron 4 OTUs, con representación mayor al 1 %, clasificadas dentro de este género. Con las secuencias representativas de estas OTUs se realizó un árbol filogenético, para visualizar su relación filogenética con las secuencias de las especies más relacionadas a ellos y secuencias de microorganismos reportados como homoacetogénicos (figura 3.17).



**Figura 3.17** – Árbol filogenético relacionando la secuencia de las OTUs asignadas al género *Clostridium* y secuencias de cepas de microorganismos del mismo género obtenidos en la base de datos de Gen Bank NCBI. Se incluyó secuencias de microorganismos reportados como homoacetogénicos. El árbol filogenético se realizó utilizando el software MEGA versión 6.0, el algoritmo neighbor joining, método Jukes Cantor. Los números en los nodos representan el valor de bootstrap obtenido de 1000 replicaciones. Para realizar el alineamiento entre secuencias se utilizó el software Clustal W del paquete Mega 6.0. Como grupo externo se utilizó a *Enterobacter aerogenes* cepa KCTC 2190.

Todas las secuencias de microorganismos del género *Clostridium* se separaron del grupo externo. Las secuencias de las OTUs se agruparon con los microorganismos más emparentados a ellas según el análisis de BLAST. No se observa que exista una relación cercana entre las secuencias de los microorganismos homoacetogénicos analizados y las secuencias de las OTUs encontradas.

## CAPÍTULO IV - DISCUSIÓN

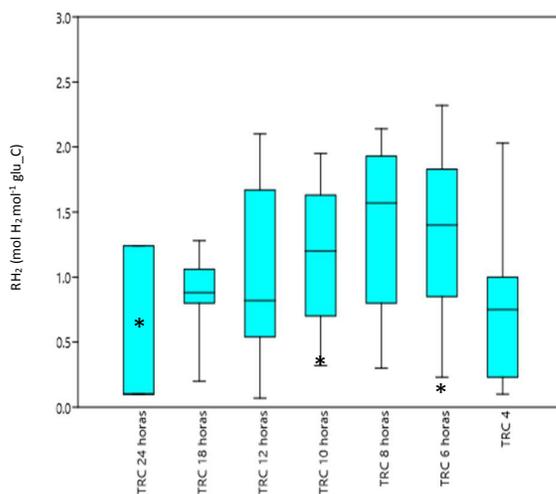
## 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta experiencia demostraron que el TRC es un parámetro influyente en la producción de  $H_2$ , de ácidos orgánicos y en las comunidades microbianas que se desarrollaron en cada una de las operaciones. La estabilidad en la producción de  $H_2$  de cada operación también fue afectada por el TRC utilizado.

### 4.1 –Efecto del TRC sobre la producción de $H_2$

En este trabajo se observó que la mejor producción de hidrógeno fue obtenida durante la operación realizada con un TRC de 24 h. Esta operación fue también la operación que tuvo menor estabilidad en la  $VPH_2$  y en el  $RH_2$ .

De los resultados reportados en bibliografía se observa que a menor tiempo de residencia celular, mayor es el rendimiento en  $H_2$ , hasta cierto punto (TRC=4) donde el rendimiento comienza a disminuir. Sin embargo, los resultados reportados en la bibliografía muestran una gran dispersión, lo que indica que esta tendencia no siempre sería así (figura 4.1).



**Figura 4.1** – Boxplot comparando los rendimientos en  $H_2$  reportados en bibliografía. La gráfica de boxplot se realizó con el software PAST 3.0 versión 1.0.0.0. La gráfica se construyó basándose en los datos de la tabla 1.2. Los asteriscos señalan el máximo rendimiento para cada una de las operaciones en los respectivos TRC usados (6, 10 y 24 horas).

En el trabajo de Palomo – Briones et al., 2017 sobre el estudio del efecto del TRC en la producción de  $H_2$  se observó la misma tendencia que la reportada en bibliografía. Ellos concluyen que utilizando menores TRC se seleccionan principalmente microorganismos productores de  $H_2$ , mientras que al operar con mayores TRC se seleccionan microorganismos competidores. En nuestro trabajo se detectó una incidencia importante de la homoacetogénesis a TRC cortos (6 y 10 horas), lo que podría ser una causa de la baja producción de  $H_2$  observada en estas operaciones. Nuestro resultado está de acuerdo con lo reportado por Arooj et al., 2008a, que reportaron que el acetato producido por homoacetogénesis aumentaba a medida que el TRC disminuía.

Tanto la  $VPH_2$  como el  $RH_2$  obtenidos en todas las operaciones fueron menores a los reportados en bibliografía para este tipo de reactor y este tipo de sustrato, como se observa en la tabla 1.2. Al utilizar cultivos mixtos como inóculos puede haber entre la comunidad microbiana del inóculo microorganismos competidores por sustrato que consuman glucosa dando productos de fermentación que no produzcan  $H_2$  o también microorganismos consumidores de  $H_2$  (Carrillo – Reyes et al., 2014).

En nuestro trabajo detectamos dos grupos bacterianos que podrían haber influido en el bajo rendimiento en  $H_2$  obtenido. Por un lado, las bacterias lácticas se encontraron en gran abundancia en la comunidad bacteriana de todas las operaciones realizadas y por otro lado la comparación entre los rendimientos estequiométricos en  $H_2$  calculados y los rendimientos experimentales en  $H_2$  obtenidos sugieren que hubo consumo de  $H_2$  por homoacetogénesis.

Las bacterias lácticas no son bacterias formadoras de esporas, por lo que se habría esperado que fueran eliminadas luego del tratamiento térmico aplicado al inóculo. Sin embargo, se ha reportado la persistencia de bacterias lácticas en reactores de producción de  $H_2$  inoculados con biomasa previamente tratada térmicamente (Gavala et al., 2006; Luo et al., 2011; Nualsri et al.,

2016; Rafrafi et al., 2013), lo que sugiere la capacidad de estas bacterias de sobrevivir a este tipo de tratamiento o su desarrollo a partir de la alimentación.

Sin embargo, el tratamiento térmico fue efectivo para eliminar la metanogénesis, ya que no se detectó metano en ninguna de las operaciones. En la operación con TRC = 24 horas el tratamiento térmico aplicado al inóculo, eliminó o disminuyó los microorganismos metanogénicos que podrían haber estado presentes en el inóculo. Aunque se aplicó también tratamiento térmico a los inóculos de las operaciones con TRC = 10 y 6 horas, no se esperaba detectar producción de metano en ellas. El tiempo de residencia celular aplicado en estas operaciones evitaría el crecimiento de estos microorganismos, ya que las arqueas metanogénicas tienen una tasa de crecimiento específica baja, que puede ir desde 0,08 – 0,29  $d^{-1}$  (*Methanosaeta soehngeni*) hasta 0,14  $h^{-1}$  (*Methanomicrobium paynteri*) (Demirel & Sherer, 2008), mientras las bacterias hidrogenogénicas tienen tasas de crecimiento específicas más altas, por ejemplo *Clostridium butyricum*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* tiene tasas de crecimiento específicas de 0,21  $h^{-1}$ , 0,29  $h^{-1}$ , 0,22  $h^{-1}$  y 0,30  $h^{-1}$ , respectivamente (Liu et al., 2006; Camper et al., 1991). Houriochi et al., 2002, postuló que la tasa de crecimiento de un cultivo mixto es de 0,33  $h^{-1}$ . Las operaciones fueron realizadas a pH ácido (5,5), que tampoco favorecería el crecimiento de los microorganismos metanogénicos (Wang et al., 2007; Luo et al., 2011). Sin embargo, se ha reportado la detección de metanogénesis a pH ácidos (Castelló et al., 2009; Carrillo – Reyes et al., 2014), por lo que se sugiere que el control de pH no asegura la eliminación de las arqueas metanogénicas

## 4.2 – Influencia del TRC en las vías metabólicas

### 4.2.1 – Productos de fermentación

En todas las operaciones el ácido láctico fue el metabolito producido en mayor proporción, indicando que la fermentación láctica fue la predominante en la comunidad. Este resultado se confirmó con el análisis de secuenciación masiva, ya que la población de microorganismos

dominante en las comunidades de todas las muestras analizadas fue del género *Lactobacillus*. Como se mencionó en la sección 1.4 esta vía metabólica reduce el rendimiento en H<sub>2</sub> ya que compite por equivalentes reductores (Guo et al., 2010).

La concentración de ácido láctico fue aumentando a medida que aumentó el TRC, llegando a ser, en promedio, el 75 % de la DQO de salida para la operación con TRC = 24 horas, 69 % para la operación con TRC = 10 horas y 49 % para la operación con TRC = 6 horas. Este resultado es concordante con los resultados reportados en bibliografía, sobre que, a mayor tiempo de retención celular, se beneficiaría la vía de la fermentación láctica (Zhang et al., 2013; Palomo – Briones et al., 2017).

En nuestras operaciones la formación de lactato se relacionó negativamente con la formación de butirato para todos los TRC es decir que cuando aumentó la concentración de butirato disminuyó la concentración de lactato. Estos resultados están de acuerdo con lo reportados por Nualsri et al., 2016 que observaron que, al disminuir el tiempo de retención celular de 12 horas a 2 horas, disminuía la concentración de lactato y aumentaba la concentración de butirato y la producción de H<sub>2</sub>. Al no detectar microorganismos lácticos por PCR – DGGE a tiempos de retención celular menores de 12 horas, estos autores postularon que las LAB no podían competir con los *Clostridium* productores de H<sub>2</sub> cuando se disminuía el TRC. En el trabajo de Palomo – Briones et al., 2017, los autores observaron el mismo fenómeno utilizando tiempos de retención celular de 24, 18, 12 y 6 horas. A medida que los tiempos de retención eran más cortos se detectaba menor cantidad de ácido láctico, llegando a no ser detectado a TRC = 6 horas. Además, en su trabajo la abundancia de las bacterias lácticas disminuyó a medida que disminuyó el tiempo de retención celular aplicado en la operación. Sin embargo, en nuestro trabajo las bacterias lácticas fueron dominantes en las comunidades bacterianas durante todos los tiempos de retención celular utilizados. Comparando los resultados de las muestras analizadas por secuenciación masiva de las operaciones con TRC = 24 y 6 horas, las muestras de la operación

con TRC = 6 horas tuvieron una mayor proporción de bacterias lácticas (90% - 80%), que las muestras tomadas durante la operación con TRC = 24 horas (63% - 60%). Si bien este resultado se contradice con lo reportado por Palomo – Briones et al., 2017, hay otros trabajos que también reportan prevalencia de LAB a bajos TRC. En el trabajo de Rafrafi et al., 2013 se observaron poblaciones dominantes de LAB a tiempos de retención de 6 horas. De la misma forma, Pattra et al., 2011 reportaron que la especie *Lactobacillus harbinensis* también fue dominante a todos los tiempos de retención aplicados (36, 24, 12, 6 y 4 horas) en la operación de un reactor CSTR hidrogenogénico. Se han reportado tasas de crecimiento específicas para *Lactobacillus sp.* de entre 0,27 h<sup>-1</sup> y 0,63 h<sup>-1</sup> por lo que podrían crecer a tiempos de retención menores de 2 horas (Megee et al., 1972; Olmos – Dichara et al., 1997).

#### 4.2.2 – Balance de electrones

El balance de electrones realizado en las operaciones con TRC = 10 y 6 horas explica entre el 80 y 90 % del destino de los electrones, la variación restante puede atribuirse a los errores de las técnicas experimentales. Resultados similares fueron obtenidos por Rafrafi et al., 2013, quienes también atribuyen estas diferencias a errores experimentales. Sin embargo, cuando se realizó el balance de electrones para la operación con TRC = 24 horas, un 46% de los electrones provenientes de la glucosa no se pueden adjudicar a ninguno de los metabolitos detectados. Es probable que ese porcentaje restante de electrones se deba a la producción de compuestos no cualificados con la metodología empleada en este trabajo, como por ejemplo etanol, butanol o acetona. Se ha reportado la producción de solventes, como los anteriormente mencionados durante el proceso de fermentación oscura (Cisneros – Pérez et al., 2015). Este hecho ya ha sido reportado por otros autores (Carrilo – Reyes et al., 2012; Buitrón et al., 2014). En el trabajo de Arooj et al., 2008a operando un reactor CSTR, se reportó que la concentración de alcoholes aumentaba a medida que aumentaba el tiempo de retención celular empleado. Por lo cual se puede sugerir que a mayores TRC se favorece la solvetogénesis. Sin embargo, para confirmar este resultado será necesario realizar la determinación de estos solventes.

### 4.3 – Remoción de glucosa y producción de biomasa en los diferentes TRC

La remoción de la glucosa en las operaciones fue disminuyendo a medida que fue bajando el tiempo de retención celular, esto es concordante con lo reportado en otros trabajos (Gavala et al., 2006; Wu et al., 2008; Palomo – Briones et al., 2017).

De acuerdo con lo que surge del balance de electrones que se realizó para cada una de las operaciones, se observa una diferencia entre las operaciones en cuanto al porcentaje de electrones destinados a la biomasa. En la operación con TRC = 10 horas fue en promedio del 13,7 %, que es similar a lo que se propone en bibliografía por Lee et al., 2009 (12 %), mientras que para las operaciones con TRC = 6 horas fue del 21,6 % y para el TRC = 24 horas fue de 3,5 %. Para realizar el balance de electrones, en todos los casos se asumió para cada una de las operaciones que el sistema estaba en estado estacionario. Dadas las variaciones observadas en los parámetros monitoreados, se calculó el coeficiente de variación para los primeros 10 TRC y los segundos 10 TRC de todas las operaciones para la concentración de sólidos, utilizando el software PAST 3.0 v 1.0.0.0 (tabla 4.1).

**Tabla 4.1** – Coeficientes de variación calculados para la concentración de sólidos de cada una de las operaciones.

TRC (horas)	Coef de Var (%) desde TRC = 1 a TRC= 10	Coef de Var (%) desde TRC = 11 a TRC= 20
6	35	39
10	29	15
24	29	10

Asumiendo que un sistema está en estado estacionario cuando la variación no es mayor del 10% entre las muestras y su media, en cuanto a la concentración de sólidos la operación con TRC = 10 horas estaba en estado estacionario al final de la operación y no así las otras. Realizando un balance de masa de sólidos dentro del reactor en estado no estacionario se puede estimar la tasa de generación de biomasa:

$$m_{SSV,t1} = m_{SSV,t0} + m_{SSV,E} - m_{SSV,S} + m_{SSV,gen} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$m_{SSV,E} \approx 0$$

$$(X_{SSV,t1} - X_{SSV,t0})V_R + \sum_{t_0}^{t_1} X_{SSV,S} * v = m_{SSV,gen} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Las tasas de generación de biomasa calculadas para los diferentes tiempos de retención fueron en promedio, para el TRC= 24 horas, 0,62 gSSV TRC<sup>-1</sup>, para el TRC= 10 horas 0,70 gSSV TRC<sup>-1</sup> y para el TRC=6 horas 1,50 gSSV TRC<sup>-1</sup>. Por lo tanto se confirma que la operación con TRC= 6 horas mayor cantidad de electrones fueron a formar parte de la biomasa.

#### 4.4 – Comunidades microbianas seleccionadas en las operaciones con diferentes TRC

Las comunidades microbianas de las diferentes operaciones presentaron índices de diversidad de Shannon en promedio de 1,2 para la operación con TRC = 6 horas, 0,9 para la operación con TRC = 10 horas y 0,7 para la operación con TRC = 24 horas, estos resultados son similares a los reportados en bibliografía (Palomo – Briones et al., 2017 y Sivagurunathan et al., 2016). Estas comparaciones deben ser tomadas con cautela ya que los índices fueron calculados a partir de resultados obtenidos utilizando técnicas diferentes para el análisis de las comunidades microbianas, que tienen diferentes limitaciones para determinar la diversidad.

En nuestro trabajo se observó la dominancia de un género de microorganismos sobre los demás, con abundancias de entre el 60% y el 90 %. Esta alta dominancia se debe a que los reactores de biomasa suspendida tienen una alta presión de selección y a la aplicación de condiciones extremas de operación, como pH ácido, tiempos de retención cortos y cargas orgánicas altas (Etchebere et al., 2016). En otros trabajos donde se estudió la comunidad microbiana de

reactores productores de H<sub>2</sub> también se observó que una sola población de microorganismos se vuelve dominante en la comunidad (Si et al., 2015; Etchebehere et al., 2016; Palomo – Briones et al., 2017).

De acuerdo con los resultados de T-RFLP se observó que las comunidades fueron más diversas a medida que disminuyó el tiempo de residencia celular. Esto no estaría de acuerdo con lo esperado, ya que un menor tiempo de residencia celular seleccionaría un grupo más restringido de microorganismos. Sin embargo, en las operaciones realizadas se detectaron grupos de microorganismos que pueden crecer a bajos tiempo de residencia celular como los *Lactobacillus*, las Enterobacterias y los *Clostridium*. Estos grupos fueron los dominantes a todos los tiempos de residencia celular de nuestro trabajo y los grupos minoritarios fueron los mismos en todas las operaciones con abundancias similares.

Las curvas de rarefacción obtenidas en el estudio de secuenciación masiva muestran una tendencia a la pérdida de diversidad a lo largo de la operación en los tres casos. Como solo se analizaron dos muestras de cada operación no podemos afirmarlo con certeza.

Sin embargo esta tendencia ya fue reportada por otros autores, en el trabajo de Rafrafi et al., 2013, se observó pérdida de diversidad a medida que transcurría la operación de sus reactores productores de H<sub>2</sub>. Se reportó que la diversidad de la comunidad bacteriana del inóculo disminuyó notoriamente luego de 24 horas de batch y este patrón se mantuvo durante 30 TRC, cuando el sistema llegó a estado estacionario la comunidad se volvió más estable. En el trabajo de Palomo – Briones et al., 2017 también se reportó que las comunidades microbianas seleccionadas estaban compuestas por unas pocas especies dominantes.

#### 4.5 – Rol de microorganismos detectados en las comunidades microbianas

Mediante el análisis de secuenciación masiva fue posible detectar 10 géneros bacterianos con abundancia mayor al 1% en las comunidades bacterianas de las operaciones realizadas con diferente TRC

A continuación se discute el posible rol de estos microorganismos en las operaciones realizadas de acuerdo a lo reportado en bibliografía.

#### 4.5.1 – Microorganismos productores de H<sub>2</sub>: *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Veillonaceae*

Los géneros *Clostridium*, *Klebsiella sp.* y *Raoultella sp.* pertenecientes a las familias *Clostridiaceae* y *Enterobacteriaceae*, respectivamente, son reportados como productores de H<sub>2</sub> de alto rendimiento, ya que muchas especies dentro de estos géneros tienen la capacidad de producir H<sub>2</sub> como uno de sus principales productos de fermentación. Además, se ha reportado que en cultivos puros son los microorganismos que presentan mejores rendimientos en H<sub>2</sub> (Hu et al., 2014; Patel et al., 2014).

En nuestro trabajo se observó que la presencia de alguno de estos microorganismos en la comunidad se relacionaba con períodos de alta producción de H<sub>2</sub>, para casi todas las muestras. *Raoultella* y *Klebsiella* son fermentadoras facultativas, pueden fermentar diferentes azúcares y producen H<sub>2</sub> por fermentación ácido mixta y butanodiolica. *Klebsiella* ha sido ampliamente reportada como productora de H<sub>2</sub> (Patra et al., 2011; Patel et al., 2014; Tapia – Venegas et al., 2015b). También se ha comprobado la producción de H<sub>2</sub> por el género *Raoultella* a partir de glucosa en cultivos en batch (Marone et al., 2011). En la operación con TRC= 6 horas se observó un pequeño aumento en la producción de H<sub>2</sub> hacia la mitad de la operación que podría estar relacionado con el aumento en la abundancia de bacterias del género *Raoultella*, ya que durante este período no se observa ningún otro microorganismo reportado como productor de H<sub>2</sub>.

Se ha reportado que la abundancia de los microorganismos del género *Clostridium* se relaciona positivamente con la producción de H<sub>2</sub> en los reactores hidrogenogénicos y que la disminución de la misma lleva a la disminución de la producción de H<sub>2</sub> (Maitinguer et al., 2008; Monlau et al., 2013; Laothanacharon et al., 2014; Tapia Venegas et al., 2015b) En algunos estudios se ha observado que aunque estos microorganismos no sean los dominantes en la comunidad

microbiana los rendimientos en H<sub>2</sub> obtenidos son similares a los rendimientos obtenidos en trabajos con comunidades microbianas dominadas por *Clostridium* (Chojnacka et al., 2011; Etchebehere et al., 2016).

En los resultados obtenidos por secuenciación masiva para la operación con TRC= 24 horas la disminución en la producción de H<sub>2</sub> detectada a la mitad de la operación (luego de 8 tiempos de residencia celular) se relaciona con la disminución en la abundancia de las poblaciones de *Clostridium sp.* y de *Raoultella*. En esta misma operación se observó que al final de la operación hubo un aumento en la producción de H<sub>2</sub>. Este aumento se puede relacionar con el aumento en la abundancia de un T-RF de 511 pb detectado en el análisis por T-RFLP de la comunidad microbiana. Este T-RF podría corresponder a un microorganismo del género *Clostridium*. Esta suposición surge a partir de los resultados obtenidos en un estudio previo de nuestro grupo de investigación, en el cual, utilizando el mismo método de análisis de la comunidad microbiana, se identificó un T-RF de 515 pb que fue relacionado con un microorganismo de la especie *Clostridium tyrobutyricum* (Castelló, 2014). Estos fragmentos, por más que tienen diferente tamaño podrían pertenecer al mismo microorganismo, dado que el largo de los T-RFs puede variar, dependiendo de su exposición a la temperatura ambiente y al contenido en purinas del ADN del microorganismo (Kaplan & Kitts et al., 2003; Tebbe et al., 2015). Para confirmar esta suposición se podría realizar un análisis de secuenciación masiva de esta muestra y verificar la abundancia de los microorganismos del género *Clostridium*.

Microorganismos de los géneros *Klebsiella*, *Raoultella* y *Clostridium* se encontraron al comienzo de la operación con TRC = 10 horas, que se corresponde con un período de alta producción de H<sub>2</sub>. Hacia el final de la operación, *Klebsiella* no se detectó más y *Raoultella* disminuyó su abundancia. Sin embargo, se detectó un aumento de la población de *Clostridium* cuando la producción de H<sub>2</sub> era muy baja. Esta disminución se podría deber al consumo de H<sub>2</sub> por

homoacetogénesis por microorganismos del mismo género *Clostridium*. Este punto será discutido más adelante.

Otros microorganismos reportados como productores de H<sub>2</sub>, pero de bajo rendimiento son los miembros de la familia *Veillonellaceae*. Estos microorganismos han sido detectados en reactores de producción de H<sub>2</sub> (Tapia – Venegas et al., 2015b; Castelló et al., 2009) Su función en las comunidades productoras de H<sub>2</sub> no es clara aún (Hung et al., 2011). Algunos miembros de esta familia están reportados como consumidores de ácido láctico dando H<sub>2</sub>, acetato y propionato (Castelló et al., 2009; Etchebehere et al., 2016), otros también se reportan como consumidores de ácido láctico e H<sub>2</sub> para dar propionato (Tapia – Venegas et al., 2015b).

En nuestro trabajo los miembros de esta familia fueron encontrados en baja abundancia solamente en las muestras de comienzo de las operaciones con TRC= 6 y 10 horas. El organismo cuya secuencia fue más relacionada con la secuencia de esta OTU fue un microorganismo productor de propiónico a partir de glucosa o de ácido láctico, por tanto tendría un rol de consumidor de H<sub>2</sub> en estas operaciones (Moe et al., 2012).

#### 4.5.2 – Microorganismos competidores por sustrato

##### 4.5.2.1 – *Pseudomonas* sp.

Los organismos del género *Pseudomonas* son descritos como bacterias aerobias respiradoras que consumen glucosa sin producción de H<sub>2</sub>. Estas bacterias se han encontrado en reactores productores de H<sub>2</sub>, pero su función no es clara (Perna et al., 2013). Sin embargo, se ha reportado una cepa de *Pseudomonas stutzeri* productora de H<sub>2</sub>, en el trabajo de Shiyan & Krishnaveni, 2012, aunque no se explica el mecanismo por el cual el H<sub>2</sub> sería producido. Otro rol que se les ha asignado a estos microorganismos es que podrían funcionar como consumidoras de O<sub>2</sub> favoreciendo la anaerobiosis en el reactor, beneficiando a los microorganismos anaerobios estrictos productores de H<sub>2</sub> (Perna et al., 2013; Cabrol et al., 2017). En nuestro trabajo, los organismos del género *Pseudomonas* fueron detectados con una abundancia del 2-3% en todas

las muestras analizadas por secuenciación masiva. De acuerdo con el análisis realizado mediante la herramienta BLAST, la secuencia de la OTU clasificada dentro de este género, presentó una alta similitud con la secuencia de *Pseudomonas lini* que es una bacteria gram negativa, móvil y respiradora de oxígeno (Delorme et al., 2002), por lo tanto la función más probable de estos organismos durante las diferentes operaciones fue competir por sustrato y consumir el poco O<sub>2</sub> de la atmósfera del reactor.

#### 4.5.2.2 – Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas dominaron el reactor en las tres condiciones ensayadas, sin embargo hubo diferencias en la producción de láctico y en la composición de las comunidades microbianas que podrían explicar las diferencias entre la performance de los reactores.

Por secuenciación masiva detectamos 5 géneros de bacterias lácticas: *Bifidobacterium*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, y *Leuconostoc sp.*

*Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* son bacterias homofermentativas que producen ácido láctico como principal producto de fermentación de azúcares. *Leuconostoc* es una bacteria heterofermentativa que al fermentar azúcares produce etanol y ácido láctico, mientras que *Bifidobacterium* tiene como productos de fermentación el acetato y el lactato. Estas bacterias han sido ampliamente reportadas en reactores de producción de H<sub>2</sub> (Ren et al., 2007; Pattra et al., 2011; Chojnack et al., 2011; Perna et al., 2013; Gomes et al., 2015; Gomes et al., 2016; Etchebehere et al., 2016; Palomo – Briones et al., 2017).

La interacción entre las bacterias lácticas y las bacterias productoras de H<sub>2</sub> no está del todo clara aún, lo que vemos reflejado en los resultados de este trabajo. En general, se observó que cuando hubo una disminución en la producción de H<sub>2</sub> se correspondió con alta producción de ácido láctico y baja producción de butirato, para todas las operaciones. Aunque, los picos de producción de H<sub>2</sub> observados en la operación con TRC = 24 horas podrían atribuirse a la interacción entre ambos microorganismos. Se ha reportado que podría existir una colaboración

entre las bacterias lácticas y los *Clostridium*, mediante el consumo del lactato en presencia de otra fuente carbonada para dar H<sub>2</sub> y butirato (Baghchehsaraee et al., 2009; Chojnacka et al., 2011; Sikora et al., 2013; Cabrol et al., 2017). Esta hipótesis podría explicar porque en la operación con TRC= 24 horas se obtiene la mayor producción de hidrógeno a pesar de que la concentración en ácido láctico en promedio, es mayor que en las otras operaciones. Este mecanismo se ha reportado para *Clostridium tyrobutiricum* (Mariakakis et al., 2011), que fue el microorganismo más abundante dentro de la población de los microorganismos del género *Clostridium*, según el análisis de secuenciación masiva realizado en nuestro trabajo.

Como se mencionó en la sección 4.5.1 hacia el final de la operación con TRC= 10 horas se observó una disminución de la producción de H<sub>2</sub> que coincidió con la disminución también de la abundancia del género *Raoultella*. Se ha reportado que las bacteriocinas liberadas por las bacterias lácticas también tienen un efecto antimicrobiano contra las enterobacterias (Solvino et al., 2011). Es posible que la producción de bacteriocinas haya tenido un efecto negativo en la población de *Raoultella*. Las bacteriocinas también tienen un efecto estresante en los *Clostridium*, éstas inducen que cambien su metabolismo hacia la formación de solventes y lactato (Hawkes et al., 2002; Monlau et al., 2013).

#### 4.5.3 – Microorganismos consumidores de H<sub>2</sub>

La baja producción de H<sub>2</sub> también podría atribuirse al consumo del mismo por homoacetogénesis, un proceso ya reportado en la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura (Arooj et al., 2008; Dinamarca et al., 2009, Fontes – Lima & Zaiat et al., 2012; Carrillo – Reyes et al., 2014).

Al comparar el rendimiento estequiométrico en H<sub>2</sub> calculado, con el rendimiento máximo teórico en H<sub>2</sub> que se podría obtener por fermentación oscura (4 moles H<sub>2</sub>/mol glu\_C), se observa que otras vías metabólicas además de las fermentaciones formadoras de H<sub>2</sub> están ocurriendo en la operación. El H<sub>2</sub> experimental obtenido tendrá que ser igual al RH<sub>2</sub> estequiométrico, para

descartar consumo por homoacetogénesis. Por tanto, si el rendimiento calculado de manera estequiométrica es mayor que el obtenido experimentalmente nos indica que parte de H<sub>2</sub> está siendo consumido por homoacetogénesis, ya que no detectamos metanogénesis en ninguna de las operaciones. Para estimar el efecto de la homoacetogénesis en las operaciones con diferente TRC, se realizaron comparaciones entre el rendimiento estequiométrico en hidrógeno (RH<sub>2</sub> esteq.) y el rendimiento en hidrógeno experimental (RH<sub>2</sub> exp.) de cada una de las operaciones, método también reportado por Gavala et al., 2006; Luo et al., 2011; Rafrafi et al., 2013. Al graficar la relación entre el RH<sub>2</sub> exp. y el RH<sub>2</sub> esteq., se observó que a medida que disminuimos el tiempo de retención celular la diferencia entre ambos es mayor. Este resultado se verificó también mediante la comparación de la producción de H<sub>2</sub> con la producción de acético y butírico. Este cociente fue siempre menor que dos para las operaciones con TRC= 6 y 10 horas, lo que indica que la homoacetogénesis se favoreció tiempos de residencia celular más cortos. En los trabajos de Arooj et al., 2008 a y b se calculó el porcentaje del acetato producido por homoacetogénesis. En estos trabajos los investigadores reportaron mayor cantidad de acetato producido por homoacetogénesis a tiempos de retención cortos, sobre todo cuando el TRC= 6 horas, tanto trabajando con reactores del tipo CSTR (Arooj et al., 2008a) como SBR (Arooj et al., 2008b). Aplicando el modelo propuesto por Arooj et al., 2008a (Ecuación 4.3, 3.1, 4.4 y 4.5), calculamos para nuestras operaciones dichos porcentajes.

$$HAc\ total = HAc\ a + HAc\ b \quad \text{Ecuación 4.3}$$

$$H_2\ exp. = 2\ x\ (HAc\ a + H\ Bu) - H\ Pr - HAc\ b \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Siendo HAc total, todo el acetato producido, HAc a el acetato producido por reacciones productoras de H<sub>2</sub>, HAc b, el acetato producido por homoacetogénesis. HPr, HBU y H<sub>2</sub> se refieren

al ácido propiónico, el ácido butírico y el H<sub>2</sub> producidos. Las unidades utilizadas para los ácidos y para el H<sub>2</sub> producidos fueron moles d<sup>-1</sup>.

Despejando obtenemos que:

$$HAc\ b = \left(\frac{1}{6}\right) \times (2x\ (HAc\ total + HBU) - HPr - H_2) \quad Ecuación\ 4.4$$

Para calcular el porcentaje de acetato que fue producido por homoacetogénesis:

$$\%Homoacetogénesis = \frac{HAc\ b}{HAc\ total} \times 100 \quad Ecuación\ 4.5$$

Para la operación con TRC= 24 horas este porcentaje fue en promedio 32%, para la operación con TRC= 10 horas fue de 54% y para la operación con TRC= 6 horas fue de 61%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Arooj et al., 2008a, donde encontraron que a TRC = 18 horas 34 % del acetato era producido por homoacetogénesis, a TRC = 12 y 9 horas era 30 % y 43 % respectivamente y a TRC = 6 horas fue de 57 %.

Con estos resultados se observa que para tiempos de residencia celular más cortos el acetato producido por homoacetogénesis fue casi igual que el producido por las reacciones formadoras de H<sub>2</sub>.

Los microorganismos homoacetogénicos no fueron encontrados con los métodos de identificación de microorganismos empleados en este trabajo. Se realizó un estudio comparativo mediante la construcción de un árbol filogenético con las secuencias de las OTUs obtenidas por secuenciación masiva correspondiente al género *Clostridium*. Observamos que las secuencias obtenidas en este trabajo no se agruparon con secuencias de los microorganismos homoacetogénicos reportados en bibliografía. Sin embargo, la secuencia de una de las OTUs presentó similitud con la secuencia de *Clostridium luticellari*. Si bien no se reportó la homoacetogénesis para este organismo, la secuencia del mismo presenta alta similitud con la

secuencia de *Clostridium ljungdahlii*, que es homoacetógeno (Wang et al., 2015). En el marco de la tesis de doctorado de Laura Fuentes también realizada en nuestro laboratorio, se tiene como objetivo cuantificar las bacterias homoacetogénicas utilizando un análisis de real time PCR. Estos resultados muestran que a menores tiempos de retención mayor era el número de copias de gen de la tetrahidrofolato sintasa (que es una enzima de la vía de la homoacetogénesis) por ng de ADN (Fuentes, 2017, comunicación personal). Estos resultados confirman que la homoacetogenesis se favorece al disminuir el TRC.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, el TRC determinó las vías metabólicas seleccionadas en cada operación. La comunidad microbiana de todas las operaciones siempre estuvo dominada por bacterias lácticas, pero a TRC mayores prevaleció la vía de la fermentación láctica, mientras que a TRC menores prevaleció la homoacetogénesis. Ambos procesos tuvieron consecuencias sobre la estabilidad de la producción de H<sub>2</sub>. Los TRC más cortos mostraron más estabilidad en la producción de H<sub>2</sub>, aunque la misma fue muy baja, mientras el TRC más largo mostró mejor producción pero menor estabilidad.

## **CAPÍTULO V – CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO**

## 5 – Conclusiones generales y perspectivas a futuro

### 5.1 – Conclusiones Generales

Los resultados de esta tesis muestran que el TRC fue un parámetro influyente en la estabilidad de la producción de H<sub>2</sub>, ya que según el TRC aplicado se seleccionaron diferentes vías metabólicas.

El proceso de producción de H<sub>2</sub> fue más estable a tiempos de residencia celular cortos (6 y 10 horas), pero su producción de H<sub>2</sub> fue muy baja, mientras que a tiempo de residencias más largos (24 horas) la operación fue más inestable pero la producción de H<sub>2</sub> fue mayor. La mejor VPH<sub>2</sub> obtenida fue de 2,8 LH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> y el mejor RH<sub>2</sub> fue 0,5 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> glu\_C.

A partir de los resultados obtenidos de los metabolitos detectados en las diferentes operaciones, se observó que la fermentación láctica fue más prevalente a medida que aumentaba el TRC, mientras el consumo de H<sub>2</sub> por homoacetogénesis fue mayor, a medida que disminuía el TRC.

Por tanto, la vía de fermentación láctica tiene más influencia en la inestabilidad de la producción de H<sub>2</sub>, que la homoacetogénesis para estas condiciones de operación.

La comunidad microbiana de las diferentes operaciones fue poco diversa según el índice de diversidad de Shannon, que estuvieron formadas por pocos géneros de microorganismos en abundancias mayores al 1%. La población dominante en todas las operaciones fue la de *Lactobacillus*, mientras *Clostridium* y *Raoultella* se encontraron en menor abundancia.

En general, la baja producción de H<sub>2</sub> se asocia a la baja abundancia de las bacterias productoras de H<sub>2</sub> en todas las operaciones y en particular, para la operación con TRC= 24 horas a la prevalencia de la fermentación láctica, mientras que para las operaciones con TRC = 10 y 6 horas, al consumo de H<sub>2</sub> por homoacetogénesis.

## 5.2 – Perspectivas de trabajo a futuro

La producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura es un proceso interesante para producir energía limpia y se debe seguir estudiando para encontrar que factores son los más importantes para tener un proceso estable y con buena producción de H<sub>2</sub>.

En este trabajo se observó que los microorganismos seleccionados y vías metabólicas que prevalecen durante el proceso de producción de H<sub>2</sub> son importantes tanto en la estabilidad del proceso como en la producción de H<sub>2</sub>. Los microorganismos y las vías metabólicas seleccionadas dependerán de las condiciones de operación utilizadas.

Se debería profundizar el conocimiento de las interacciones entre los distintos grupos microbianos presentes en la fermentación oscura, de forma de seleccionar a los microorganismos productores de H<sub>2</sub> por excelencia (*Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*) y a los colaboradores (*Veillonellaceae*, LAB) y promover las vías metabólicas que llevan a la producción de H<sub>2</sub> en esos microorganismos. En particular, se conoce muy poco de las condiciones que favorecen la homoacetogénesis por lo que es necesario seguir estudiando la interacción de estas bacterias con las productoras de hidrógeno.

Por otro lado, la gran incógnita que queda aún sin responder es el efecto contradictorio de las LAB. No se conoce aún las causas por las cuáles en algunas operaciones una alta abundancia de estas bacterias favorece la producción de hidrógeno. El estudio de estas causas es fundamental para lograr procesos con mayor estabilidad y alta producción de hidrógeno.

En este trabajo no se cuantificó la producción de solventes (etanol, butanol, acetona, etc.), la producción de estos compuestos se sugiere durante la operación a TRC de 24 h donde los balances de electrones muestran que hay producción de metabolitos no cuantificados. La detección de estos metabolitos requiere otras condiciones de análisis que sería bueno incluir para poder confirmar si se produce este cambio en las vías metabólicas durante la operación a TRC de 24 h.

Se ha reportado que el inóculo utilizado y los tratamientos aplicados al mismo no influyen en la comunidad microbiana que luego persiste en el reactor, por lo que un factor a tener en cuenta en la selección de la comunidad microbiana productora de H<sub>2</sub> podría ser la operación de arranque de los reactores hidrogenogénicos. Hasta el momento no se ha reportado un solo método de arranque de las operaciones de los reactores productores de H<sub>2</sub>. Se debería profundizar el conocimiento en esta área de modo de encontrar un método de arranque que permita la selección de los microorganismos antes nombrados y la prevalencia de sus vías metabólicas productoras de H<sub>2</sub>.

En esta tesis se abordó el tema de la inestabilidad de la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura, debido a la complejidad de estos sistemas queda aún mucha investigación por realizar para poder avanzar hacia procesos más estables y eficientes, en este aspecto conocer la interacción entre los microorganismos y determinar cómo seleccionar los microorganismos con alta eficiencia es el gran desafío.

## **CAPÍTULO VI – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6 – REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A., & Domínguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *TRENDS in Biotechnology*, 22(9), 477-485.
- Apha, A. (1995). WPCF, Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th edition. *American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA*.
- Argun, H., Kargi, F., & Kapdan, I. K. (2009). Microbial culture selection for bio-hydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation. *international journal of hydrogen energy*, 34(5), 2195-2200.
- Arooj, M. F., Han, S. K., Kim, S. H., Kim, D. H., & Shin, H. S. (2007). Sludge characteristics in anaerobic SBR system producing hydrogen gas. *Water research*, 41(6), 1177-1184.
- Arooj, M. F., Han, S. K., Kim, S. H., Kim, D. H., & Shin, H. S. (2008a). Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *International journal of hydrogen energy*, 33(13), 3289-3294.
- Arooj, M. F., Han, S. K., Kim, S. H., Kim, D. H., & Shin, H. S. (2008b). Effect of HRT on ASBR converting starch into biological hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22), 6509-6514.
- Azman, S., Khadem, A. F., Van Lier, J. B., Zeeman, G., & Plugge, C. M. (2015). Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogas production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(23), 2523-2564.
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A., & Reid, G. (2008). The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International journal of hydrogen energy*, 33(15), 4064-4073.
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., & Margaritis, A. (2009). Effect of extrinsic lactic acid on fermentative hydrogen production. *international journal of hydrogen energy*, 34(6), 2573-2579.
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., & Margaritis, A. (2010). Fermentative hydrogen production by diverse microflora. *international journal of hydrogen energy*, 35(10), 5021-5027.

- Balachandar, G., Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen production from organic wastes by dark fermentation. *Biohydrogen*. Burlington, MA: Elsevier, 103-144
- Balat, H., & Kırtay, E. (2010). Hydrogen from biomass—present scenario and future prospects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(14), 7416-7426.
- BP Statistical Review of World Energy June 2017 (BP, 2017); [www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statisticalreview2017/bp-statistical-review-of-world-energy-2017-full-report.pdf](http://www.bp.com/content/dam/bp/en/corporate/pdf/energy-economics/statisticalreview2017/bp-statistical-review-of-world-energy-2017-full-report.pdf)
- Borzacconi, L., López, I., Passeggi, M., Etchebehere, C., Barcia, R. (2008). Sludge deterioration in a fullscale UASB reactor after a pH drop working under low loading conditions. *Water Sci Technol*, 57,(5), 797-802.
- Buckel, W., & Thauer, R. K. (2013). Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na<sup>+</sup> translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(2), 94-113.
- Buitrón, G., & Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology*, 101(23), 9071-9077.
- Buitrón, G., Prato-Garcia, D., & Zhang, A. (2014). Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Science and Technology*, 70(12), 1919-1925.
- Bundhoo, M. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16), 6713-6733.
- Cabezas, A., Draper, P., Etchebehere, C. (2009). Fluctuation of microbial activities after influent load variations in a full-scale SBR: recovery of the biomass after starvation. *Appl Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.1007/s00253-009-2138-x.
- Cabezas, A., Draper, P., Muxí, L., Etchebehere, C. (2006). Post treatment of a slaughterhouse waste-water- stability of the microbial community of a Sequencing Batch reactor operated under Oxygen limited conditions. *Water Sci Technol* 54(2), 215 – 221.
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. *Fems microbiology reviews*, 41(2), 158-18.

Camper, A. K., McFeters, G. A., Characklis, W. G., & Jones, W. L. (1991). Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8), 2233-2239.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K. ... & Huttley, G. A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336.

Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *international journal of hydrogen energy*, 37(7), 5591-5601.

Carrillo Reyes, J. (2013). Producción de hidrógeno en reactores de biomasa fija, implicaciones de microorganismos hidrogenotróficos. Tesis de Doctorado.

Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., Montoya, L., & Razo-Flores, E. (2014). Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: Community dynamics. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(22), 11423-11432.

Castelló, E., y Santos, C. G., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(14), 5674-5682.

Castelló, E., Perna, V., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2011). Microbial community composition and reactor performance during hydrogen production in a UASB reactor fed with raw cheese whey inoculated with compost. *Water Science and Technology*, 64(11), 2265-2273.

Castelló E. (2014). Producción de Hidrógeno a partir de Suero de Queso. Tesis de Doctorado en Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Cha, G. C., & Noike, T. (1997). Effect of rapid temperature change and HRT on anaerobic acidogenesis. *Water science and technology*, 36(6-7), 247-253.

Chang, J. J., Wu, J. H., Wen, F. S., Hung, K. Y., Chen, Y. T., Hsiao, C. L., ... & Huang, C. C. (2008). Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1579-1585.

Cheng, C. H., Hung, C. H., Lee, K. S., Liao, P. Y., Liang, C. M., Yang, L. H., ... & Lin, C. Y. (2008). Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *international journal of hydrogen energy*, 33(19), 5242-5249.

Chojnacka, A., Błaszczak, M. K., Szczęsny, P., Nowak, K., Sumińska, M., Tomczyk-Żak, K., ... & Sikora, A. (2011). Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. *Bioresource technology*, 102(21), 10057-10064.

Christy, P. M., Gopinath, L. R., & Divya, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 167-173.

Cisneros-Pérez, C., Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., Etchebehere, C., & Razo-Flores, E. (2015). Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. *international journal of hydrogen energy*, 40(19), 6329-6339.

Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., Smidt, H., ... & O'Toole, P. W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS one*, 4(8), e6669.

Das, D., Dutta, T., Nath, K., Kotay, S. M., Das, A. K., & Veziroglu, T. N. (2006). Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. *Current science*, 1627-1637.

Das, D., & Veziroglu, T. N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046-6057.

Dávila-Vázquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34(10):4296-4304.

Dávila-Vázquez, G., de León-Rodríguez, A., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2011). The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and bioenergy*, 35(7), 3174-3181.

Delorme, S., Lemanceau, P., Christen, R., Corberand, T., Meyer, J. M., & Gardan, L. (2002). *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(2), 513-523.

Demirel, B., & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 173-190.

Dinamarca C, Bakke R. (2009). Apparent hydrogen consumption in acid reactors: observations and implications. *Water Science and Technology* 2009; 59 (7): 1441 - 7.

Dinamarca, C., Gañán, M., Liu, J., Bakke, R. (2011). H<sub>2</sub> consumption by anaerobic non-methanogenic mixed cultures. *Water Science and Technology*. 63(8):1582-1589.

Drake, H. L. (1991). Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" pathway: past and current perspectives. In *Acetogenesis* (pp. 3-60). Springer US.

Dunbar, J., Ticknor, L. O., & Kuske, C. R. (2001). Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 190-197.

Dutta, S. (2014). A review on production, storage of hydrogen and its utilization as an energy resource. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4), 1148-1156.

Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G., & El Naggar, M. H. (2013). A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12), 4945-4966.

Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.

Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., ... & Zaiat, M. (2016). Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*(7), 3371-3384.

Fontes – Lima, D. M., & Zaiat, M. (2012). The influence of the degree of back-mixing on hydrogen production in an anaerobic fixed-bed reactor. *International journal of hydrogen energy*, *37*(12), 9630-9635.

Fontes – Lima, D. M., Moreira, W. K., & Zaiat, M. (2013). Comparison of the use of sucrose and glucose as a substrate for hydrogen production in an upflow anaerobic fixed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *38*(35), 15074-15083

Fuentes, Laura 2017. Comunicación personal.

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg

Gavala, H. N., Skiadas, I. V., & Ahring, B. K. 2006. Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, *31*(9), 1164-1175.

Gomes, B. C., Rosa, P. R. F., Etchebehere, C., Silva, E. L., & AmâncioVaresche, M. B. (2015). Role of homo-and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. *International Journal of Hydrogen Energy*, *40*(28), 8650-8660.

Gomes, S. D., Fuess, L. T., Mañunga, T., de Lima Gomes, P. C. F., & Zaiat, M. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*(19), 8120-8131.

Goud, R. K., Sarkar, O., & Mohan, S. V. (2014). Regulation of biohydrogen production by heat-shock pretreatment facilitates selective enrichment of *Clostridium* sp. *international journal of hydrogen energy*, *39*(14), 7572-7586.

Greening, C., Biswas, A., Carere, C. R., Jackson, C. J., Taylor, M. C., Stott, M. B., ... & Morales, S. E. (2016). Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H<sub>2</sub> is a widely utilised energy source for microbial growth and survival. *The ISME journal*, 10(3), 761.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73-95.

Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *International journal of hydrogen energy*, 35(19), 10660-10673.

Guo, W. Q., Meng, Z. H., Ren, N. Q., Zhang, Z. P., & Cui, F. Y. (2011). Optimization of key variables for the enhanced production of hydrogen by *Ethanoligenens harbinense* W1 using response surface methodology. *international journal of hydrogen energy*, 36(10), 5843-5848.

Hallenbeck, P. C. 2009 Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34(17):7379-7389.

Hallenbeck, P. C., Abo-Hashesh, M., & Ghosh, D. (2012). Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource technology*, 110, 1-9.

Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11), 1339-1347.

Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 172-184.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis *Palaeontol. Electronica* 4: 1–9.

Hernández-Mendoza, C. E., & Buitrón, G. (2014). Suppression of methanogenic activity in anaerobic granular biomass for hydrogen production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(1), 143-149.

Horiuchi, J. I., Shimizu, T., Tada, K., Kanno, T., & Kobayashi, M. (2002). Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control. *Bioresource Technology*, *82*(3), 209-213.

Hu, C. C., Giannis, A., Chen, C. L., & Wang, J. Y. (2014). Evaluation of hydrogen producing cultures using pretreated food waste. *international journal of hydrogen energy*, *39*(33), 19337-19342.

Huang, Y., Zong, W., Yan, X., Wang, R., Hemme, C. L., Zhou, J., & Zhou, Z. (2010). Succession of the bacterial community and dynamics of hydrogen producers in a hydrogen-producing bioreactor. *Applied and environmental microbiology*, *76*(10), 3387-3390.

Hung, C. H., Lee, K. S., Cheng, L. H., Huang, Y. H., Lin, P. J., & Chang, J. S. (2007). Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate. *Applied microbiology and biotechnology*, *75*(3), 693-701.

Hung, C. H., Chang, Y. T., & Chang, Y. J. (2011). Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems—a review. *Bioresource technology*, *102*(18), 8437-8444.

Hussy, I., Hawkes, F. R., Dinsdale, R., & Hawkes, D. L. (2003). Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. *Biotechnology and bioengineering*, *84*(6), 619-626.

Jo, J. H., Jeon, C. O., Lee, D. S., & Park, J. M. (2007). Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *Journal of biotechnology*, *131*(3), 300-308.

Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and microbial technology*, *38*(5), 569-582.

Kaplan, C. W., & Kitts, C. L. (2003). Variation between observed and true terminal restriction fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *Journal of microbiological methods*, *54*(1), 121-125.

Karadag, D., & Puhakka, J. A. (2010). Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control. *International journal of hydrogen energy*, 35(19), 10245-10251.

Kawagoshi, Y., Hino, N., Fujimoto, A., Nakao, M., Fujita, Y., Sugimura, S., & Furukawa, K. (2005). Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5), 524-530.

Kim, D. H., Han, S. K., Kim, S. H., & Shin, H. S. (2006). Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(15), 2158-2169.

Kim, S., Seol, E., Raj, S. M., Park, S., Oh, Y. K., & Ryu, D. D. (2008). Various hydrogenases and formate-dependent hydrogen production in *Citrobacter amalonaticus* Y19. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1509-1515.

Kim, T. H., Lee, Y., Chang, K. H., & Hwang, S. J. (2012). Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresource technology*, 103(1), 136-141.

Koskinen, P. E., Kaksonen, A. H., & Puhakka, J. A. (2007). The relationship between instability of H<sub>2</sub> production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised-bed bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 97(4), 742-758.

Kraemer, J. T., & Bagley, D. M. (2008). Measurement of H<sub>2</sub> consumption and its role in continuous fermentative hydrogen production. *Water Science and Technology*, 57(5), 681-685.

Kumar, P., Patel, S. K., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2013). Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnology advances*, 31(8), 1543-1561.

Laothanachareon, T., Kanchanasuta, S., Mhuanthong, W., Phalakornkule, C., Pisutpaisal, N., & Champreda, V. (2014). Analysis of microbial community adaptation in mesophilic hydrogen fermentation from food waste by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Journal of environmental management*, 144, 143-151.

Lazaro, C. Z., Perna, V., Etchebehere, C., & Varesche, M. B. A. (2014). Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: the effects of temperature and substrate concentration. *international journal of hydrogen energy*, 39(12), 6407-6418.

Li, C., & Fang, H. H. (2007). Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(1), 1-39.

Li, S. L., Lin, J. S., Wang, Y. H., Lee, Z. K., Kuo, S. C., Tseng, I. C., & Cheng, S. S. (2011). Strategy of controlling the volumetric loading rate to promote hydrogen-production performance in a mesophilic-kitchen-waste fermentor and the microbial ecology analyses. *Bioresource technology*, 102(18), 8682-8687.

Lin, C. Y., Wu, C. C., & Hung, C. H. (2008). Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1), 43-50.

Liu, X., Zhu, Y., & Yang, S. T. (2006). Construction and characterization of ack deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid and hydrogen production. *Biotechnology progress*, 22(5), 1265-1275.

Liu, H., & Wang, G. (2012). Hydrogen production of a salt tolerant strain *Bacillus* sp. B2 from marine intertidal sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 31-37.

Lee, D. J., Show, K. Y., & Su, A. 2011. Dark fermentation on biohydrogen production: pure culture. *Bioresource technology*, 102(18), 8393-8402.

Lee, H. S., Salerno, M. B., & Rittmann, B. E. (2008). Thermodynamic evaluation on H<sub>2</sub> production in glucose fermentation. *Environmental science & technology*, 42(7), 2401-2407.

Lee, H. S., & Rittmann, B. E. (2009). Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. *Biotechnology and bioengineering*, 102(3), 749-758.

Lee, K. S., Tseng, T. S., Liu, Y. W., & Hsiao, Y. D. (2012). Enhancing the performance of dark fermentative hydrogen production using a reduced pressure fermentation strategy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15556-15562.

Lo, Y. C., Su, Y. C., Chen, C. Y., Chen, W. M., Lee, K. S., & Chang, J. S. (2009). Biohydrogen production from cellulosic hydrolysate produced via temperature-shift-enhanced bacterial cellulose hydrolysis. *Bioresource technology*, *100*(23), 5802-5807.

Luo, G., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2011). Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production. *Biotechnology and bioengineering*, *108*(8), 1816-1827.

Lütke-Eversloh, T., & Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current opinion in biotechnology*, *22*(5), 634-647.

Madigan, M. T., Clark, D. P., Stahl, D., & Martinko, J. M. (2015). *Brock Biology of Microorganisms 14th edition*. Benjamin Cummings.

Maintinguer, S. I., Fernandes, B. S., Duarte, I. C., Saavedra, N. K., Adorno, M. A. T., & Varesche, M. B. (2008). Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, *33*(16), 4309-4317.

Mäkinen, A. E., Nissilä, M. E., & Puhakka, J. A. (2012). Dark fermentative hydrogen production from xylose by a hot spring enrichment culture. *international journal of hydrogen energy*, *37*(17), 12234-12240.

Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., & Steinmetz, H. (2011). Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *international journal of hydrogen energy*, *36*(17), 10690-10700.

Marone, A., Izzo, G., Mentuccia, L., Massini, G., Paganin, P., Rosa, S., ... & Signorini, A. (2014). Vegetable waste as substrate and source of suitable microflora for bio-hydrogen production. *Renewable Energy*, *68*, 6-13.

Megee III, R. D., Drake, J. F., Fredrickson, A. G., & Tsuchiya, H. M. (1972). Studies in intermicrobial symbiosis. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. *Canadian journal of microbiology*, *18*(11), 1733-1742.

Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., & Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource Technology*, 73(1), 59-65.

Moe, W. M., Stebbing, R. E., Rao, J. U., Bowman, K. S., Nobre, M. F., da Costa, M. S., & Rainey, F. A. (2012). *Pelosinusdefluvii* sp. nov., isolated from chlorinated solvent-contaminated groundwater, emended description of the genus *Pelosinus* and transfer of *Sporotalea propionica* to *Pelosinuspropionicus* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(6), 1369-1376.

Mohan, S., Mohanakrishna, G., Sarma P. N. (2008). Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33(9):2156-2166

Monlau, F., Aemig, Q., Trably, E., Hamelin, J., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2013). Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. *international journal of hydrogen energy*, 38(28), 12273-12282.

Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., & Ohba, M. (2002). Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International journal of hydrogen energy*, 27(11), 1367-1371.

Nualsri, C., Kongjan, P., & Reungsang, A. (2016). Direct integration of CSTR-UASB reactors for two-stage hydrogen and methane production from sugarcane syrup. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(40), 17884-17895.

Oh SE, Van Ginkel S, Logan BE. 2003 The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing bio-hydrogen gas production. *Environmental Science and Technology*; 37: 5186 - 90.

Olmos-Dichara, A., Ampe, F., Uribelarrea, J. L., Pareilleux, A., & Goma, G. (1997). Growth and lactic acid production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in batch and membrane bioreactor: influence of yeast extract and tryptone enrichment. *Biotechnology Letters*, 19(8), 709-714.

Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Applied Energy*, *198*, 77-87.

Park, W., Hyun, S. H., Oh, S. E., Logan, B. E., & Kim, I. S. (2005). Removal of headspace CO<sub>2</sub> increases biological hydrogen production. *Environmental science & technology*, *39*(12), 4416-4420.

Passeggi, M., López, I., & Borzacconi, L. (2012). Modified UASB reactor for dairy industry wastewater: performance indicators and comparison with the traditional approach. *Journal of Cleaner Production*, *26*, 90-94.

Patel, S. K., Kumar, P., Mehariya, S., Purohit, H. J., Lee, J. K., & Kalia, V. C. (2014). Enhancement in hydrogen production by co-cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *39*(27), 14663-14668.

Pattra, S., Lay, C. H., Lin, C. Y., Sompong, O., & Reungsang, A. (2011). Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*. *international journal of hydrogen energy*, *36*(14), 8697-8703.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D. M., Borzacconi, L., Varesche, M. B., Zaiat, M., Etchebehere, C. (2013). Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy*. *38*(1):54-62.

Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., ... & Steyer, J. P. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing biohydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, *38*(12), 4975-4985.

Ramírez-Morales, J. E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Science and Technology*, *71*(9), 1271-1285.

Ren, N. Q., & Gong, M. L. (2006). Acclimation Strategy of a Biohydrogen Producing Population in a Continuous-Flow Reactor with Carbohydrate Fermentation. *Engineering in Life Sciences*, *6*(4), 403-409.

Ren, N., Xing, D., Rittmann, B. E., Zhao, L., Xie, T., & Zhao, X. (2007). Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1112-1125.

Rittmann, B. E., & McCarty, P. L. (2001). *Environmental biotechnology: principles and applications*. Tata McGraw-Hill Education

Ruggeri, B., Tommasi, T., & Sanfilippo, S. (2015). *BioH<sub>2</sub> & BioCH<sub>4</sub> Through Anaerobic Digestion: From Research to Full-scale Applications*. Springer.

Saady, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38(30):13172-13191.

Savino, F., Cordisco, L., Tarasco, V., Locatelli, E., Di Gioia, D., Oggero, R., & Matteuzzi, D. (2011). Antagonistic effect of Lactobacillus strains against gas-producing coliforms isolated from colicky infants. *BMC microbiology*, 11(1), 157.

Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(2):262-280

Seol, E., Kim, S., Raj, S. M., & Park, S. (2008). Comparison of hydrogen-production capability of four different Enterobacteriaceae strains under growing and non-growing conditions. *international journal of hydrogen energy*, 33(19), 5169-5175.

Si, B., Liu, Z., Zhang, Y., Li, J., Xing, X. H., Li, B., ... & Lu, H. (2015). Effect of reaction mode on biohydrogen production and its microbial diversity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(8), 3191-3200.

Shiyan, S. P., & Krishnaveni, M. (2013). Hydrogen production by Pseudomonas stutzeri JX442762 isolated from thermal soil at Mettur power station, Salem district, Tamil Nadu, India. *Journal of Pharmacy Research*, 6(1), 112-116.

Sikora, A., Błaszczyk, M., Jurkowski, M., & Zielenkiewicz, U. (2013). Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: on purpose or by coincidence?. In *Lactic acid bacteria-R & D for food, health and livestock purposes*. InTech.

Singh, L., & Wahid, Z. A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: a review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 70-80.

Siriwongrungron, V., Zeng, R. J., & Angelidaki, I. (2007). Homoacetogenesis as the alternative pathway for H<sub>2</sub> sink during thermophilic anaerobic degradation of butyrate under suppressed methanogenesis. *Water research*, 41(18), 4204-4210.

Sivagurunathan, P., Sen, B., & Lin, C. Y. (2014). Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. *international journal of hydrogen energy*, 39(33), 19232-19241.

Sivagurunathan, P., Kumar, G., Park, J. H., Park, J. H., Park, H. D., Yoon, J. J., & Kim, S. H. (2016). Feasibility of enriched mixed cultures obtained by repeated batch transfer in continuous hydrogen fermentation. *International journal of hydrogen energy*, 41(7), 4393-4403.

Song, J., An, D., Ren, N., Zhang, Y., & Chen, Y. (2011). Effects of pH and ORP on microbial ecology and kinetics for hydrogen production in continuously dark fermentation. *Bioresource technology*, 102(23), 10875-10880.

Song, Z. X., Li, W. W., Li, X. H., Dai, Y., Peng, X. X., Fan, Y. T., & Hou, H. W. (2013). Isolation and characterization of a new hydrogen-producing strain *Bacillus* sp. FS2011. *international journal of hydrogen energy*, 38(8), 3206-3212.

Schwartz, E., Fritsch, J., & Friedrich, B. (2013). H<sub>2</sub>-metabolizing prokaryotes. In *The Prokaryotes* (pp. 119-199). Springer Berlin Heidelberg.

Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J. E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., ... & Lin, C. Y. (2015a). Biohydrogen production by dark fermentation: Scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(4), 761-785.

Tapia-Venegas, E., Cabrol, L., Brandhoff, B., Hamelin, J., Trably, E., Steyer, J. P., & Ruiz-Filippi, G. (2015b). Adaptation of acidogenic sludge to increasing glycerol concentrations for biohydrogen production. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(19), 8295-8308.

Tebbe, C. C., Dohrmann, A. B., Hemkemeyer, M., & Näther, A. (2017). Microbial community profiling: SSCP and T-RFLP techniques. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Microbial Quantitation, Community Profiling and Array Approaches*, 101-126.

Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2006). Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *Journal of applied microbiology*, 101(2), 331-343.

Wang, Y., Mu, Y., & Yu, H. Q. (2007). Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges. *International journal of hydrogen energy*, 32(8), 1086-1094.

Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *International journal of hydrogen energy*, 34(2), 799-811.

Wang, Q., Wang, C. D., Li, C. H., Li, J. G., Chen, Q., & Li, Y. Z. (2015). *Clostridium luticellarii* sp. nov., isolated from a mud cellar used for producing strong aromatic liquors. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4730-4733.

Wongtanet, J., Sang, B. I., Lee, S. M., & Pak, D. (2007). Biohydrogen production by fermentative process in continuous stirred-tank reactor. *International journal of green energy*, 4(4), 385-395.

Woodward, J., Cordray, K. A., Edmonston, R. J., Blanco-Rivera, M., Mattingly, S. M., & Evans, B. R. (2000). Enzymatic hydrogen production: conversion of renewable resources for energy production. *Energy & fuels*, 14(1), 197-201.

Wu, C. C., Johnson, J. L., Moore, W. E. C., & Moore, L. V. H. (1992). Emended descriptions of *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella veroralis*, and *Prevotella melaninogenica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(4), 536-541.

Wu, S. Y., Hung, C. H., Lin, C. Y., Lin, P. J., Lee, K. S., Lin, C. N., ... & Chang, J. S. (2008). HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1542-1549.

Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D. J., & Jiang, W. J. (2006). Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community. *Process Biochemistry*, 41(10), 2118-2123.

Zhang, S., Lee, Y., Kim, T. H., & Hwang, S. J. (2013). Effects of OLRs and HRTs on hydrogen production from high salinity substrate by halophilic hydrogen producing bacterium (HHPB). *Bioresource technology*, 141, 227-232.

## ANEXO I

## ANEXO I: Reporte de la pasantía realizada en el LBE, INRA,

Narbonne, Francia.

### INFLUENCE OF C/N RATIO ON BIOHYDROGEN-PRODUCING SYSTEM AT HIGH ORGANIC LOADING RATE

Lucía Braga<sup>1,2,4</sup>, Antonio Djalma Nunes Ferraz Júnior<sup>1,3</sup>, Clemence Pages<sup>1</sup>, Elena Castelló<sup>4</sup>, Claudia Etchebehere<sup>2</sup>, Eric Trably<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne F-11100, France.

<sup>2</sup> Biological Reserch Institute “Clemente Estable”, Av. Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup> Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, Polo II de Alta Tecnologia, Campinas, São Paulo 13083 – 970, Brazil.

<sup>4</sup> Faculty of Engineering, University of the Republic (UDELaR), Av. Julio Herrera Y Reissig 565, 11200, Montevideo, Uruguay.

#### Introduction

Hydrogen has been accepted as the ideal source of energy alternative to fossil fuels. This interesting energy carrier, due to its inherit characteristics has been proposed as the fuel of the future (Das et al., 2008). Hydrogen has the major quantity of energy per mass unit ( $143 \text{ GJ ton}^{-1}$ ) than any other fuel until now known, besides its combustion only produces water (Boyles, 1984; Benemann, 1996). The use of hydrogen as an energy carrier has many applications, it could be use as fuel for transport, central or distributed electricity and it does not produce acid rain neither destroys the ozone layer (Kapdan & Kargi, 2006). There are several methods to produce hydrogen. The conventional methods involve the utilization of fossil fuels or the application of high amounts of electrical energy, so they are not environmentally friendly (Lee et al., 2011). However, it is biologically possible to generate hydrogen; this process is sustainable and clean. Among the biological hydrogen production methods, there is the biophotolysis reactions, photofermenatation and microbial anaerobic fermentation of organic matter or dark fermentation. The last

mentioned method seems to be the more advantageous one. Dark fermentation does not need the supply of light energy and is possible to use carbohydrate-rich waste as a substrate for bio-hydrogen production. Besides, the hydrogen yield and the rate of hydrogen production obtained in this method are higher comparing to the other methods (Balachandar et al., 2013).

However, the biological production of hydrogen via dark fermentation is a promising technology, the stability of the process and high hydrogen yields are difficult to achieve (Carrillo – Reyes, 2013; Saady, 2013). Hydrogen production is highly affected for several factors. Such as: the type of reactor (Contreras - Dávila et al., 2017, Bárcenas - Ruiz et al., 2016, Anzola - Rojas et al., 2016, Intanoo et al., 2015), hydraulic retention time (HRT) (Ottaviano et al., 2016, Kumar et al., 2014) organic loading rate (OLR) (Krishnan et al., 2016, Nunes Ferraz Júnior et al., 2014), inoculum and pre-treatments (Mohan et al., 2008, Carrillo – Reyes et al., 2014, Cisneros – Pérez et al., 2015), temperature (Lázaro et al., 2014) and pH (De Gionanis et al., 2014, Zagrodnick & Laniecki et al., 2017), even exposure to sunlight can affect the hydrogen production process (Zagrodnick & Laniecki et al., 2016). Besides operational conditions, the wastewater used as substrate and the media composition significantly affects biological hydrogen production and yield (Dávila – Vazquez et al., 2011), since microorganisms depend on the availability of organic carbon, macro and micronutrients for their growth and metabolic activity. Therefore, the composition of the media would affect significantly, which microbial metabolic pathway would be more or less active, thus influencing the main metabolites produced by the microbial community (Mandigan 2013, Oztekin et al., 2008).

Nitrogen is a very important macronutrient for the living organisms; it is an essential block of the nucleic acids and proteins backbone (Mandigan 2013). Consequently, the content of nitrogen in the substrate as well as in the mineral media used in the hydrogen production process would have an impact on the selected microbial community. Most of the reports published about the effect of the carbon/nitrogen (C/N) ratio on the hydrogen production use a synthetic wastewater as substrate. Liu & Lay found that a C/N ratio of 47 was the optimal for hydrogen production. This condition seems to enhance the ability of the microbiota to process the sucrose, whereas Anzola – Rojas et al., 2015 found that a C/N ratio of 137 (by mathematical approximation) was the ideal for hydrogen production with the same substrate but with a different reactor configuration. Peixoto et al., 2011 and Argun et al., 2008 found that a higher concentration of nitrogen would lead

to excessive cell growth and low hydrogen yield. However, there is a minimal concentration of nitrogen required for enzyme and microbial growth. Oztenic et al., 2008 proposed that  $N/C > 0,02$  would shift the microbial metabolism into excessive biomass growth and reduced hydrogen yield, while  $N/C < 0,02$  would limited microbial growth and enzyme synthesis. Cheong & Hansen, 2007 found that the C/N ratio employed in their work had no influence in the hydrogen yield (C/N= 30 vs C/N= 12,5). Nevertheless, all this studies give an insight on the influence of the C/N ratio on the hydrogen production is important to determine the effect of this parameter on a real wastewater, in order to make this process more rentable and scalable. This kind of substrate that can be used for hydrogen production might have its own concentration of nitrogen, hence its own C/N ratio, which would have an effect on the hydrogen producing process. For instance, rice straw had been reported to have a C/N ratio of 40,65 (Alemadhi et al., 2015). The C/N ratio of cheese whey from two italian cheese making factories, one that produced cheese from a mixture of cow milk and sheep milk and another that produced mozzarella from cow milk, was 5,3 and 12,3, respectively (De Gionanis, et al., 2014). On the other hand, another report for hydrogen production using raw cheese whey, had a C/N ratio of 21,1 (Castelló et al., 2009). Sugarcane vinasses had a similar C/N ratio= 21,4 (Nunes Ferraz Júnior et al., 2014). Organic fraction of municipal waste (OFMW) had been reported to have C/N of 32,7 (Elsamadony & Tawfik, 2015), whereas pulp and paper mill had been reported to have a C/N ratio of 128 (Hey, et al. 2015) and vinasse from tequila a C/N ratio of 114, 4 (Buitrón & Carbajal, 2014).

In the present study we tested the effect of the C/N ratio on hydrogen production in a CSTR reactor using sugarcane molasses as a substrate. We used the C/N ratio of the sugarcane molasses without nitrogen supplementation (C/N=20) and sugarcane molasses supplemented with nitrogen, so that the C/N ratio was 10 times reduced (C/N=2).

## **Materials and Methods**

Two different conditions of C/N ratio were assessed in this work in order to evaluate the influence of this parameter in the bio-hydrogen production from sugarcane molasses. Four CSTR reactors were operated in the following conditions:

### ***Inoculum and substrate***

The inoculum for this experience came from the outlet of a CSTR reactor that was operated for 45 days. This reactor was fed with molasses and the C/N ratio=20 during the whole operation.

The outlet of the reactor was frozen at -20°C until further use. One day before the operation of each reactor began; 2 L of the previously stored outlet was placed in a 37°C room overnight (ON) for defrosting.

Sugarcane molasses were used as substrate, with a COD=21g/L. Micronutrients were added in the following concentrations (mg/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (33,4), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (21,75), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (8,5), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (22,5), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (5), FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,25), CaCl<sub>2</sub> (47,5), NH<sub>4</sub>Cl (1,7), CoCl<sub>2</sub> (8), SeO<sub>2</sub> (0,07) (Del Nery, 1987).

### ***Experimental Set Up***

Four CSTR reactors were operated in two different conditions as follows: Condition 1: C/N ratio= 20, using molasses as substrate with no nitrogen supplementation and condition 2: C/N ratio= 2, with the same concentration of substrate and urea (N<sub>2</sub>CH<sub>4</sub>O, 46% of nitrogen) as nitrogen supplementation (Table A). The C/N ratios were calculated based in the % of C content of sucrose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, 42,1% de C) and % of N content of molasses (0,555g/L) and urea.

The HRT was of 6 hours, pH and temperature 5,5 and 37°C, respectively. These parameters were maintained constant during the whole time of operation.

Table 1: Conditions of the Experimental set up.

Condition	gCOD/L	gUrea/L	C/N ratio
1	21	0	20
2	21	18,22	2

### ***Analytical Methods***

The total solids (TS) and volatile suspended solids (VSS) were determined by filtering the outlet of the reactor by 0,47mm filter (Millipore), dry in 105°C oven O.N. and then ignited for 1 hour in 550°C oven.

The production of biogas was measured using a Milligascounter gas meter (Ritter®) or a device made of a pressure gauge. The pressure gauge was connected to a peristaltic pump. When the pressure in the reactor reached 1,2 bar, the peristaltic pump went automatically on releasing biogas, until the pressure in the reactor reached 0,760 bar. Every 30 seconds the pump went on, 50 mL of biogas were released. The activity of the peristaltic pump was registered by an online system.

The composition of the generated biogas was determined by gas chromatography (Gas Chromatographer Perkin Clarus 580), equipped with a thermal conductivity detector (TCD). The conditions of the analysis were: manual injector heated at 250 °C, TCD heated at 150°C, two capillary columns heated at 60°C (RtUbond column for the detection and quantification of CO<sub>2</sub> and RtMolsieve column used for the detection and quantification of O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>). Argon was used as carrier gas (pressure 350 kPa and flow rate 31.8 ml.min<sup>-1</sup>).

Some samples were analysed by high performance liquid chromatograph (HPLC), which allowed to detect and quantify the volatile fatty acids (VFAs), ethanol, 1,3-propanediol and remnant sugars, present in these samples. This chromatograph is composed of an automatic sampler (Water 717), a pre-column to filter residues (Micro guard cation H refill cartridges, Bio-rad) and an Aminex HPX-87H column (300 mm on 7.8 mm, Bio-rad) at 35°C. The carrier liquid used is sulfuric acid at 4 mM, 0.4 ml.min<sup>-1</sup>.

### ***Molecular analysis***

DNA extraction: The samples for molecular analysis of the bacterial community were obtained by centrifugation. Two millilitres of the outlet of the reactor were centrifuged during 15 minutes at maximum speed (13400rpm). The obtained pellet was frozen with liquid nitrogen and conserved at -80°C until further use.

The total genomic DNA of the samples was extracted using the FastDNA® SPIN kit for soil of MP Biomedicals.

PCR: After the total genomic DNA was obtained from selected samples, a PCR reaction, was performed in order to amplify the region V3 of the 16S rRNA gene for bacteria using the general primers W104F and W49R (Braun et al., 2011). Briefly, the PCR mixture used for the amplification was made with 18,25 uL of molecular grade water, 2,5 uL of 10X *Pfu* buffer, 2,0 uL of dNTPs mixture, 400nM of each primer and 0,625U

of PfuTurbo DNA Polymerase (Stratagene) (Saur et al., 2016). The *hydA* genes were amplified using the set of primers W234F and W273R. The PCR mixture had some differences from the one of the amplification of the V3 region of the 16s RNAr gene of bacteria, 17,25 uL of molecular grade water was used, and 500 nM of each primer. The 10X Pfu buffer, dNTPs mixture and PfuTurbo DNA Polymerase were added in the same quantities as the previous PCR mixture described (Quéméneur et al., 2011).

CE-SSCP: The resulting PCR fragments were analysed by Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP). For this analysis, 1uL of the diluted PCR product (100 to 400 fold) was added to 18 uL of formamide and 1 uL of the internal size standard ROX 400 HD (Applied Biosystems, CA), previously diluted 10 fold. Every sample were denatured at 94°C for 5 minutes and then cooled on ice for 5 min. The CE-SSCP analysis of the samples was carried out in an ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) equipped with four 50-cm capillary tubes filled with 5.6% conformation analysis polymer (Applied Biosystems) in the corresponding buffer and 10% glycerol. For every sample for the analysis of the 16S RNAr gene the electrophoretic run was performed at 15 kV and 32°C for 30 minutes, while for every sample to analysed the *hydA* community the run took 64 minutes (Braun et al., 2011, Quéméneur et al., 2011).

## Results

### *Reactors Performance*

The main produced gases by all the reactors were hydrogen and CO<sub>2</sub>. Some traces of methane were also produced. The volumetric hydrogen production rate (VHPR), maximum and average, and the hydrogen yield (HY) of every reactor are described in table 2.

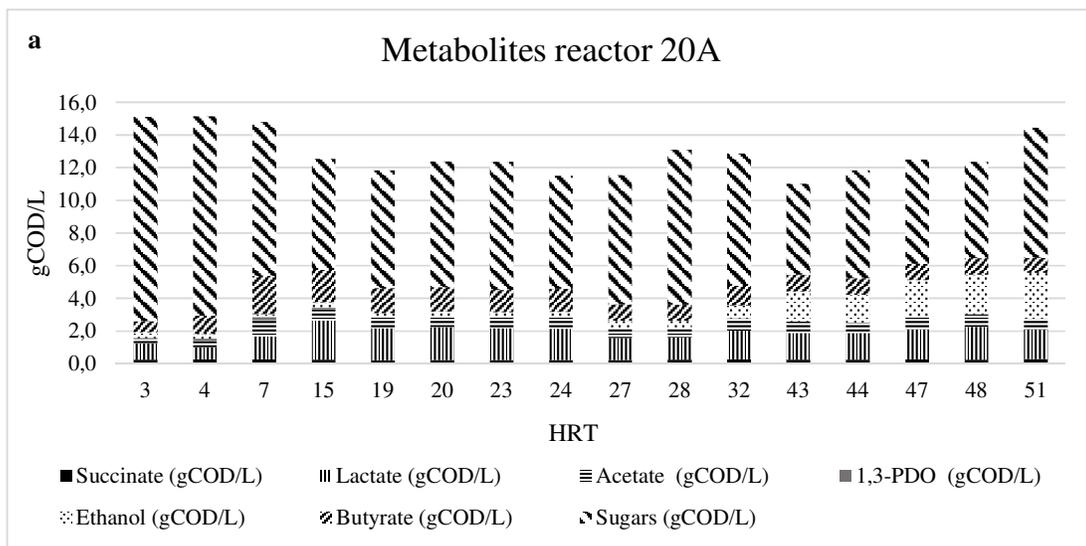
Reactor 20-B presented a better VHPR among all the reactors. This reactor had a C/N ratio of 20, although reactor 20-A has the same C/N ratio, the VHPR was lower. On the other hand Reactor 2-A and 2-B, that had the same C/N ratio (C/N=2) had different VHPR. However the yield of this reactors is pretty similar 0,1 mol H<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> sucrose equivalent inlet for reactor 2 and 0,2 mol H<sub>2</sub>.mol<sup>-1</sup> sucrose equivalent inlet.

Table 2 – Volumetric Hydrogen Production Rate (VHPR) and Hydrogen Yield (HY) of all the operations.

Reactor	C/N ratio	VHPRmax <sup>a</sup>	VHPRaverage <sup>a</sup>	HYmax <sup>b</sup>	HYaverage <sup>b</sup>
20A	20	1,9	1,1	0,3	0,2
20B	20	8,2	1,9	1,2	0,3
2A	2	3,9	1,2	0,4	0,1
2B	2	2,5	1,2	0,4	0,2

a – expressed as  $\text{LH}_2 \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}_{\text{reactor}}$ , b – expressed as  $\text{mol H}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{ sucrose equivalent inlet}$ . The produced metabolites were analysed in some samples of reactor 20A and 2A, but there was no possible to continue analysing the metabolites of all the samples because the samples were not appropriate for the HPLC analysis conditions.

The main produced organic acids were lactate, butyrate, acetate and succinate. Ethanol and 1,3-propanediol was also produced, for both reactors (Fig. 1 a and b).



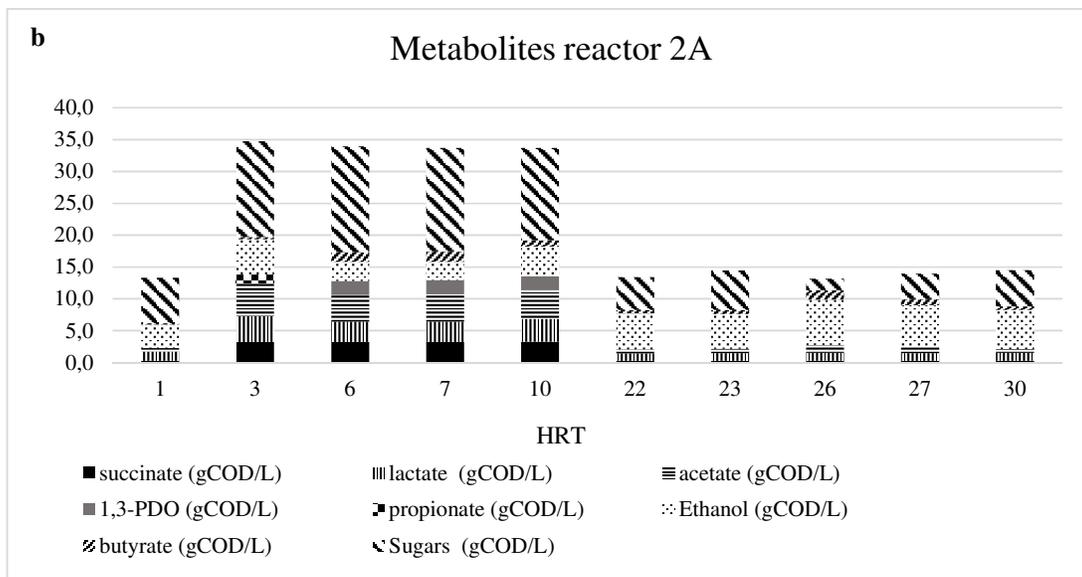


Fig 1. Metabolites produce by reactor 20A (a) and 2A (b). Both reactor produced metabolites as butyrate, acetate, lactate, succinate, ethanol and 1,3-PDO, although propionate was only detected in Reactor 2A.

Reactor 20A was operated during 90 HRT. It was inoculated with the outlet of an hydrogen producing reactor feed with molasses, the content of solids of this inoculum was 1,2 gSST.L<sup>-1</sup>. At the end of the operation content of solids was higher reaching 2,2 gSST.L<sup>-1</sup>.

The biogas production was measured with a Milligascounter gas meter (Ritter®). The maximum volumetric hydrogen production rate (table 2) had reached its peak at 13 HRT, after the hydrogen production went down. This circumstance could be attributed to the fact that there was a leakage in the NaOH-adding peristaltic pump, which may lead some air entered to the reactor. Therefore, all the tubes were checked and changed, and the reactor was flushed for 10 minutes with N<sub>2</sub> to ensure an anaerobic environment inside the reactor.

Reactor 20B was operated during 80 HRT. It was inoculated with 1,7 gSST.L<sup>-1</sup>. At the end of the operation the content of solids was 2,5 gSST.L<sup>-1</sup>.

The production of hydrogen started later in this reactor; this could be attributed to the fact that there was a leak in the reactor, what allowed air entered to the system, so that the environment was not anaerobic at the beginning of the operation. This was solved the second day of operation, when the reactor was sealed and flushed with nitrogen for 10 minutes. The biogas production was measure with a pressure gauge connected to a

peristaltic pump. The pump went on when the pressure inside the reactor, which was detected by the pressure gauge, reached 1,2 bar. If the pressure was 1,2 bar or more the peristaltic pump started realising gas until the pressure in the reactor was 0,760 bar. An online system registered when the pump was on and when it was off. The production of hydrogen started during 5 HRT – 6 HRT.

Reactor 2A was operated for 76 HRT. The content of solids in the inoculum for this reactor was of 1,1 gSST.L<sup>-1</sup>. The solid content of the reactor at the end of operation was 1,7 SST.L<sup>-1</sup>. The biogas monitored was made with the same method as the reactor 20B.

Reactor 2B was operated during 126 HRT. The inoculum's solids content of this reactor was 1,3 gSST.L<sup>-1</sup> and at the end of the operation the solid content was 1,1 gSST.L<sup>-1</sup>.

The biogas production was measure with a Milligascounter gas metter from Ritter®, as well as the reactor 20A.

A SSCP study was done in order to study the microbiological community of all the reactor.

### ***Microbiological analysis***

In order to analyse the microbial community of the reactors, a SSCP study was performed to some samples of the four hydrogen productive reactors.

However, this analysis give some information about the diversity of the microbial community within the reactors along time and between the different operations, we think is necessary to do a further study of the microbial community. Studying the behaviour of the microbial community would lead to have a better insight of the influence of the C/N ratio on the microbiota of the reactor and consequently in the reactor's hydrogen production yield and stability.

### **SSCP of the bacterial community**

The microbial community of the four reactors operated was analysed by SSCP. The dendogram in figure 2 shows the difference between the reactors community and the evolution of every reactor's microbial community along the time of operation. In figure 3 the dendogram is represented as an histogram.

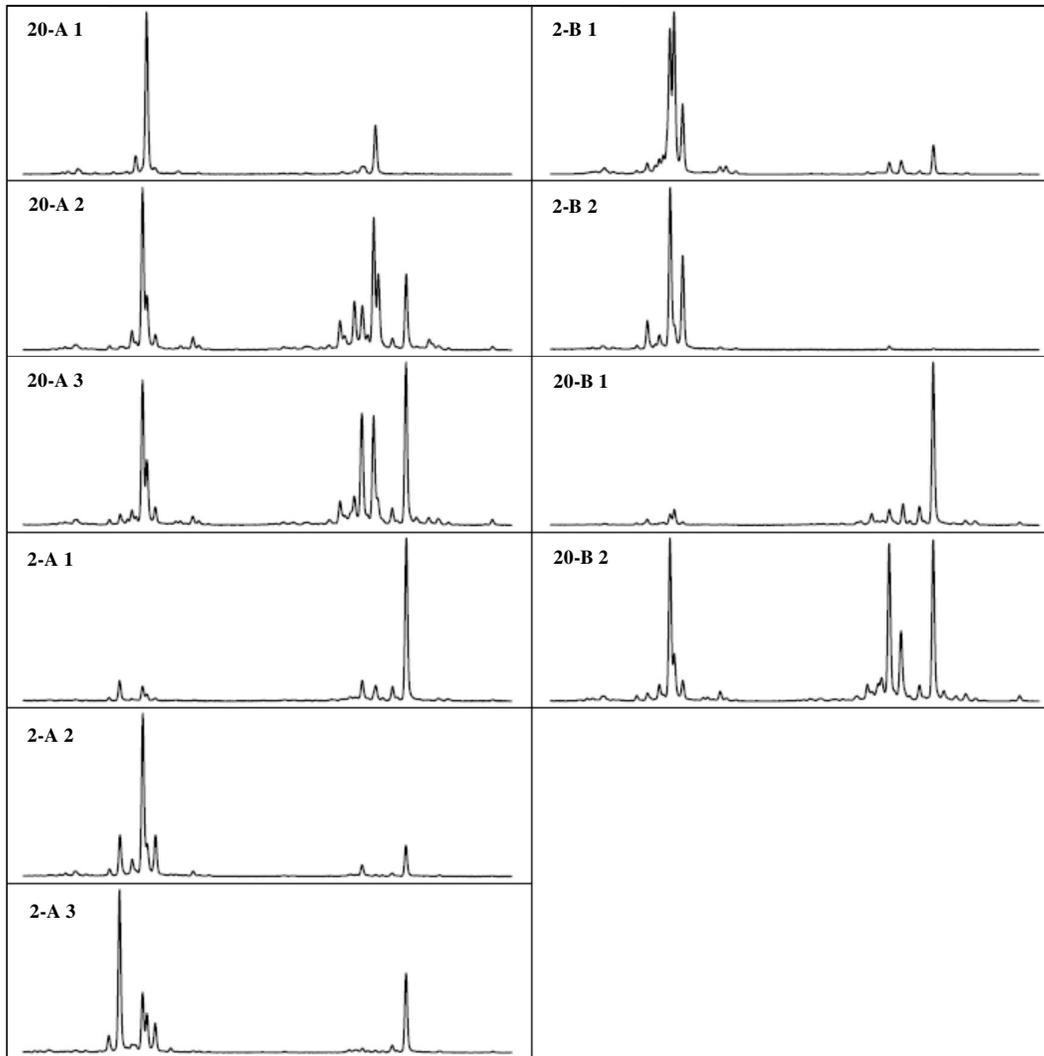


Fig 2 – SSCP dendrogram of the bacterial community of the different operated reactors. Although, there were few samples analysed in all the time of operation of the four reactors, was possible to observe a difference between the bacterial communities of the reactors along the operation time. For the reactor 20A samples analysed belong to HRT 3 (1), 16 (2) and 65 (3), for the reactor 2A were sampler from HRT 3 (1), 29 (2) y 64 (3). For reactors 2B and 20B only two samples were analysed, HRT 9 (1) and 43 (2) for reactor 2-B HRT 1 (1) and 22 (2) for reactor 20-B.

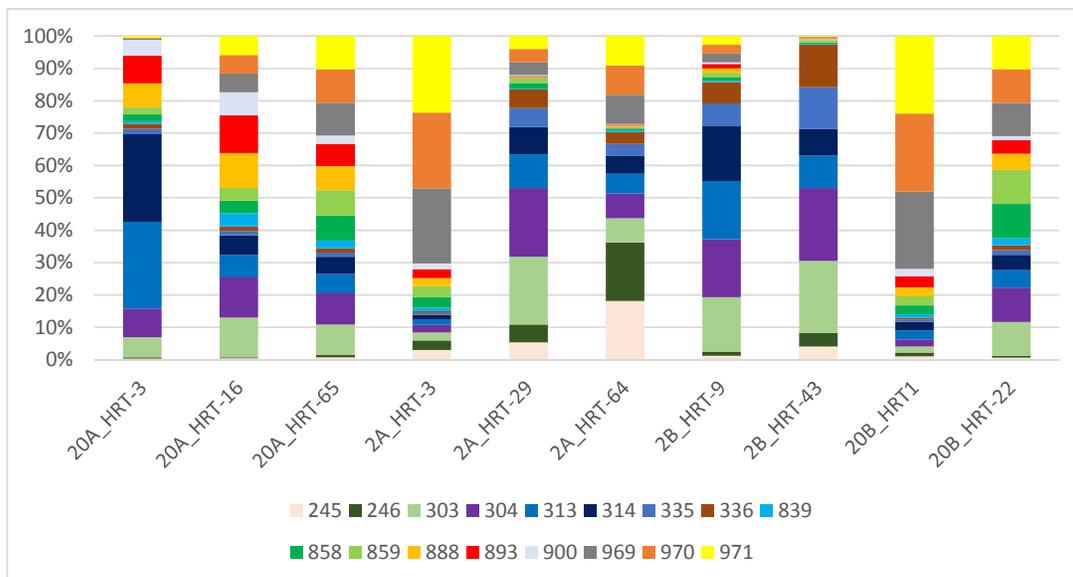


Fig 3. Histogram of the peaks presented in the samples analysed by SSCP. Differences between the communities of the reactors along time could be observed.

Analyses of principal components was performed for the SSCP analysis of the bacterial community (Fig 4). The PC1 explain the 47% of the variation of the community, and the PC2 explains the 27% of the variation of the samples. Although, some of the differences between samples was explain with this analysis, the pattern was not very clear. This could be attributed to the fact that the quantity of samples analysed was few given the time of operation of the reactors. Further microbial community analysis has to be done, in order to explain the differences in the hydrogen production between the operations.

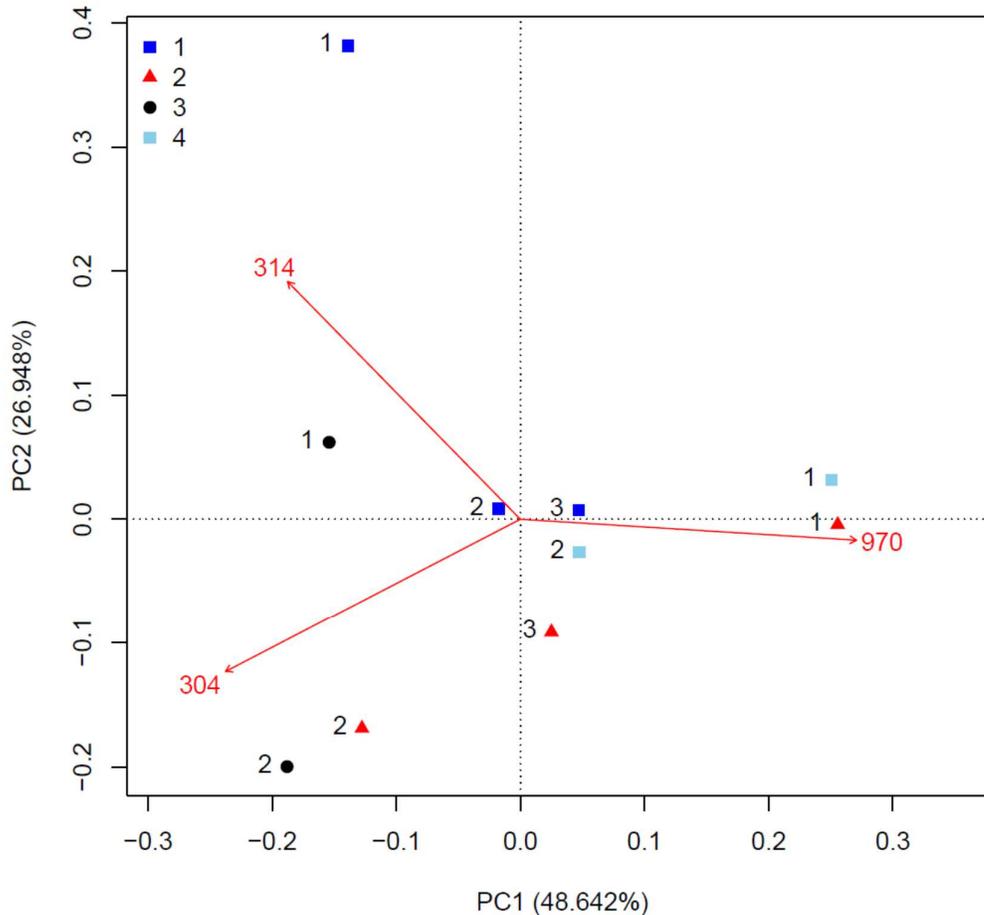


Fig 4. Principal components analysis of the bacterial community for all the reactors operated. The blue square correspond to the samples of the reactor 20A, number 1, 2 and 3 correspond to the samples taken at HRT 3, 16 and 65 respectively. The red triangle symbolises samples for the reactor 2A, samples were taken at HRT 3 (1), 29 (2) y 64 (3). Samples from reactor 2B were represented with the black dot, HRT 9 (1) and 43 (2); whereas samples from reactor 20B were signalised with the sky-blue square, number 1 correspond to the HRT 1 and number 2 to the HRT 22.

SSCP of the *hydA* community

A SSCP was performed in order to analysed the *hydA* gene presence within the microbial community. The samples analysed where the same as the ones analysed for the bacterial community (Fig 5 y 6).

The presence of bacteria with the *hydA* gene was detected along all the operations of the reactors, this is consistent with the continuous hydrogen production.

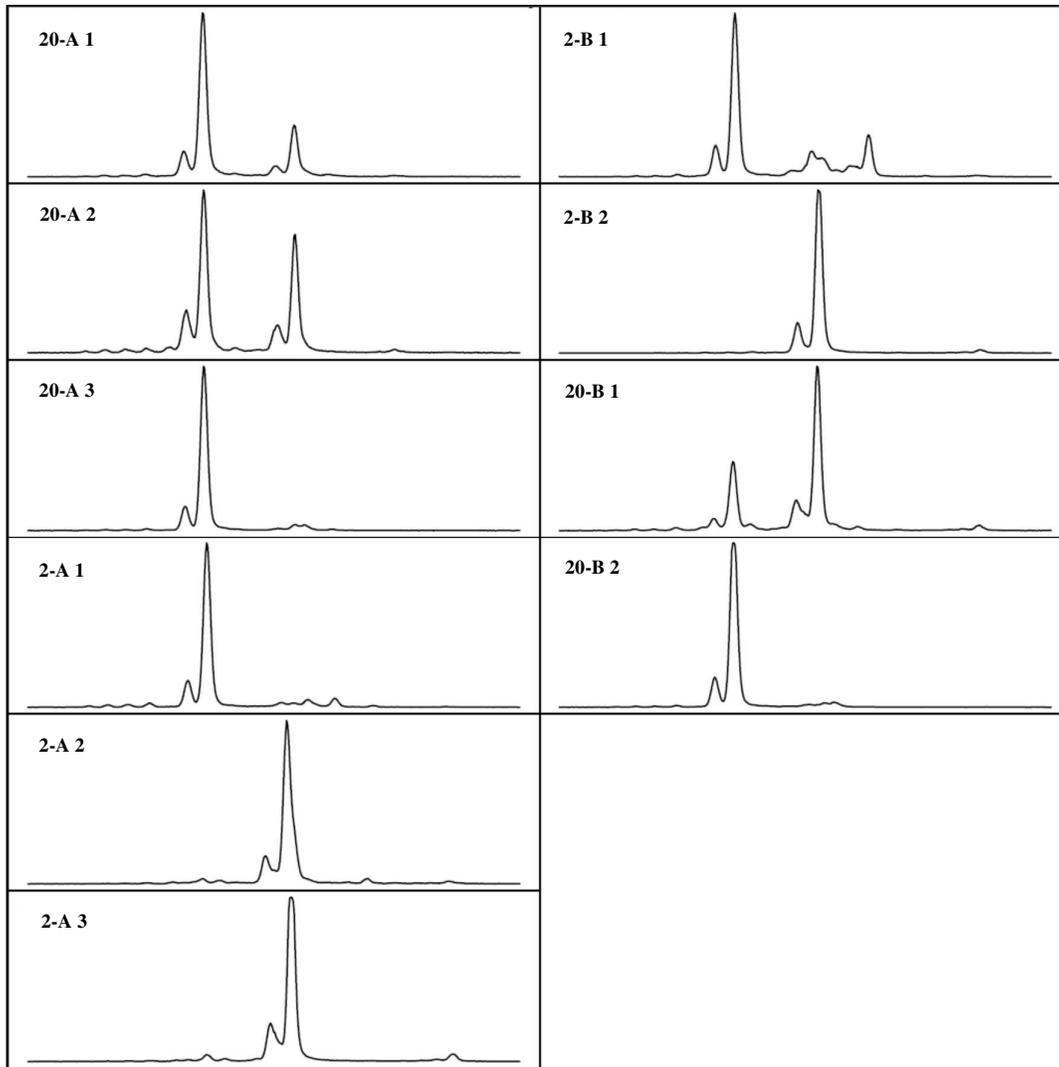


Figure 5. Dendrogram of the samples analysed by SSCP of the *hydA* gene of the bacterial community. The *hydA* gene was detected in every operation, along all the time of operation. Samples for reactor 20A were taken at HRT 3 (1), 16 (2) and 65 (3), for the reactor 2A were taken from HRT 3 (1), 29 (2) y 64 (3). For reactors 2B and 20B two samples were analysed, HRT 9 (1) and 43 (2) for reactor 2-B and HRT 1 (1) and 22 (2) for reactor 20B.

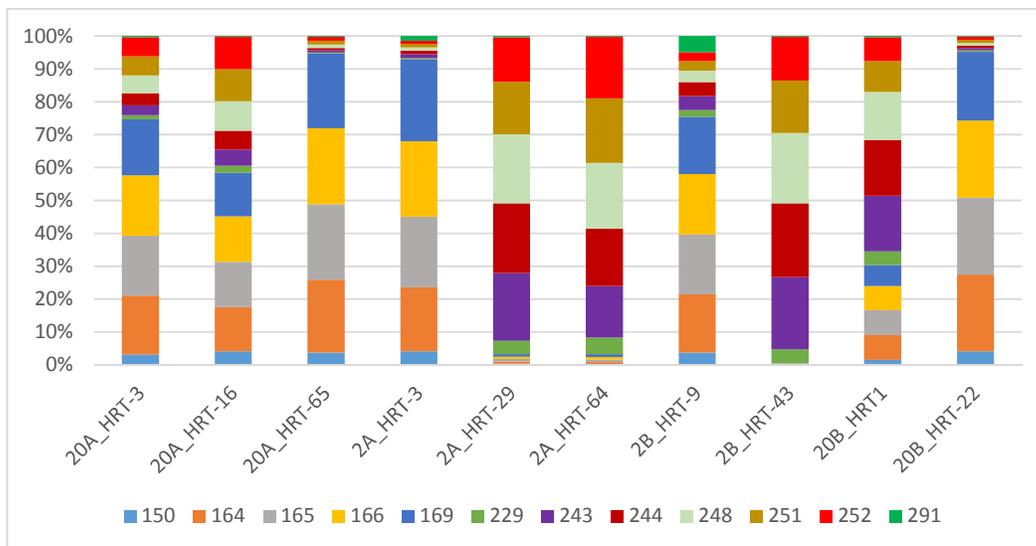


Figure 6 – Histogram representing the SSCP analysis results for the *hydA* gene presence in the bacterial community. The samples of 20A HRT 3, 2A HRT 3 had the same peak dominance (peaks 164, 165, 166, 169 are dominant) this is consistent with the same inoculum origin. Although, these reactors had been operated with a different nitrogen concentration in the feed. It seems that the C/N ratio might not affect the microbial community in the first HRT of operations. Further studies should be done in order to evaluate if this preliminary result.

As well as for the bacterial community, a principal components analysis (PCA) was performed for the SSCP of the *hydA* gene study (figure 7). The PC1 explained the 76% of the variance of the samples while the PC2 explained the 11% of the variance of the samples. The PCA showed that the samples that were taken at HRT 3 from both reactors, 20A and 2A, are quite similar. However, the dendrogram and histogram (figure 5 and figure 6) shows that the sample from the reactor 2B taken at HRT 9 was quite similar to these samples, it did not grouped with them, although the difference between these samples was 11%.

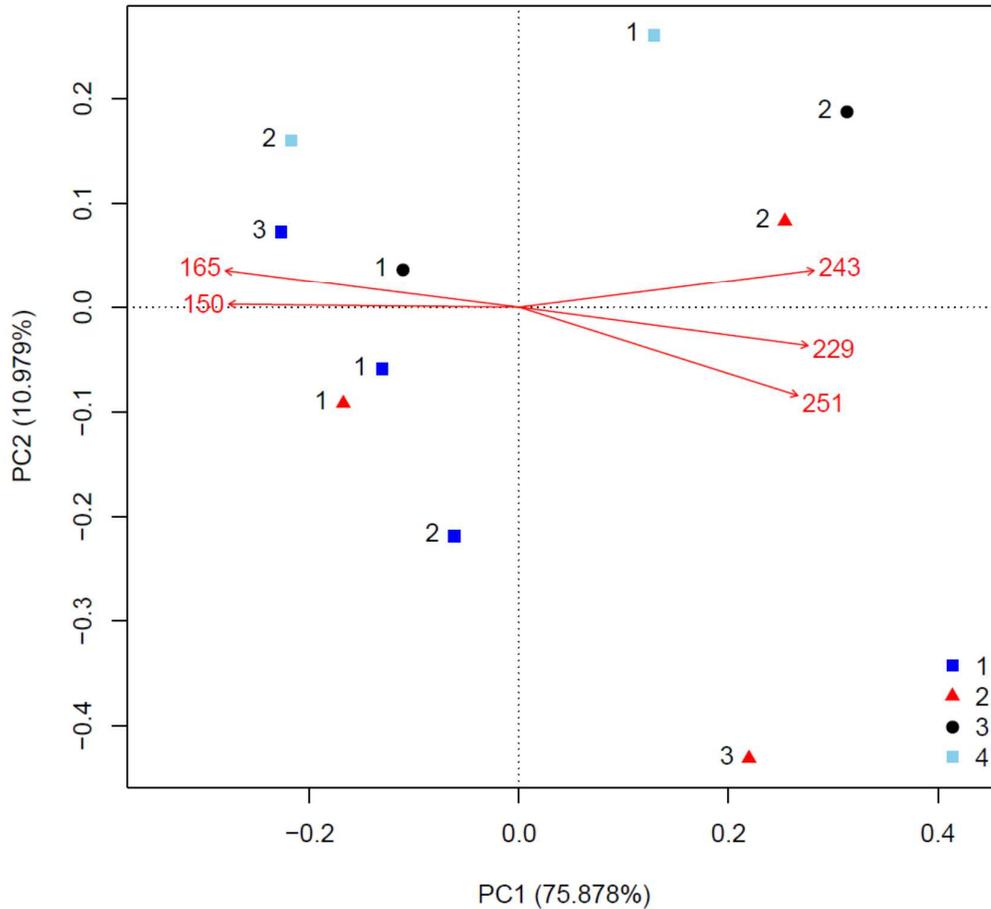


Figure 7 – Principal component analysis of the *hydA* community. As well as for the bacterial community analysis, the blue square symbolised the samples of the reactor 20A, that were taken at HRT 3, 16 and 65, represented with the numbers 1, 2 and 3, respectively. Samples for reactor 2A were represented with the red triangle and the numbers 1 for the sample taken at HRT 3, 2 for the sample taken at HRT 29, and 3 for the sample taken at HRT 64. The black dot symbolises the samples from reactor 2B, HRT 9 (1) and 43 (2); while the ski-blue square indicates samples that were taken from reactor 20B, number 1 correspond to the HRT 1 and number 2 to the HRT 22.

However, these analyses showed that the microbial community changed along the time of operation in all the reactors, analysis of further samples is required to reach a conclusion about the effect of the C/N ratio on the bacterial community.

In the next figures is shown which samples could be suitable for molecular analysis of the microbial community. These figures showed the biogas production of every reactor (figure 8, 9, 10 and 11). The blue arrows show, at which HRT of operation the microbial

community analysis should be performed, based on the periods of high VHPR and in the periods where the VHPR was low.

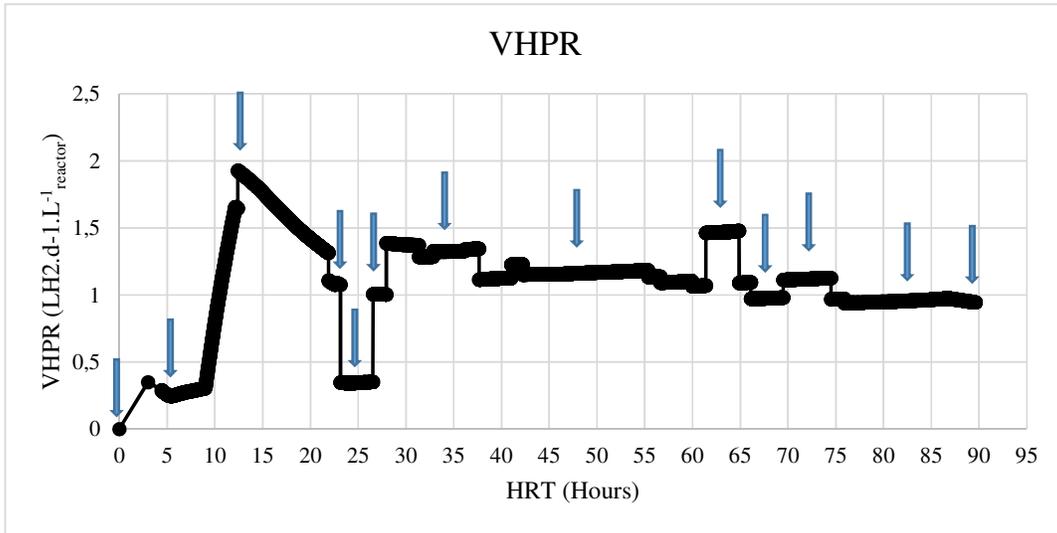


Figure 8 - Biogas production of the reactor 20A. The microbial community analysis should be done at HRT: 0, 5, 13, 23, 25, 28, 34, 48, 63, 68, 73, 83 and 90.

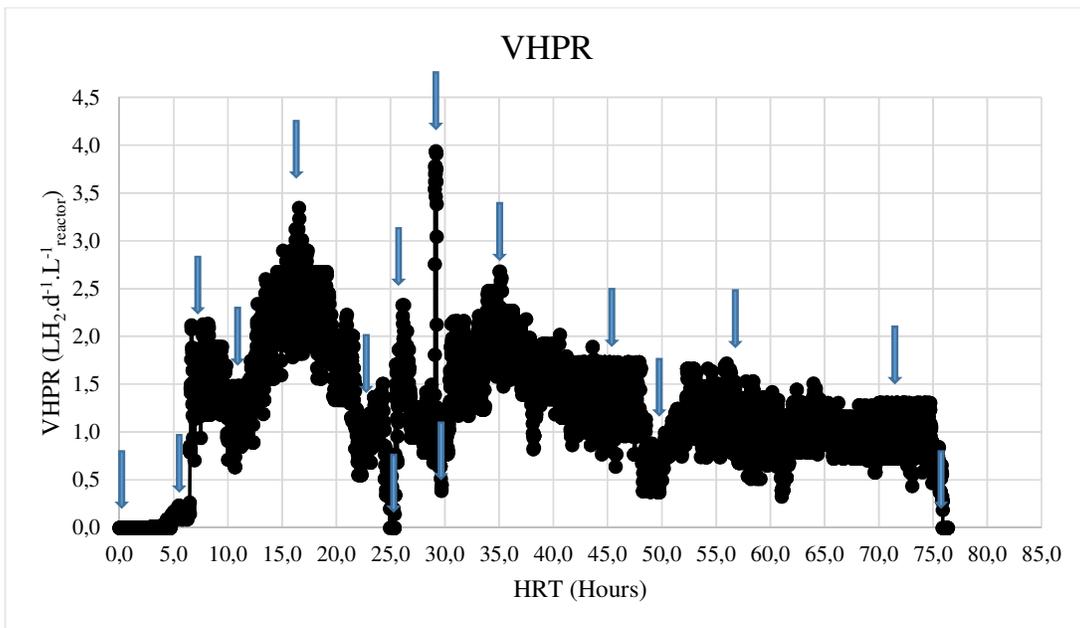


Figure 9 - Biogas production of the reactor 2A. HRT 0, 6, 8, 10, 17, 22, 25, 26, 29, 30, 35, 46, 50, 57, 72 and 76, are suggested for microbial community analysis.

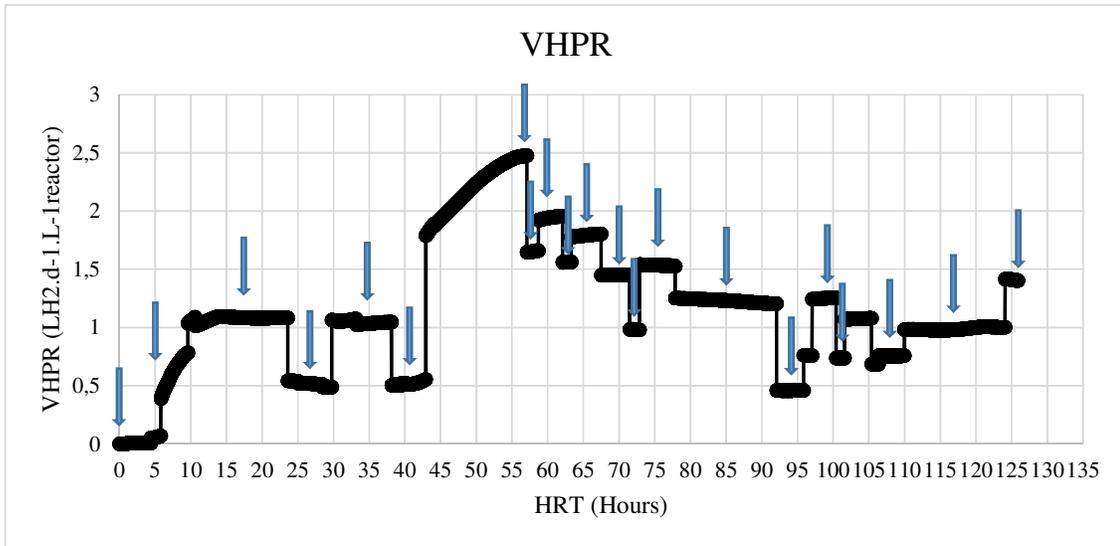


Figure 10 – Biogas production of the reactor 2B. Based on the periods of high and low hydrogen production the HRT chosen for microbial community analysis are: 0, 5, 17, 27, 34, 40, 57, 58, 61, 63, 71, 73, 76, 85, 94, 100, 101, 108, 118, 120 and 126.

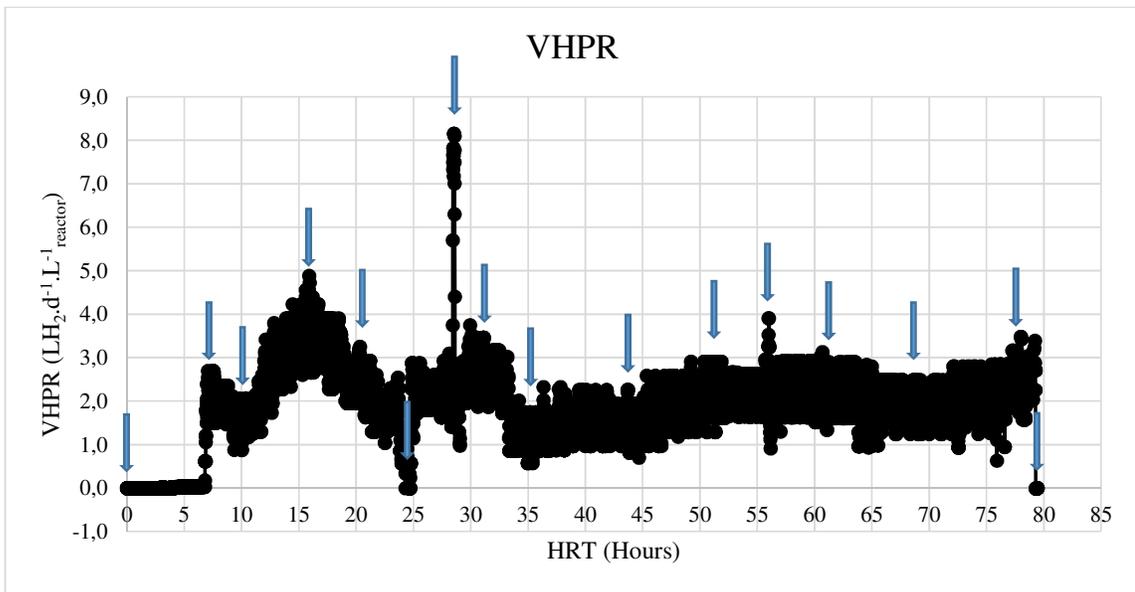


Figure 10 – Biogas production of the reactor 20B. The HRT suggested for analysis of the microbial community are: 0, 8, 10, 16, 20, 25, 29, 32, 36, 44, 52, 56, 62, 69, 78 and 79.

## Bibliography

Alemahdi, N., Man, H. C., Nasirian, N., & Yang, Y. 2015. Enhanced mesophilic biohydrogen production of raw rice straw and activated sewage sludge by co-digestion. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40 (46), 16033-16044.

Anzola-Rojas, M. d. P., da Fonseca, S. G., da Silva, C. C., de Oliveira, V. M., & Zaiat, M. 2015. The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnology Reports*, 5, 46-54.

Anzola-Rojas, M. d. P., Zaiat, M., & De Wever, H. 2016. Improvement of hydrogen production via ethanol-type fermentation in an anaerobic down-flow structured bed reactor. *Bioresource technology*, 202, 42-49.

Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K., & Oztekin, R. 2008. Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate. *International Journal of Hydrogen energy*, 33(7), 1813-1819.

Balachandar, G., Khanna, N., & Das, D. 2013. Biohydrogen production from organic wastes by dark fermentation. *Biohydrogen. Burlington, MA: Elsevier*, 103-144.

Bárcenas-Ruiz, C. D., Carrillo-Reyes, J., Arellano-García, L., Celis, L. B., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. 2016. Pretreatment and upward liquid velocity effects over granulation in hydrogen producing EGSB reactors. *Biochemical Engineering Journal*, 107, 75-84.

Benemann J. 1996 Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Natural Biotechnology*. 14(9):1101-1103.

Boyles, D., 1984. Bio-energy Technology – Thermodynamics and Costs. John Wiley & Sons, N.Y., pp. 8–13.

Braun, F., Hamelin, J., Gévaudan, G., & Patureau, D. 2011. Development and application of an enzymatic and cell flotation treatment for the recovery of viable microbial cells from environmental matrices such as anaerobic sludge. *Applied and environmental microbiology*, 77(24), 8487-8493.

- Buitron, G., Kumar, G., Martinez-Arce, A., & Moreno, G. 2014. Hydrogen and methane production via a two-stage processes (H<sub>2</sub>-SBR+ CH<sub>4</sub>-UASB) using tequila vinasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(33), 19249-19255.
- Carrillo Reyes, J. 2013. Producción de hidrógeno en reactores de biomasa fija, implicaciones de microorganismos hidrogenotróficos. Tesis de Doctorado.
- Carrillo-Reyes J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., Montoya, L., Razo-Flores, E. 2014 Strategies to cope with methanogens in hydrogen producing UASB reactors: Community dynamics. *International Journal of Hydrogen Energy*. 39(22):11423-11432.
- Castelló, E., García y Santos, C., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C. 2009. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*. 34(14):5674-5682.
- Cheong, D. Y., & Hansen, C. L. 2007. Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. *Bioresource technology*, 98(11), 2229-2239.
- Cisneros-Pérez, C., Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., Etchebehere, C., & Razo-Flores, E. 2015. Inoculum pretreatment promotes differences in hydrogen production performance in EGSB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(19), 6329-6339.
- Contreras-Dávila, C. A., Méndez-Acosta, H. O., Arellano-García, L., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. 2017. Continuous hydrogen production from enzymatic hydrolysate of Agave tequila bagasse: Effect of the organic loading rate and reactor configuration. *Chemical Engineering Journal*, 313, 671-679.
- Das, D., & Veziroglu, T. N. 2008. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046-6057.
- Dávila-Vázquez, G., de León-Rodríguez, A., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. 2011. The buffer composition impacts the hydrogen production and the microbial community composition in non-axenic cultures. *Biomass and bioenergy*, 35(7), 3174-3181.

- De Gioannis, G., Friargiu, M., Massi, E., Muntoni, A., Poletti, A., Pomi, R., & Spiga, D. 2014. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(36), 20930-20941.
- Elsamadony, M., & Tawfik, A. 2015. Potential of biohydrogen production from organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) using pilot-scale dry anaerobic reactor. *Bioresource technology*, 196, 9-16.
- Hay, J. X. W., Wu, T. Y., Juan, J. C., & Jahim, J. M. 2015. Improved biohydrogen production and treatment of pulp and paper mill effluent through ultrasonication pretreatment of wastewater. *Energy Conversion and Management*, 106, 576-583.
- Intanoo, P., Chaimongkol, P., & Chavadej, S. 2016. Hydrogen and methane production from cassava wastewater using two-stage upflow anaerobic sludge blanket reactors (UASB) with an emphasis on maximum hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(14), 6107-6114.
- Júnior, A. D. N. F., Wenzel, J., Etchebehere, C., & Zaiat, M. 2014. Effect of organic loading rate on hydrogen production from sugarcane vinasse in thermophilic acidogenic packed bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(30), 16852-16862.
- Kapdan, I. K., & Kargi, F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and microbial technology*, 38(5), 569-582.
- Krishnan, S., Singh, L., Sakinah, M., Thakur, S., Wahid, Z. A., & Ghrayeb, O. A. 2017. Role of organic loading rate in bioenergy generation from palm oil mill effluent in a two-stage up-flow anaerobic sludge blanket continuous-stirred tank reactor. *Journal of Cleaner Production*, 142, 3044-3049.
- Kumar, G., Park, J. H., Kim, M. S., Kim, D. H., & Kim, S. H. 2014. Hydrogen fermentation of different galactos eeglucose compositions during various hydraulic retention times (HRTs). *Int J Hydrogen Energy*, 39(20625), e31.
- Lazaro, C. Z., Perna, V., Etchebehere, C., & Varesche, M. B. A. 2014. Sugarcane vinasse as substrate for fermentative hydrogen production: The effects of temperature and substrate concentration. *international journal of hydrogen energy*, 39(12), 6407-6418.
- Lee, D. J., Show, K. Y., & Su, A. 2011. Dark fermentation on biohydrogen production: pure culture. *Bioresource technology*, 102(18), 8393-8402.

- Lin, C. Y., & Lay, C. H. 2004. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(1), 41-45.
- Madigan, M. T., Clark, D. P., Stahl, D., & Martinko, J. M. 2010. *Brock Biology of Microorganisms 13th edition*. Benjamin Cummings.
- Mohan, S., Mohanakrishna, G., Sarma P. N. 2008. Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33(9):2156-2166
- Ottaviano, L. M., Ramos, L. R., Botta, L. S., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. 2017. Continuous thermophilic hydrogen production from cheese whey powder solution in an anaerobic fluidized bed reactor: Effect of hydraulic retention time and initial substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(8), 4848-4860.
- Oztekin, R., Kapdan, I. K., Kargi, F., & Argun, H. 2008. Optimization of media composition for hydrogen gas production from hydrolyzed wheat starch by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(15), 4083-4090.
- Peixoto, G., Saavedra, N. K., Varesche, M. B. A., & Zaiat, M. 2011. Hydrogen production from soft-drink wastewater in an upflow anaerobic packed-bed reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(15), 8953-8966.
- Quemeneur, M., Hamelin, J., Latrille, E., Steyer, J. P., & Trably, E. 2011. Functional versus phylogenetic fingerprint analyses for monitoring hydrogen-producing bacterial populations in dark fermentation cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(6), 3870-3879.
- Rochex, A., Godon, J. J., Bernet, N., & Escudié, R. 2008. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water Research*, 42(20), 4915-4922.
- Saady, N. M. C. 2013. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*. 38(30):13172-13191.

Saur, T., Escudié, R., Santa-Catalina, G., Bernet, N., & Milferstedt, K. 2016. Conservation of acquired morphology and community structure in aged biofilms after facing environmental stress. *Water research*, 88, 164-172.

Zagrodnik, R., & Laniecki, M. 2016. An unexpected negative influence of light intensity on hydrogen production by dark fermentative bacteria *Clostridium beijerinckii*. *Bioresource technology*, 200, 1039-1043.

Zagrodnik, R., & Łaniecki, M. 2017. The effect of pH on cooperation between dark-and photo-fermentative bacteria in a co-culture process for hydrogen production from starch. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(5), 2878-2888.

## **ANEXO II**

## ANEXO II: Resúmenes presentados en Congresos

All.1 – Resumen presentado en el II Encuentro de Jóvenes Microbiólogos,  
Montevideo, Uruguay, 2016.

### ***Desarrollo de método de determinación de actividad homoacetogénica en muestras de reactores de biohidrógeno***

*Braga, Lucía<sup>1, 2</sup>; Castelló, Elena<sup>2</sup>; Etchebehere, Claudia<sup>1</sup>*

*[luciabraganan@gmail.com](mailto:luciabraganan@gmail.com) <sup>1</sup> – Laboratorio de Ecología Microbiana – BIOGEM – Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable – MEC*

*<sup>2</sup> – Laboratorio de Biotecnología y Procesos del Ambiente – IIQ – Facultad de Ingeniería – UdelaR*

El hidrógeno es una alternativa energética limpia y sustentable. Un mecanismo de producción de hidrógeno amigable con el ambiente es la fermentación oscura, proceso que forma parte de la cadena de degradación anaerobia. Mediante la cadena de degradación anaerobia los microorganismos transforman la materia orgánica a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Para obtener hidrógeno por este mecanismo es necesario evitar el último paso de la cadena, que es el consumo de hidrógeno por metanogénesis y homoacetogénesis. Hasta el momento la mayoría de los trabajos de producción de hidrógeno se enfocaron a evitar su consumo por metanogénesis. Se ha logrado impedir la misma mediante diferentes tratamientos del inóculo y distintos parámetros de operación de los reactores, pero no se ha logrado la estabilidad del proceso a largo plazo. Se considera que la homoacetogénesis podría ser una de las causas de inestabilidad y ha sido muy poco estudiada. Las bacterias homoacetogénicas son anaerobias estrictas que pueden producir acetato a partir de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Teniendo en cuenta estas características estamos desarrollando una técnica que permita evaluar la actividad homoacetogénica de biomasa de reactores hidrogenogénicos. El método consiste en la incubación de lodo de un reactor hidrogenogénico con una mezcla de gases de H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 80/20, que le servirá como fuente de carbono y energía. Se evalúa la disminución del volumen de esta mezcla gaseosa a lo largo del tiempo. El test se está poniendo a punto utilizando una cepa homoacetogénica de *Acetobacterium woodii* y una muestra de lodo tomada de un reactor hidrogenogénico. Se determinó la composición del gas mediante cromatografía gaseosa y la producción de ácidos orgánicos por HPLC. Como resultados preliminares hemos obtenido en la muestra del reactor hasta un 15% de disminución del volumen total de la mezcla gaseosa, con producción de acetato, dando indicios de actividad homoacetogénica en estas muestras.

**¿Es la homoacetogénesis la principal causa de inestabilidad en reactores de mezcla completa (CSTR) productores de H<sub>2</sub>?**

Lucía Braga<sup>1</sup>, Vanesa Rostán<sup>1</sup>, Clara Reino<sup>1</sup>, Laura Fuentes<sup>2</sup>, Elena Castelló<sup>1</sup>, Claudia Etchebehere<sup>2</sup>

1-Laboratorio de Ingeniería de Reactores, Facultad de Ingeniería, UdelaR. 2- Ecología Microbiana, Departamento de Bioquímica y Genómica Bacteriana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC.

El H<sub>2</sub> es un combustible limpio que se puede producir de manera biológica, mediante fermentación de materia orgánica por microorganismos anaerobios. La eficiencia del proceso depende de la prevalencia de los microorganismos productores de H<sub>2</sub> sobre los competidores y los consumidores del mismo. Modificando varios parámetros de operación en reactores hidrogenogénicos se ha logrado evitar la metanogénesis, pero no la homoacetogénesis. Ambos procesos consumen H<sub>2</sub> y bajan el rendimiento de producción. Se ha reportado que la homoacetogénesis predomina en reactores con densidad celular (DC) alta. La DC de un CSTR es proporcional al tiempo de residencia celular (TRC).

Nuestro objetivo fue relacionar la homoacetogénesis con la inestabilidad de producción de H<sub>2</sub> en CSTR operados a diferentes TRC. Se operaron tres CSTR a TRC 6,10 y 24 horas. Se inocularon con lodo metanogénico, tratado térmicamente. El lodo tratado fue aclimatado mediante operación semi-batch, con alimentación sintética a base de glucosa (15gDQO/L). Para la operación en modo continuo su concentración fue 30gDQO/L. Los CSTR se operaron por 20 TRC, pH y temperatura constantes (5,5 y 37°C, respectivamente). Se monitoreó la producción de biomasa, de ácidos orgánicos y de H<sub>2</sub>. La comunidad microbiana fue analizada por T-RFLP del gen del ARNr de 16S realizado a partir del ADN y del ARN (ADNc). Los homoacetógenos se cuantificaron mediante q-PCR del gen de la THFS. La producción de H<sub>2</sub> fue inestable en todas las operaciones. No se encontró una correlación entre los períodos de baja producción de H<sub>2</sub> y la presencia de microorganismos homoacetogénicos. Este resultado es concordante con las concentraciones de acetato encontradas en las operaciones. El metabolito mayormente producido, fue el lactato, por lo que la producción inestable de H<sub>2</sub> podría deberse a la competencia de los microorganismos productores de H<sub>2</sub> con bacterias lácticas y no a la prevalencia de bacterias homoacetogénicas.

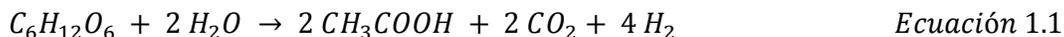
## **ANEXO III**

## Anexo III

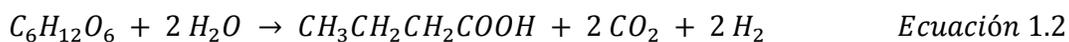
### AIII – Referencia de ecuaciones

#### AIII.1 – Introducción

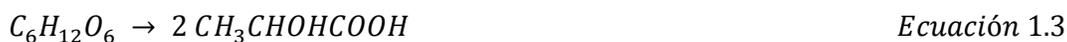
##### Fermentación acética



##### Fermentación butírica



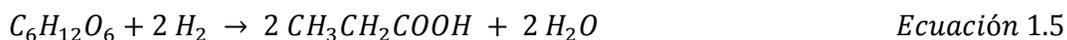
##### Fermentación láctica homofermentativa



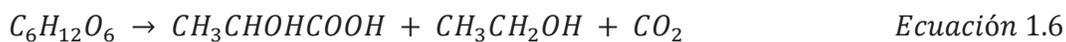
##### Fermentación alcohólica



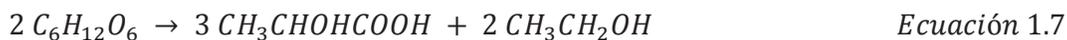
##### Fermentación propiónica



##### Fermentación láctica heterofermentativa



##### Fermentación bífida



Relación entre el H<sub>2</sub> producido y los ácido acético y butíricos producidos por fermentación acética, butírica o ácido – mixta

$$\frac{H_2}{HAc + HBu} = 2 \quad \text{Ecuación 1.8}$$

## AIII.2 – Materiales y Métodos

Balance de electrones

$$DQO_E \left( \frac{gDQO}{d} \right) = DQO_S \left( \frac{gDQO}{d} \right) \quad \text{Ecuación 2.1}$$

$$DQO_E \left( \frac{gDQO}{d} \right) = \text{Glucosa de entrada} \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

$$\begin{aligned} DQO_S \left( \frac{gDQO}{d} \right) = & \text{Lactato} \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + \text{Acetato} \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + \text{Butirato} \left( \frac{gDQO}{L} \right) \\ & * v_{op} + \text{Propionato} \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + \text{OTROS} \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + H_2 \left( \frac{gDQO}{d} \right) \\ & + \text{glucosa remanente} \left( \frac{gDQO}{L} \right) * v_{op} + \text{Biomasa} \left( \frac{gDQO}{L} \right) \\ & * v_{op} \end{aligned} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

$$H_2 \left( \frac{gDQO}{d} \right) = v_{H_2} \left( \frac{LH_2}{d} \right) * DH_2 \left( \frac{gH_2}{LH_2} \right) * FC_{H_2} \left( \frac{gO_2}{gH_2} \right) \quad \text{Ecuación 2.4}$$

$$DQO_E \left( \frac{gDQO}{d} \right) * 8 = e^-_E \left( \frac{e^-}{d} \right) \quad \text{Ecuación 2.5}$$

$$DQO_S \left( \frac{gDQO}{d} \right) * 8 = e^-_S \left( \frac{e^-}{d} \right) \quad \text{Ecuación 2.6}$$

$$e^-_E \left( \frac{e^-}{d} \right) = e^-_S \left( \frac{e^-}{d} \right) \quad \text{Ecuación 2.7}$$

$$e^-_E \left( \frac{e^-}{d} \right) = 100\% \quad \text{Ecuación 2.8}$$

$$\% e^-_S = \% e^-_{\text{Lactato}} + \% e^-_{\text{Acetato}} + \% e^-_{\text{Butirato}} + \% e^-_{\text{Propionato}} + \% e^-_{\text{OTROS}} + \% e^-_{H_2} +$$

$$\% e^-_{\text{Glucosa remanente}} + \% e^-_{\text{Biomasa}} \quad \text{Ecuación 2.10}$$

$$100 - \% e^-_S = \% \text{ de electrones no determinados} \quad \text{Ecuación 2.11}$$

### AIII.3 – Resultados

Cálculo del H<sub>2</sub> que se pudiera haber producido en base a la producción de ácido acético y ácido butírico detectados (H<sub>2</sub> estequiométrico)

$$H_2 \text{ esteq.} = 2 \times \left( HAc \left( \frac{\text{mol}}{d} \right) + HBu \left( \frac{\text{mol}}{d} \right) \right) - HPr \left( \frac{\text{mol}}{d} \right) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Rendimiento estequiométrico

$$RH_2 \text{ esteq.} = \frac{H_2 \text{ esteq.} \left( \frac{\text{mol}}{d} \right)}{\text{Glucosa consumida} \left( \frac{\text{mol}}{d} \right)} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Relación entre el H<sub>2</sub> experimental y la producción de ácido butírico y ácido acético

$$\frac{H_2 \text{ experimental} \left( \frac{\text{mol}}{d} \right)}{\left( HAc \left( \frac{\text{mol}}{d} \right) + HBu \left( \frac{\text{mol}}{d} \right) \right)} = 2 \quad \text{Ecuación 3.3}$$

### AIII.4 – Discusión

Balance de sólidos

$$m_{SSV,t1} = m_{SSV,t0} + m_{SSV,E} - m_{SSV,S} + m_{SSV,gen} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$m_{SSV,E} \approx 0$$

$$(X_{SSV,t1} - X_{SSV,t0})V_R + \sum_{t_0}^{t_1} X_{SSV,S} * v = m_{SSV,gen} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Cálculo del porcentaje de acetato producido por homoacetogénesis

$$HAc \text{ total} = HAc \text{ a} + HAc \text{ b} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

$$HAc \text{ b} = \left( \frac{1}{6} \right) \times (2x (HAc \text{ total} + HBu) - HPr - H_2) \quad \text{Ecuación 4.4}$$

$$\%Homoacetogénesis = \frac{HAc\ b}{HAc\ total} \times 100$$

*Ecuación 4.5*