



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS

# Aislamiento y caracterización de microorganismos extremófilos de reactores de producción de hidrógeno

María Inés Etchelet

Claudia Etchebehere, Laura Fuentes  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Laboratorio de Ecología Microbiana, IIBCE

Noviembre 2019

# Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis tutoras Claudia y Laura por darme la oportunidad de ser parte del proyecto y del grupo de trabajo y por guiarme durante todo el proceso con mucha paciencia y disposición. También agradecer a todos mis compañeros de laboratorio por el buen ambiente de trabajo y el constante apoyo. En especial, me gustaría agradecer a Patricia, Victoria, Mariangeles, Djalma y Angie por haberme hecho sentir parte desde el principio y darme una mano siempre que lo necesité.

A mi familia por acompañarme y apoyarme durante todo el camino. En especial a mi madre por esperarme siempre con buena onda y algo rico para comer.

A mis compañeros de facultad por haber hecho que el pasaje por la facultad fuera tan divertido y enriquecedor. A todos mis amigos, en especial a mis amigas de la vida Flo, Belén, Vicky, Emi y Sofi por estar siempre.

A Patxi por ser mi compañero y siempre darme para adelante. También agradecer a Tere, Tito, Magui, Gonzalo y Jose por su apoyo.

¡Gracias a todxs!

# Índice

Resumen .....	6
Introducción .....	7
El hidrógeno como combustible.....	7
Procesos de producción de H <sub>2</sub> .....	7
Fermentación oscura.....	8
Bioquímica de la producción biológica de H <sub>2</sub> .....	10
Microbiología de la fermentación oscura .....	12
Microorganismos productores de H <sub>2</sub> .....	12
Bacterias anaerobias estrictas formadoras de esporas.....	12
Bacterias anaerobias estrictas no formadoras de esporas.....	12
Bacterias anaerobias facultativas .....	13
Cultivos puros o mixtos.....	13
Microorganismos desfavorables para la producción de H <sub>2</sub> .....	13
Metanogénesis .....	14
Homoacetogénesis .....	14
Producción de propionato.....	14
Reducción de sulfato .....	14
Microorganismos no productores que contribuyen a la producción de H <sub>2</sub> .....	15
Consumo de oxígeno.....	15
Regulación del pH .....	15
Otras formas de contribución.....	15
Bacterias ácido lácticas.....	16
Microorganismos subdominantes.....	16
Estudio de las comunidades microbianas.....	16
Factores que influyen sobre la producción de H <sub>2</sub> .....	17
Temperatura.....	17
pH.....	18
Configuración del reactor .....	19
Producción de H <sub>2</sub> por fermentación oscura a partir de desechos.....	20
Vinaza de caña de azúcar como sustrato de la fermentación oscura.....	20
Objetivo general .....	21
Objetivos específicos .....	22
Materiales y métodos .....	22
Muestras y reactores .....	22

Reactor termófilo .....	22
Reactor acidófilo.....	23
Aislamiento de los microorganismos .....	23
Aislamiento a partir de muestras del reactor termófilo .....	23
Aislamiento a partir de muestras del reactor acidófilo.....	26
Caracterización filogenética de los aislamientos .....	27
Crecimiento en condiciones extremas de temperatura y pH de los aislamientos.....	28
Estudio de la capacidad de producir H <sub>2</sub> de los aislamientos .....	28
Análisis de la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S .....	29
Resultados.....	30
Aislamiento y caracterización filogenética de los microorganismos .....	30
Aislamientos del reactor termófilo .....	30
Aislamientos del reactor acidófilo.....	32
Crecimiento en condiciones extremas y análisis de la producción de H <sub>2</sub> de los aislamientos .....	34
Aislamientos del reactor termófilo .....	34
Aislamientos del reactor acidófilo.....	35
Análisis de la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S .....	35
Discusión .....	40
Aislamiento a partir de muestras del reactor termófilo.....	40
Efectividad de las técnicas de aislamiento aplicadas.....	40
Características de los aislamientos obtenidos .....	40
Crecimiento en condiciones extremas y análisis de producción de H <sub>2</sub> de los aislamientos .....	41
Análisis de la comunidad microbiana de muestras del reactor termófilo mediante secuenciación masiva del gen del ARNr 16S.....	42
Diversidad microbiana detectada .....	42
Efecto de los microorganismos sobre el desempeño del reactor.....	44
Producción de ácido láctico .....	44
Producción de ácido propiónico.....	45
Efecto del material de soporte interno del reactor sobre la comunidad microbiana.....	46
Comparación de los microorganismos aislados con la comunidad microbiana detectada mediante secuenciación masiva .....	47
Aislamiento a partir de muestras del reactor acidófilo .....	47
Efectividad de las técnicas de aislamiento aplicadas.....	47

Características de los aislamientos obtenidos .....	48
Comparación de los microorganismos aislados con la comunidad microbiana detectada mediante secuenciación masiva .....	48
Crecimiento en condiciones extremas y producción de H <sub>2</sub> de los aislamientos .....	49
Conclusiones .....	50
Bibliografía.....	51

# Resumen

El hidrógeno ( $H_2$ ) es considerado un vector de energía con futuro prometedor por su rol como fuente de energía efectiva, limpia y renovable, representando una alternativa a los combustibles fósiles. Actualmente la gran mayoría del  $H_2$  se produce a partir de combustibles fósiles, pero para que el  $H_2$  sea un combustible limpio y sustentable debe provenir de procesos que minimicen o eviten las emisiones de  $CO_2$ , tales como los procesos biológicos, entre los que se destaca la fermentación oscura. Dado que la operación exitosa de cualquier reactor de producción de  $H_2$  por fermentación oscura depende del desempeño de los microorganismos presentes en el sistema, el conocimiento sobre la comunidad microbiana es vital para la optimización del proceso.

En una colaboración entre el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE e investigadores de la Escuela de Ingeniería de Sao Carlos de Brasil, se estudió en nuestro laboratorio las comunidades microbianas de dos reactores de producción de  $H_2$  operados en condiciones extremas: uno fue operado a pH 3 (reactor acidófilo) y el otro a alta temperatura ( $70^\circ C$ ) (reactor termófilo). El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar los microorganismos presentes en estos dos reactores y determinar su posible rol dentro de la comunidad microbiana.

En el caso del reactor termófilo, se aplicaron las técnicas de dilución hasta extinción, siembra directa y enriquecimiento y posterior siembra en placa para aislar microorganismos anaerobios, aerobios y bacterias ácido lácticas. Estos mismos grupos de microorganismos se aislaron en el caso del reactor acidófilo utilizando dilución hasta extinción con y sin tratamiento térmico y posterior siembra en placa y siembra directa. Una vez aislados los microorganismos se caracterizaron por secuenciación del gen del ARNr 16S y se estudió su capacidad de crecimiento y producción de  $H_2$  en condiciones extremas de temperatura o pH. Además, se analizó la comunidad microbiana del reactor termófilo mediante la secuenciación masiva del gen del ARNr 16S.

Se obtuvieron 27 aislamientos del reactor termófilo, entre los que se destacaron los géneros *Thermoanaerobacterium* y *Lactobacillus*, y 31 aislamientos del reactor acidófilo, destacándose los géneros *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Cutibacterium*. Los aislamientos correspondientes a los géneros *Thermoanaerobacterium* y *Clostridium* fueron capaces de producir  $H_2$  en condiciones extremas de temperatura y pH, respectivamente. El análisis de la comunidad microbiana mostró que esta estuvo compuesta por microorganismos encontrados frecuentemente en sistemas de producción de  $H_2$ . La comparación con los resultados de los aislamientos mostró que se logró aislar únicamente una parte de la comunidad microbiana.

La caracterización de los microorganismos que componen la comunidad microbiana responsable de la producción de  $H_2$  permitió inferir sobre sus roles, generando conocimiento para entender el funcionamiento de los reactores y crear estrategias de operación adecuadas para una buena producción de  $H_2$ .

# Introducción

## El hidrógeno como combustible

En la actualidad existe la necesidad de buscar fuentes de energía alternativas limpias y renovables, ya que por más de un siglo se han explotado los combustibles fósiles al punto de provocar graves problemas ambientales y agotamiento de las reservas de estos combustibles (Sinha & Pandey, 2011).

El hidrógeno ( $H_2$ ), considerado un vector de energía con futuro prometedor, representa una de las alternativas a los combustibles fósiles (Azwar et al., 2014). Es un gas valioso por su rol como fuente de energía efectiva, limpia y renovable (Trchounian & Trchounian, 2015). Posee la mayor cantidad de energía por unidad de masa de todos los combustibles (Hay et al., 2013) y su combustión no produce gases de efecto invernadero, siendo el agua el único subproducto (Das & Veziroglu, 2001). Además, puede ser producido a partir de fuentes ilimitadas como agua o desechos orgánicos (Trchounian & Trchounian, 2015).

Sin embargo, la demanda de  $H_2$  no se limita a su utilización como fuente de energía (Kapdan & Kargi, 2006). El  $H_2$  es ampliamente utilizado como materia prima para la producción de químicos, hidrogenación de grasas y aceites en la industria alimenticia, producción de dispositivos electrónicos, producción de acero y desulfuración y reformulación de gasolina en refinerías (Kapdan & Kargi, 2006). De hecho, actualmente el uso del  $H_2$  está dominado por sus aplicaciones industriales, siendo el refinado de petróleo y la producción de amoníaco, metanol y acero sus principales usos ([www.iea.org](http://www.iea.org)).

A lo largo del tiempo la demanda mundial de  $H_2$  ha incrementado ([www.iea.org](http://www.iea.org)). Actualmente la demanda anual de  $H_2$  “puro” (aquel requerido para aplicaciones que toleran bajos niveles de aditivos o contaminantes) es de aproximadamente 70 millones de toneladas, siendo sus principales aplicaciones el refinado de petróleo y la producción de amoníaco para fertilizantes ([www.iea.org](http://www.iea.org)). Además, existe una demanda anual de 45 millones de toneladas de  $H_2$  como parte de una mezcla de gases, como gas de síntesis, utilizado principalmente para la producción de metanol y acero ([www.iea.org](http://www.iea.org)).

## Procesos de producción de $H_2$

A diferencia de los combustibles fósiles, el  $H_2$  no se encuentra disponible en la naturaleza en su estado elemental, sino formando parte de compuestos químicos como el agua o los hidrocarburos, los cuales deben ser transformados químicamente para obtener  $H_2$  (Crabtree et al., 2004). Esto, junto con la necesidad de desarrollar métodos de producción económicos, representa uno de los mayores retos para su utilización (Nikolaidis & Poullikkas, 2017).

Existe una variedad de procesos de producción de  $H_2$  que, según la materia prima utilizada, pueden ser divididos en dos grandes categorías: convencionales y renovables (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). La primera categoría hace referencia a aquellos procesos de producción de  $H_2$  a partir de combustibles fósiles, incluyendo el reformado de hidrocarburos (reformado con vapor, oxidación parcial y reformado autotérmico) y la pirólisis (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). La segunda categoría hace referencia a los procesos de producción de  $H_2$  a partir de fuentes

renovables, ya sea agua (electrólisis, termólisis y fotoelectrólisis) o biomasa (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). A su vez, los métodos de producción a partir de biomasa pueden dividirse en dos subcategorías: procesos termoquímicos (pirólisis, gasificación, combustión y licuefacción) y procesos biológicos (Nikolaidis & Poullikkas, 2017).

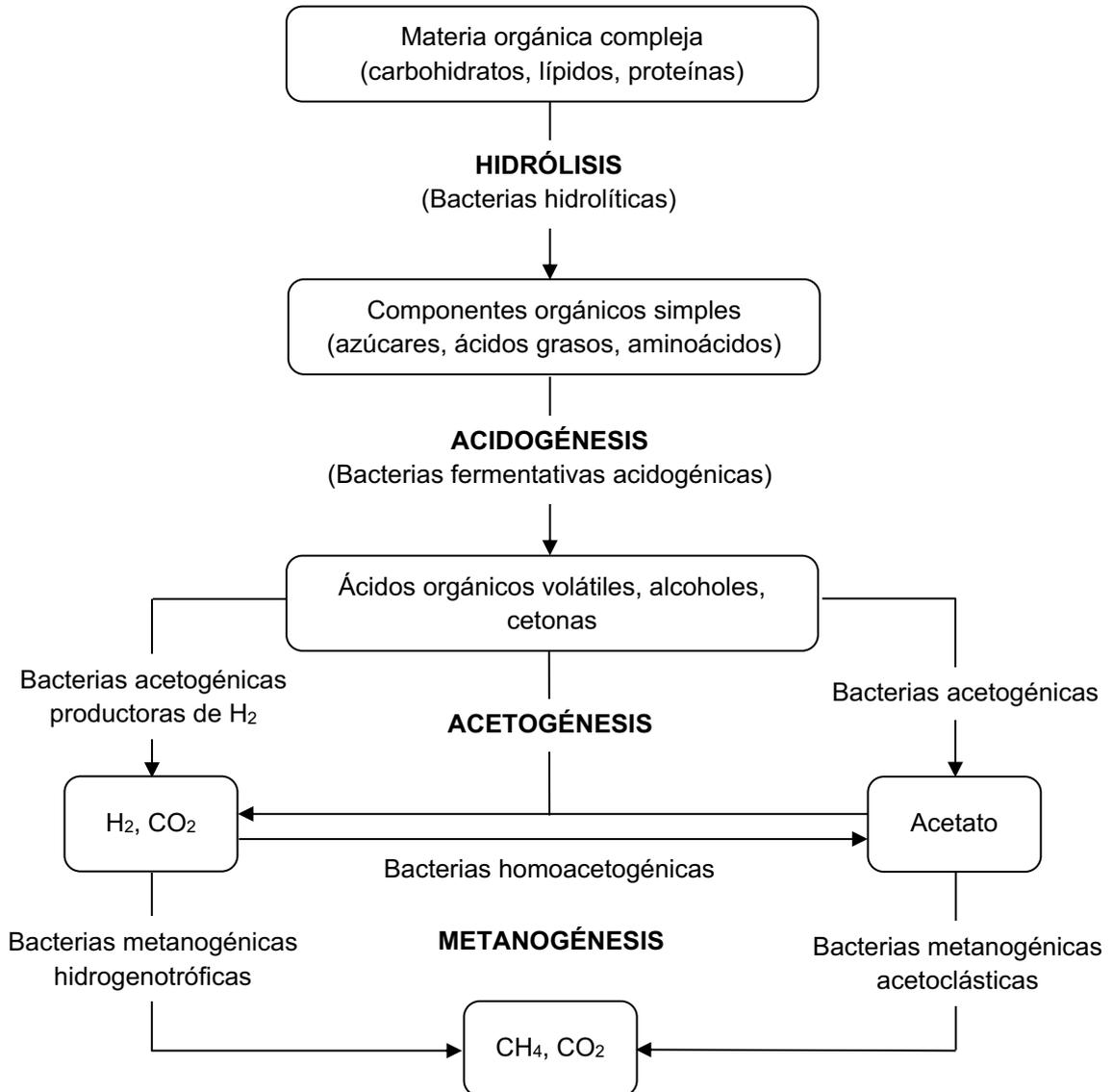
Actualmente la gran mayoría del H<sub>2</sub> se produce a partir de combustibles fósiles. Un 76% del H<sub>2</sub> puro se produce a partir de gas natural, y la mayor parte del resto a partir de carbón (Crabtree et al., 2004). Específicamente, la producción anual de H<sub>2</sub> representa el 6 y 2% del consumo global de gas natural y carbón, respectivamente (www.iea.org). Estos procesos producen grandes cantidades de H<sub>2</sub>, pero consumen mucha energía y liberan importantes cantidades de CO<sub>2</sub> al ambiente (Rafrafi et al., 2013). Como consecuencia, hoy en día la producción global de H<sub>2</sub> es responsable de emisiones de CO<sub>2</sub> de 830 millones de toneladas, las cuales corresponden a las emisiones anuales de CO<sub>2</sub> de Indonesia y el Reino Unido juntos (www.iea.org).

Para que el H<sub>2</sub> sea un combustible limpio y sustentable debe provenir de procesos que minimicen o eviten las emisiones de CO<sub>2</sub>, tales como los procesos biológicos (Ghimire et al., 2015). Los principales procesos biológicos de producción de H<sub>2</sub> son la biofotólisis directa e indirecta, la fotofermentación y la fermentación oscura (Nikolaidis & Poullikkas, 2017). Una gran variedad de microorganismos participa de estos procesos, produciendo H<sub>2</sub> mediante distintas vías e involucrando dos enzimas principales: la hidrogenasa y la nitrogenasa, las cuales catalizan la simple reacción química:  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$  (Patel et al., 2012; García-López et al., 2015).

## Fermentación oscura

La fermentación oscura es la conversión de compuestos orgánicos en H<sub>2</sub> en condiciones anaerobias y ausencia de luz (Azwar et al., 2014). Generalmente ocurre en la naturaleza como parte de un proceso mayor: la descomposición anaerobia de la materia orgánica (Tapia-Venegas et al., 2015). Mediante este proceso, una mezcla compleja de microorganismos transforma la materia orgánica en biogás, nutrientes y material celular en condiciones de ausencia de oxígeno (Merlin Christy et al., 2014). El proceso es llevado a cabo por bacterias y arqueas en 4 grandes etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (fig. 1) (Merlin Christy et al., 2014). Durante la hidrólisis los sustratos orgánicos complejos son convertidos en compuestos simples y solubles por exoenzimas producidas por bacterias hidrolíticas (Ramos-Suárez et al., 2015). Específicamente, los carbohidratos, proteínas y lípidos son transformados en monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente (Ramos-Suárez et al., 2015). Las bacterias anaerobias hidrolíticas pertenecen a los phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Fibrobacter, Spirochaetes y Thermotogae, siendo los primeros dos los más frecuentes en las plantas de producción de biogás (Azman et al., 2015). Su actividad es fundamental para el inicio del proceso de digestión anaerobia, por lo que su presencia es importante en los inóculos de los sistemas de producción de biogás (Azman et al., 2015). Durante la fase de acidogénesis, los compuestos solubles producidos en la etapa anterior son fermentados por diferentes bacterias, produciéndose ácidos grasos volátiles como el acético, butírico y propiónico, entre otros, alcoholes, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (Ramos-Suárez et al., 2015). Durante la etapa de acetogénesis los ácidos grasos volátiles son utilizados por las bacterias acetogénicas para su crecimiento, produciéndose ácido acético, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (Kothari et al.,

2014). Además, el ácido acético se puede producir a partir de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  por las bacterias homoacetogénicas (Novaes, 1986). Por último se da la metanogénesis, proceso por el cual microorganismos del dominio arquea producen metano a partir del  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  (arqueas metanogénicas hidrogenotróficas) o a partir del acetato (arqueas metanogénicas acetoclásticas) (Ramos-Suárez *et al.*, 2015).

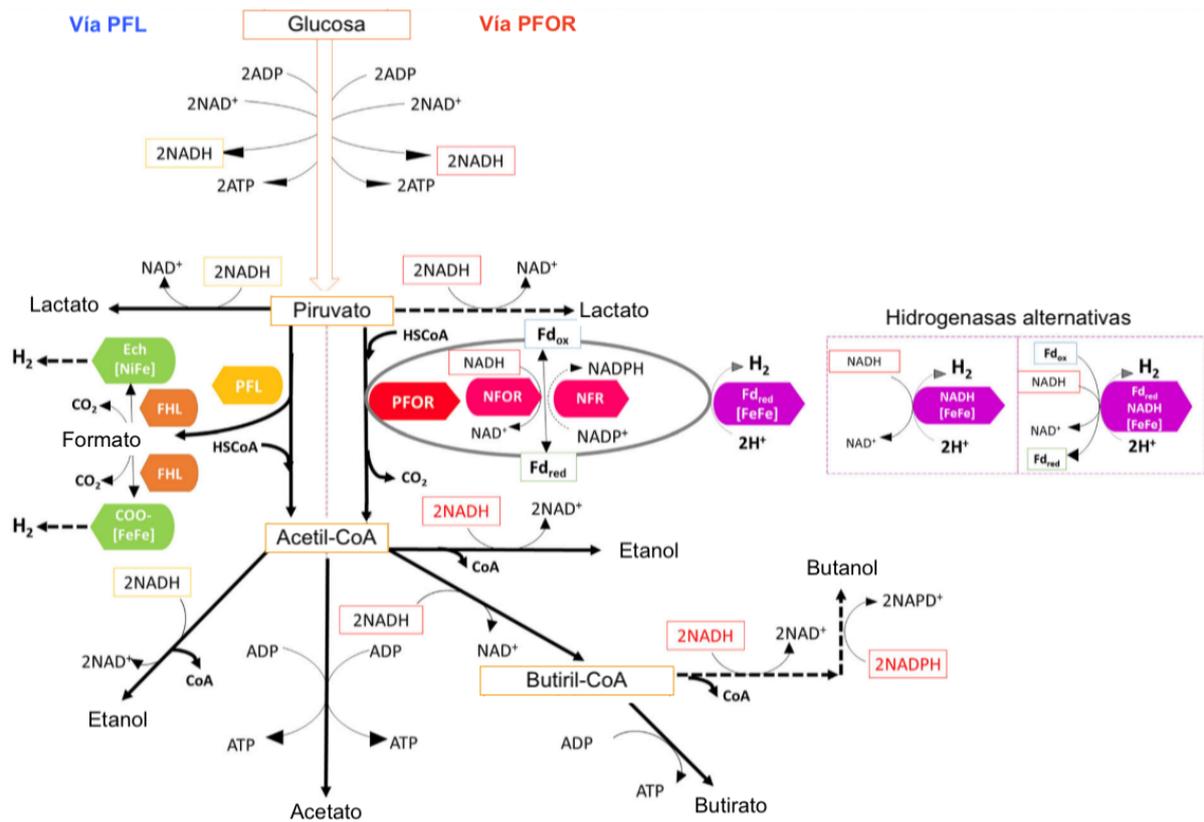


**Figura 1.** Representación esquemática de la descomposición anaerobia de la materia orgánica.

La fermentación oscura presenta varias ventajas en comparación con los métodos de fotoproducción de  $\text{H}_2$ , ya que permite producir  $\text{H}_2$  de forma continua sin necesidad de luz, presenta mayores tasas de producción, el proceso es más simple y requiere menor suministro de energía (Azwar *et al.*, 2014). Además, una gran ventaja es que implica la producción de  $\text{H}_2$  de forma simultánea al tratamiento de un desecho (Hung *et al.*, 2011).

## Bioquímica de la producción biológica de H<sub>2</sub>

La producción de H<sub>2</sub> resulta de la necesidad de las células de eliminar el exceso de electrones producidos durante la degradación anaerobia de la materia orgánica y siempre está acompañada de la producción de ácidos grasos volátiles y/o alcoholes (Cabrol et al., 2017; Toledo-Alarcón et al., 2018). Dependiendo del microorganismo, la producción de H<sub>2</sub> se da por una de dos vías metabólicas diferentes: la vía de la piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), común en microorganismos anaerobios estrictos o la vía de la piruvato formato liasa (PFL), característica de microorganismos facultativos (fig. 2) (Cabrol et al., 2017; Tapia-Venegas et al., 2015). Inicialmente, en ambos casos la glucosa es degradada a piruvato. En el caso de la vía PFOR, el piruvato es convertido en acetil-CoA y CO<sub>2</sub> (Tapia-Venegas et al., 2015). En este caso la oxidación del piruvato requiere de la reducción de una molécula de ferredoxina oxidada mediante la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (Toledo-Alarcón et al., 2018). La molécula de ferredoxina reducida resultante es reoxidada por una [FeFe] hidrogenasa dependiente de ferredoxina, produciendo H<sub>2</sub> (Toledo-Alarcón et al., 2018). En condiciones de baja presión parcial de H<sub>2</sub>, el NADH producido durante la glucólisis puede ser reoxidado por otras dos hidrogenasas ([FeFe] hidrogenasa dependiente de NADH y [FeFe] hidrogenasa dependiente de NADH y ferredoxina reducida), produciendo moléculas de H<sub>2</sub> adicionales (Cabrol et al., 2017; Tapia-Venegas et al., 2015). El NADH también puede reducir directamente la ferredoxina a través de la enzima NADH ferredoxina oxidoreductasa (NFOR) (Hallenbeck et al., 2012). De esta manera, a través de la vía PFOR se pueden obtener 2-4 moles de H<sub>2</sub> por mol de glucosa (Hallenbeck et al., 2012). En el caso de la vía PFL, el piruvato es convertido en acetil-CoA y formato por la enzima piruvato formato liasa (Tapia-Venegas et al., 2015; Cabrol et al., 2017). A su vez, el formato es degradado a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> por el complejo enzimático formato hidrógeno liasa (FHL) (Sinha et al., 2015). Dependiendo del microorganismo, el complejo puede estar asociado a la [NiFe] hidrogenasa o la [FeFe] hidrogenasa dependiente de formato (Tapia-Venegas et al., 2015; Cabrol et al., 2017). Los microorganismos que utilizan la vía PFL no producen H<sub>2</sub> con el NADH generado durante la glucólisis, sino que dicho NADH se reoxida mediante la producción de compuestos carbonados reducidos como etanol o lactato, limitando el rendimiento de H<sub>2</sub> a 2 moles de H<sub>2</sub> por mol de glucosa (Hallenbeck et al., 2012; Tapia-Venegas et al., 2015; Cabrol et al., 2017). En el caso de ambas rutas metabólicas, dependiendo del microorganismo y de las condiciones ambientales, el acetil-CoA es finalmente convertido en acetato, butirato o etanol (Toledo-Alarcón et al., 2018).



**Figura 2.** Rutas metabólicas de producción de H<sub>2</sub> a partir de la glucosa bajo condiciones anaerobias. PFL: piruvato formato liasa. PFOR: piruvato ferredoxina oxidorreductasa. FHL: formato hidrógeno liasa. Ech [NiFe]: [NiFe] hidrogenasa. COO<sup>-</sup> [FeFe]: [FeFe] hidrogenasa dependiente de formato. NFOR: NADH ferredoxina oxidorreductasa. NFR: NADP<sup>+</sup> ferredoxina reductasa. Fd<sub>red</sub> [FeFe]: [FeFe] hidrogenasa dependiente de ferredoxina. NADH [FeFe]: [FeFe] hidrogenasa dependiente de NADH. Fd<sub>red</sub> NADH [FeFe]: [FeFe] hidrogenasa dependiente de NADH y ferredoxina reducida. Adaptado de Cabrol *et al.* 2017.

Una de las debilidades de la fermentación oscura como método de producción de H<sub>2</sub> es el hecho de que sólo un tercio del sustrato es utilizado para la producción de H<sub>2</sub>, mientras que los dos tercios restantes derivan en otros productos metabólicos como ácidos orgánicos (acético, butírico, propiónico, caproico, láctico, fórmico), etanol y CO<sub>2</sub> (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2019; Hallenbeck *et al.*, 2012). Sin embargo, esto tiene sentido en términos del crecimiento y supervivencia de los microorganismos, ya que la producción de algunos productos como acetato conlleva a la formación de ATP, mientras que la producción de otros está acoplada a la oxidación de NADH, necesaria para mantener el balance redox (Hallenbeck *et al.*, 2012). Además, actualmente estos productos son comercializados en el mercado internacional, pero a excepción del ácido láctico y el etanol, que son principalmente producidos mediante bioprocesos, el resto son producidos mediante síntesis química a base de petróleo (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2019). Por lo tanto, la producción de estos productos mediante fermentación oscura hace que este proceso sea una alternativa atractiva a la refinería petroquímica, incorporándose al concepto de biorrefinería (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2019).

Otra desventaja de la fermentación oscura es que durante el proceso no se produce H<sub>2</sub> de forma pura, sino que el biogás resultante también está compuesto por CO<sub>2</sub>, pudiendo contener además CH<sub>4</sub>, CO y/o H<sub>2</sub>S (Levin et al., 2004).

## Microbiología de la fermentación oscura

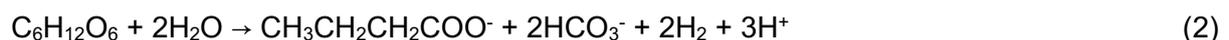
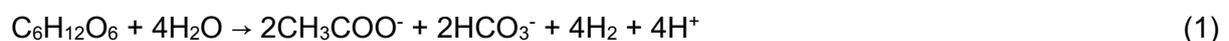
Dado que la operación exitosa de cualquier reactor de producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura depende del desempeño de los microorganismos presentes en el sistema, el conocimiento sobre la estructura de la comunidad microbiana, las relaciones simbióticas dentro de ella y los factores que afectan la producción de H<sub>2</sub> es vital para la optimización del proceso (Hung et al., 2011; Sikora et al., 2013). También es importante comprender los cambios metabólicos que ocurren dentro de la comunidad, ya que a veces comunidades bacterianas con la misma composición presentan diferentes rendimientos de producción de H<sub>2</sub>, indicando que la producción puede verse afectada por cambios en las vías metabólicas en respuesta a las condiciones ambientales y no a cambios en la estructura de la comunidad (Hung et al., 2011).

### Microorganismos productores de H<sub>2</sub>

Un amplio número de microorganismos pertenecientes a diferentes grupos fisiológicos y taxonómicos son capaces de producir H<sub>2</sub> (con diferentes tasas y rendimientos) (Lin et al., 2012). Según Cabrol *et al.* (2017) las bacterias productoras de hidrógeno (BPH) pueden ser divididas en tres grupos: i) bacterias anaerobias estrictas formadoras de esporas, ii) bacterias anaerobias estrictas no formadoras de esporas y iii) bacterias anaerobias facultativas.

#### Bacterias anaerobias estrictas formadoras de esporas

*Clostridium* es un típico género de microorganismos anaerobios estrictos formadores de esporas que producen H<sub>2</sub> (Chong et al., 2009). Presentan dos vías metabólicas para producir H<sub>2</sub>: la vía del acetato o la vía del butirato, mediante las cuales se producen teóricamente 4 o 2 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa, respectivamente (ec. 1 y 2) (Chong et al., 2009). En general se produce una mezcla de productos y el rendimiento de H<sub>2</sub> es determinado por la relación butirato/acetato (Chong *et al.*, 2009).



#### Bacterias anaerobias estrictas no formadoras de esporas

La familia Veillonellaceae se distingue por su predominancia en los sistemas de producción de H<sub>2</sub>, destacándose los géneros *Megasphaera* y *Selenomonas* (Etchebere et al., 2016). Los organismos de esta familia toleran altas concentraciones de ácidos orgánicos, lo que podría explicar su selección en los reactores de producción de H<sub>2</sub> (Etchebere et al., 2016). Estos microorganismos se encuentran a menudo en sistemas con producción de H<sub>2</sub> media o baja (Etchebere et al., 2016).

## Bacterias anaerobias facultativas

Se destaca la familia Enterobacteriaceae y el orden Bacillales (Cabrol et al., 2017). Específicamente, *Enterobacter* sp. es el microorganismo facultativo gram negativo más común con la capacidad de producir H<sub>2</sub> (Chong et al., 2009). A pesar de que los microorganismos anaerobios facultativos presentan menores rendimientos teóricos de H<sub>2</sub>, su menor sensibilidad al oxígeno los hace atractivos para la producción de H<sub>2</sub>, ya que son capaces de consumir rápidamente el oxígeno presente en el cultivo durante el comienzo de la operación o luego de una entrada accidental de aire al reactor, generando las condiciones anaerobias necesarias para el desarrollo de productores de H<sub>2</sub> anaerobios estrictos (Hung et al., 2011; Cabrol et al., 2017).

## Cultivos puros o mixtos

La producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura puede ser llevada a cabo por cultivos puros o mixtos (Tapia-Venegas et al., 2015). Los cultivos puros permiten detectar y controlar de forma más fácil los cambios metabólicos, presentan alta selectividad y brindan mayor información sobre las condiciones que promueven una alta producción de H<sub>2</sub> (Tapia-Venegas et al., 2015; Bastidas-Oyanedel et al., 2019). Sin embargo, estos pueden ser bastante sensibles a la contaminación por lo que requieren condiciones asépticas de operación, las cuales incrementan los costos del proceso (Ntaikou et al., 2010). En cambio, los cultivos mixtos presentan la gran ventaja de no requerir que el proceso ocurra bajo condiciones estériles, pueden consumir un amplio rango de sustratos, son más robustos a cambios en las condiciones operacionales y posibilitan la interacción entre los diferentes microorganismos (Ntaikou et al. 2010; Hung et al., 2011; Tapia-Venegas et al., 2015).

Los microorganismos capaces de producir H<sub>2</sub> están ampliamente distribuidos en hábitats naturales como lodos, compost, suelos, sedimentos y otros, los cuales pueden ser utilizados como inóculo de los procesos de producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura (Wang & Yin, 2017). Cuando se utilizan desechos orgánicos para la producción de H<sub>2</sub>, los microorganismos nativos del desecho pueden utilizarse como productores de H<sub>2</sub>, no requiriendo de un inóculo adicional (Wang & Yin, 2017).

## Microorganismos desfavorables para la producción de H<sub>2</sub>

Al utilizarse cultivos mixtos como inóculo de los reactores de producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura, además de encontrarse BPH también se pueden encontrar microorganismos consumidores de H<sub>2</sub> y/o microorganismos competidores por el sustrato orgánico (Toledo-Alarcón et al., 2018). Por lo general, para minimizar esta posibilidad se mantienen condiciones operacionales y ambientales que favorecen la predominancia de las especies productoras de H<sub>2</sub> deseadas o se aplica un pretratamiento al inóculo para eliminar los microorganismos consumidores y preservar los productores de H<sub>2</sub> (Ntaikou et al., 2010; Wang & Yin, 2017). El pretratamiento térmico, utilizado para eliminar los microorganismos no formadores de esporas y seleccionar los productores de H<sub>2</sub> esporulados, ha sido el método más utilizado, seguido por los tratamientos ácidos o básicos, los inhibidores químicos y la aireación (Wang & Yin, 2017).

Los procesos responsables del consumo de H<sub>2</sub> son la metanogénesis, la homoacetogénesis, la producción de propionato y la reducción de sulfato (Cabrol et al., 2017).

## Metanogénesis

La metanogénesis representa uno de los principales procesos responsables del consumo de H<sub>2</sub>, mediante el cual el H<sub>2</sub> es utilizado como dador de electrones para reducir CO<sub>2</sub> a metano por microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos (Cabrol et al., 2017). Por lo tanto, para producir H<sub>2</sub> en grandes cantidades es necesario eliminar la metanogénesis del sistema (Chong et al., 2009). Además del pretratamiento del inóculo, la presencia de los microorganismos metanogénicos puede ser controlada mediante los parámetros operacionales del reactor, ya que suelen ser sensibles a bajos valores de pH y desfavorecidos por tiempos de retención hidráulicos cortos debido a su baja tasa de crecimiento (Cabrol et al., 2017).

## Homoacetogénesis

Los microorganismos acetogénicos son heterótrofos que producen acetato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por la oxidación de ácidos orgánicos (Saady, 2013). Los microorganismos homoacetogénicos son acetogénicos que cambian su metabolismo a un crecimiento autotrófico bajo condiciones de estrés o cuando el sustrato orgánico se termina, produciendo acetato a partir de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (ec. 3) (Saady, 2013).



Un ejemplo de que este proceso ocurre en reactores de producción de H<sub>2</sub> es presentado en el trabajo de Anzola-Rojas et al. (2015). En este trabajo se operó un reactor de lecho fijo utilizando un sustrato a base de sacarosa con diferentes relaciones C/N para evaluar su efecto en la producción de H<sub>2</sub>. En todos los experimentos se observó que la producción de H<sub>2</sub> no fue estable a lo largo del tiempo y plantearon como explicación de este comportamiento la acumulación de biomasa en el soporte interno, lo que habría conducido a la disminución de la tasa de carga orgánica específica. Esto podría haber promovido la proliferación de microorganismos adversos para la producción de H<sub>2</sub>, como los homoacetogénicos. De hecho, mediante análisis microbiológicos detectaron microorganismos de este tipo, como *Clostridium carboxidivorans*, a quien atribuyeron la responsabilidad de haber causado la inestabilidad de la producción de H<sub>2</sub>.

## Producción de propionato

El ácido propiónico puede ser producido a partir de azúcares o productos metabólicos derivados de la fermentación de los azúcares, como lactato, acetato, succinato o etanol sin co-producción de H<sub>2</sub> (Stams et al., 1998). La producción de ácido propiónico a partir de glucosa implica el consumo de H<sub>2</sub> (ec. 4), afectando negativamente la tasa volumétrica de producción y el rendimiento de H<sub>2</sub>, por lo que debería ser eliminada para una eficiente producción de H<sub>2</sub> durante la fermentación oscura (Sivagurunathan et al., 2014).



## Reducción de sulfato

La reducción de sulfato, llevada a cabo por bacterias reductoras de sulfato que utilizan H<sub>2</sub> como dador de electrones para reducir sulfato a sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), es el proceso de

consumo de H<sub>2</sub> más eficiente termodinámicamente (Cabrol et al., 2017; Guo et al., 2010). El crecimiento de dichas bacterias se ve favorecido en sustratos con altas concentraciones de sulfato, como los desechos de la industria de papel, procesamiento de mariscos, destilerías, aceite comestible y molienda húmeda de maíz (Guo et al., 2010). Bajo condiciones de alta concentración de sulfato incluso un tiempo de retención hidráulico tan bajo como 2 horas no es suficiente para inhibir estos microorganismos (Guo et al., 2010). El pH es un factor clave en la reducción de sulfato, ya que valores de pH menores a 6 inhiben significativamente la actividad de las bacterias reductoras de sulfato (Guo et al., 2010).

## Microorganismos no productores que contribuyen a la producción de H<sub>2</sub>

Algunos microorganismos no productores de H<sub>2</sub> o productores poco eficientes favorecen indirectamente la producción de H<sub>2</sub> (Cabrol et al., 2017).

### Consumo de oxígeno

Como ya fue mencionado los microorganismos aerobios o anaerobios facultativos cumplen un rol importante en la comunidad microbiana de los reactores por ser capaces de consumir oxígeno y por lo tanto crear una atmósfera propicia para el desarrollo de microorganismos anaerobios productores de H<sub>2</sub> (Hung et al., 2011). Huang et al. (2010) operaron un reactor CSTR sin remover el oxígeno del cultivo ni del *headspace*. Durante la fase lag la comunidad microbiana estuvo dominada por especies del género *Bacillus*, que al crecer consumieron el oxígeno, creando un ambiente adecuado para el desarrollo de microorganismos anaerobios. De esta manera comenzaron a proliferar las bacterias productoras de H<sub>2</sub>, dominando durante la fase exponencial y estacionaria especies del género *Clostridium*.

Un diseño ideal de un reactor anaerobio debería incluir la mayor remoción posible de oxígeno del sustrato antes de que entre al reactor (Hung et al., 2011). Dado que es una tarea muy difícil si se considera el proceso en una escala industrial (Hung et al., 2011), la presencia de microorganismos como *Bacillus* podría ser crucial para el funcionamiento del reactor.

### Regulación del pH

Además, algunos microorganismos son capaces de contribuir indirectamente al proceso mediante la regulación del pH. Dado que la producción de H<sub>2</sub> es óptima a pH ácido, la ligera acidificación del medio en el reactor por bacterias ácido lácticas por ejemplo, contribuye positivamente al proceso (Cabrol et al., 2017). Sin embargo, la acidificación drástica puede ser perjudicial, por lo que los microorganismos capaces de consumir ácidos grasos de cadena corta (como *Megasphaera elsdenii*, *Syntrophobacter fumaroxidans* y *Syntrophomonas wolfei*) también contribuyen de forma positiva a la producción de H<sub>2</sub>, ya que previenen su acumulación y amortiguan caídas abruptas del pH (Cabrol et al., 2017).

### Otras formas de contribución

Los microorganismos también pueden contribuir a la producción de H<sub>2</sub> mediante la hidrólisis de sustratos complejos a moléculas más pequeñas utilizables por las BPH o mediante el fomento de la agregación celular, incrementando la concentración celular dentro del reactor, previniendo el lavado de la biomasa y protegiendo a los microorganismos de tóxicos o ambientes hostiles (Cabrol et al., 2017).

## Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas son recurrentes en los sistemas de producción de H<sub>2</sub> (Chojnacka et al., 2011; Ferraz et al., 2015a; Ferraz et al., 2015b; Fuess et al., 2018; Li et al., 2006; Santos et al., 2014; Yang et al., 2007). Sin embargo, su papel en la comunidad bacteriana todavía no ha sido entendido del todo, ya que los estudios reportan tanto efectos positivos como negativos sobre la producción de H<sub>2</sub>.

Entre los efectos negativos generalmente reportados se encuentra la competencia por el sustrato y la producción de bacteriocinas (Sikora *et al.*, 2013). Además, la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas se puede deber a la caída del pH por la síntesis de ácidos; la producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y la producción de diacetilo (Noike et al., 2002). En cambio, en varios estudios se observó un efecto positivo del ácido láctico sobre la producción de H<sub>2</sub>. En 2007 Matsumoto y Nishimura demostraron que la cepa *Clostridium diolis* JPC H-3 puede producir H<sub>2</sub> a partir de ácido láctico y ácido acético, con co-producción de ácido butírico (ec. 5). Varias especies del género *Clostridium* han sido asociadas al consumo de ácido láctico con producción de H<sub>2</sub>, incluyendo *C. acetobutylicum* (Diez-Gonzalez et al., 1995), *C. diolis*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* (Matsumoto & Nishimura, 2007) y *C. tyrobutyricum* (Jo et al., 2008).



## Microorganismos subdominantes

La mayoría de los estudios hacen énfasis en las especies dominantes de la comunidad microbiana. Sin embargo, a pesar de su baja abundancia, las especies subdominantes también pueden cumplir un rol significativo, por lo que es importante determinar su función para entender las redes metabólicas en los cultivos mixtos (Rafrafi et al., 2013). Rafrafi et al. (2013) estudiaron el rol ecológico de bacterias de baja abundancia en cultivos mixtos de producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura. Encontraron que las especies subdominantes son capaces de impactar sustancialmente la red metabólica microbiana general del ecosistema, por lo que pueden considerarse especies clave. Dependiendo de la especie, el efecto sobre la producción de H<sub>2</sub> puede ser positivo o negativo (Rafrafi et al., 2013).

## Estudio de las comunidades microbianas

Las comunidades microbianas productoras de H<sub>2</sub> pueden ser caracterizadas por una gran variedad de métodos, desde abordajes bioquímicos convencionales o microscopía hasta técnicas moleculares altamente específicas (Sinha *et al.*, 2015). Estas últimas permiten el estudio de las comunidades independientemente de la naturaleza cultivable de los microorganismos, lo que representa una ventaja frente al resto de las técnicas (Sinha *et al.*, 2015). A pesar de ello, el aislamiento de los microorganismos en cultivos puros permite adquirir conocimiento sobre su genética y metabolismo, el cual puede ser utilizado para crear herramientas de mejoramiento de la producción de H<sub>2</sub>.

Se han hecho muchos intentos para potenciar la capacidad de producción de H<sub>2</sub> mediante ingeniería genética, incluyendo la sobre expresión de genes involucrados en la producción de H<sub>2</sub>, *knock out* de vías metabólicas competitivas y creación de nuevas vías de producción, entre otros (Wang & Yin, 2019). Zhao et al. (2017a) sobreexpresaron los genes de la

subunidad mayor y menor de la hidrogenasa 3 de *Enterobacter aerogenes* mediante ingeniería genética con el objetivo de mejorar la capacidad de producción de H<sub>2</sub> de este microorganismo. Los resultados mostraron que la actividad hidrogenasa, la producción de acetato y butirato, y los rendimientos de H<sub>2</sub> fueron significativamente mayores en las cepas modificadas genéticamente en comparación con la cepa salvaje.

Además, la obtención de cultivos puros permite realizar posteriores ensayos de co-cultivo mediante los que se analizan las interacciones entre los diferentes microorganismos.

Liu et al. (2008) aislaron dos microorganismos termófilos de un material rico en celulosa e investigaron su interacción durante la degradación de la celulosa y la producción de H<sub>2</sub> en co-cultivo. Uno de los aislamientos resultó ser una cepa de *Clostridium thermocellum*, microorganismo capaz de degradar la celulosa microcristalina y producir H<sub>2</sub> entre otros productos, pero que no puede utilizar completamente la celobiosa y glucosa producida por la degradación de la celulosa. El segundo aislamiento correspondió a una cepa de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Los autores encontraron que *C. thermocellum* en cultivo puro produjo H<sub>2</sub> con un rendimiento de 0.8 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa, pero al ser co-cultivado con *T. thermosaccharolyticum* la producción de H<sub>2</sub> aumentó y el rendimiento incrementó a 1.8 mol H<sub>2</sub>/mol glucosa.

## Factores que influyen sobre la producción de H<sub>2</sub>

### Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros operacionales más importantes en la producción fermentativa de H<sub>2</sub>, ya que afecta la tasa de crecimiento y las vías metabólicas de los microorganismos (Sinha & Pandey, 2011).

La producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura ha sido llevada a cabo mayormente a temperaturas mesófilas, aunque los reactores termófilos e hipertermófilos también han sido estudiados (Lazaro & Hallenbeck, 2019).

Yokoyama et al. (2007) estudiaron la producción de H<sub>2</sub> a partir de desechos de vacas lecheras bajo varias condiciones de temperatura (37, 50, 55, 60, 67, 75 y 85°C) utilizando los propios microorganismos del desecho. Observaron que la producción total de H<sub>2</sub> dependió de la temperatura de incubación, siendo relativamente baja a 37 y 50°C y aumentando significativamente a temperaturas mayores a 50°C. Específicamente, detectaron dos picos de producción de H<sub>2</sub> a 60 y 75°C. Hubo producción de metano a 37 y 50°C pero no a temperaturas mayores a 50°C, por lo que sugieren que la causa de la baja producción de H<sub>2</sub> a menor temperatura fue la producción de metano. La microflora cultivada a 60°C mostró actividad consumidora de H<sub>2</sub>, lo que indica que a dicha temperatura el consumo de H<sub>2</sub> fue causado por bacterias no metanogénicas, como las homoacetogénicas o reductoras de sulfato. En cambio, a 75°C no se observó consumo de H<sub>2</sub>, por lo que la actividad de las bacterias consumidoras de H<sub>2</sub> puede ser suprimida a 75°C. Debido a que para la producción estable de H<sub>2</sub> a largo plazo la supresión del consumo de H<sub>2</sub> es importante, los autores concluyeron que la producción de H<sub>2</sub> a 75°C puede ser más útil que a 60°C a partir de desechos de vaca.

En los casos en los que el inóculo no es pretratado las temperaturas mayores a 60°C son recomendadas para reducir la actividad consumidora de H<sub>2</sub> (Guo et al., 2010). Evitar el pretratamiento del inóculo es ventajoso, ya que disminuye el costo del proceso y los impactos ambientales asociados a la disposición del efluente de la fermentación. Como contrapartida, el mantenimiento de las temperaturas elevadas implica gastos energéticos y económicos que hacen que la fermentación oscura termófila no sea ampliamente utilizada (Wang & Yin, 2019). Sin embargo, la condición termófila se transforma en una buena opción cuando se utilizan desechos industriales descargados a alta temperatura (Wang & Yin, 2019).

*Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter* y *Thermotoga* representan típicos géneros de microorganismos termófilos productores de H<sub>2</sub> (Gopalakrishnan et al., 2019). Estos presentan ciertas ventajas frente a los microorganismos mesófilos. Dada su capacidad de crecer exitosamente a alta temperatura, disminuyen la chance de contaminación del proceso (Ntaikou et al., 2010). Además, son más resistentes a la presión parcial de H<sub>2</sub>, la cual inhibe la producción de H<sub>2</sub>, y son capaces de alcanzar el rendimiento máximo de H<sub>2</sub> debido a la menor barrera termodinámica (Ntaikou et al., 2010; Gopalakrishnan et al., 2019).

## pH

El pH es otro factor importante que influye en la producción fermentativa de H<sub>2</sub>, no sólo afectando el rendimiento de la producción de H<sub>2</sub>, sino también modificando el espectro de subproductos e impactando en la estructura de la comunidad microbiana (Guo et al., 2010; Sinha & Pandey, 2011).

Por un lado, los valores de pH neutros además de ser costosos y engorrosos de mantener pueden favorecer el crecimiento de los microorganismos metanogénicos (Mota et al., 2018).

Para evaluar el efecto del pH, Fang et al. (2002) analizaron la producción de H<sub>2</sub> de un fermentador y su comunidad microbiana en un rango de pH entre 4 y 7 a intervalos de 0.5. Encontraron que entre los valores de pH 4 y 5.5 aumentó la degradación de la glucosa, el contenido de H<sub>2</sub> y el rendimiento de H<sub>2</sub> y no se produjo metano. En cambio, entre los valores de pH 5.5 y 7 la degradación de la glucosa se mantuvo constante, disminuyó el contenido, rendimiento y la tasa específica de producción de H<sub>2</sub> y aumentó el contenido de metano. Además, mediante el análisis de la comunidad microbiana por DGGE observaron que esta cambió con el pH, aumentando el número de bandas a medida que aumentó el pH, lo que podría deberse a la presencia de microorganismos metanogénicos, evidenciada por el aumento de metano en el biogás.

Por otro lado, los valores de pH menores a 4.5 provocan cambios en las vías metabólicas hacia la producción de compuestos más reducidos que los ácidos grasos volátiles; aumentan las concentraciones de las formas disociadas de los ácidos orgánicos, las cuales afectan el crecimiento microbiano; y pueden llegar a inhibir la actividad de la hidrogenasa y la capacidad de la ferredoxina de donar electrones a los protones (Mota et al., 2018).

En general, el pH deseable para la operación de los reactores de producción de H<sub>2</sub> varía entre 4.5 y 6.5, aunque incluso dentro de este rango se pueden encontrar microorganismos consumidores de H<sub>2</sub> (Mota et al., 2018).

Dada la constante producción de ácidos grasos volátiles y CO<sub>2</sub> durante la fermentación oscura el pH del medio tiende a disminuir, por lo que en general se necesita la adición de bases a los reactores (Mota et al., 2018). Sin embargo, el uso excesivo de reguladores de pH (ácidos, bases o buffers) puede disminuir la economía y sustentabilidad del proceso e incrementar la concentración de sales en el efluente de la fermentación oscura (Ghimire et al., 2015).

## Configuración del reactor

En el caso de cualquier proceso fermentativo la configuración del reactor es uno de los principales factores decisivos para la eficiencia del proceso (Gopalakrishnan et al., 2019). Los procesos de fermentación pueden ser llevados a cabo en *batch*, *fed-batch*, de forma semicontinua o continua (Gopalakrishnan et al., 2019). La producción de H<sub>2</sub> se realiza principalmente en modo *batch* o continuo (Gopalakrishnan et al., 2019). El modo *batch* es más adecuado para estudios iniciales de optimización, pero para la aplicación del proceso a gran escala el modo continuo es preferible (Gopalakrishnan et al., 2019).

El diseño del reactor es elegido en base a la naturaleza del sustrato (Gopalakrishnan et al., 2019). En general, buenas condiciones de mezcla y alta retención de biomasa microbiana son deseables (Dos Reis & Silva, 2014).

Muchos estudios han sido llevados a cabo en reactores CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) debido a su construcción simple, efectiva mezcla homogénea y facilidad de operación (Gopalakrishnan 2019). Sin embargo, dado que la biomasa se encuentra suspendida, uno de los principales inconvenientes es el lavado de la biomasa en condiciones de tiempos de retención hidráulico (HRT) cortos (Wang & Wan, 2009). En estos tipos de reactores la concentración de la biomasa y la producción de H<sub>2</sub> es limitada (Wang & Wan, 2009).

Los sistemas de células inmovilizadas se han convertido en una alternativa común a los sistemas de células suspendidas, ya que son más eficientes para la separación de sólidos/líquidos y son capaces de mantener mayores concentraciones de biomasa y de operar a menores HRT sin el lavado de la biomasa (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009; Wang & Wan, 2009). La inmovilización de la biomasa puede ser llevada a cabo a través de la formación de gránulos, flóculos o biofilms (Wang & Wan, 2009).

En los reactores UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket Bioreactor*) el agua residual a ser tratada es introducida desde el fondo del reactor y fluye hacia arriba a través de una capa de lodo activado, que en general se encuentra formando agregados granulares (Daud et al., 2018). Los microorganismos forman naturalmente los gránulos, los cuales tienen una gran velocidad de sedimentación y por lo tanto ofrecen resistencia a ser lavados fuera del sistema (Gopalakrishnan et al., 2019). La liberación de burbujas de gas por parte de los microorganismos causa turbulencia y la mezcla del medio, por lo que no es necesario incluir agitación mecánica en el sistema (Gopalakrishnan et al., 2019). Este tipo de reactor es

efectivo en la conversión de la materia orgánica en H<sub>2</sub> y el mantenimiento de una alta concentración celular dentro del reactor (Gopalakrishnan et al., 2019).

Los reactores APBR (*Anaerobic Packed-Bed Reactor*) poseen un material interno sobre el cual los microorganismos forman biofilms (Dos Reis & Silva, 2014). Los reactores ASTBR (*Anaerobic Structured-Bed Reactor*) son una variación de la configuración convencional APBR, en la cual el material de soporte está ordenado de forma de permitir la adhesión de la biomasa pero al poseer mayor porosidad disminuye la acumulación excesiva de biomasa, reduciendo los problemas de obstrucción y consecuentemente favoreciendo la producción de H<sub>2</sub> (Blanco et al., 2019).

## Producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura a partir de desechos

La fermentación oscura cumple un rol dual al tratar desechos orgánicos y producir H<sub>2</sub> y otros productos de valor de forma simultánea (Gopalakrishnan et al., 2019). Debido al incremento de la población y al crecimiento económico, la generación de desechos ha aumentado enormemente en los últimos años (Gopalakrishnan et al., 2019). Muchos desechos presentan altos contenidos de materia orgánica, por lo que su disposición en el ambiente sin un tratamiento previo provoca grandes impactos negativos sobre las personas y el ecosistema en general (Gopalakrishnan et al., 2019).

Existe una amplia variedad de residuos que pueden utilizarse como sustrato de la fermentación oscura, entre los que se destacan los residuos agrícolas, lignocelulósicos y de ganado, desechos de la industria láctea, cultivos energéticos, residuos sólidos urbanos, desechos de la producción industrial de biodiesel (glicerol), efluente de la producción de aceite de palma y biomasa algal (Saratale et al., 2019).

La disponibilidad, biodegradabilidad, costo y contenido de carbohidratos son características clave del sustrato a tener en cuenta a la hora de su selección como materia prima para la producción de H<sub>2</sub> (Veeravalli et al., 2019). Para una producción de H<sub>2</sub> sustentable, el sustrato debe tener un alto contenido de carbohidratos, requerir mínimo pretratamiento, ser lo suficientemente concentrado para que la conversión fermentativa y la recuperación de energía sea energéticamente favorable, ser una fuente sustentable y ser de bajo costo (Bartacek et al., 2007).

Una de las principales limitaciones de la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura es la viabilidad económica del proceso (Gopalakrishnan et al., 2019). Sin embargo, la utilización de desechos orgánicos como sustrato hace que el proceso sea más factible económicamente al sustituir los costosos medios de cultivo (Gopalakrishnan et al., 2019).

## Vinaza de caña de azúcar como sustrato de la fermentación oscura

La vinaza de caña de azúcar es el principal residuo líquido de la producción de etanol a partir de caña de azúcar (del Pino Machado et al., 2017). Se genera en grandes cantidades, ya que por cada litro de etanol se producen 12-15 litros de vinaza (Ferraz et al., 2016). Junto con Estados Unidos, Brasil es el principal productor de etanol del mundo, habiendo producido en el período 2014/2015 aproximadamente 28.700 millones de litros de etanol a partir de caña de azúcar (Fuess et al., 2017). En Uruguay, ALUR (Alcoholes del Uruguay) es la empresa

responsable de la producción de bioetanol, entre otros productos. En el año 2015, en la planta de Bella Unión (Artigas) se produjeron aproximadamente 32.7 millones de litros de bioetanol anhidro a partir de jugo y melaza de caña y jugo de sorgo dulce (ALUR.com.uy). Además, esta empresa cuenta con una planta de bioetanol en Paysandú, con una capacidad de producción de 70 millones de litros al año a partir de sorgo BT (ALUR.com.uy). Dada su elevada concentración de materia orgánica y nutrientes, la vinaza no puede ser vertida a los cuerpos de agua sin tratamiento previo (Senatore et al., 2017). En Brasil, la vinaza generalmente se aplica directamente al suelo como biofertilizante de los cultivos de caña de azúcar, lo que representa desde un punto de vista económico la solución más sencilla y barata (Ferraz et al., 2016). En Uruguay, el riego con vinaza fue puesto en práctica por ALUR en el año 2012 (Senatore et al., 2017). El fertirriego con vinaza presenta ventajas ya que no requiere tecnologías complejas, es de rápida aplicación, tiene bajo costo de mantenimiento, baja inversión inicial y sustituye a los fertilizantes químicos (Christofolletti et al., 2013). Sin embargo, se han reportado diversos impactos negativos sobre el suelo y los cuerpos de agua, como la salinización, sobrecarga orgánica, contaminación por iones específicos y metales tóxicos, interferencia en la fotosíntesis e inhibición de la germinación de semillas, entre otros (Fuess & Garcia, 2014). A pesar de que en Brasil la vinaza se utiliza para fertirriego desde hace 40 años (Damy et al., 2018), recién en 2006 se creó una norma (P4.231) para el estado de San Pablo, con el objetivo de establecer los criterios y procedimientos para el almacenamiento, transporte y aplicación de la vinaza en el suelo. Esta regulación sólo prevé los impactos de la vinaza en el suelo, agua y agua subterránea, prescribiendo su aplicación según su contenido de potasio pero sin tener en cuenta el contenido de materia orgánica y los impactos atmosféricos (Moraes et al., 2015). Del Pino Machado et al. (2017) evaluaron el efecto de la aplicación de vinaza producida en ALUR sobre algunas propiedades químicas de suelos de la zona de producción de caña de azúcar de Uruguay. Principalmente detectaron un importante aporte de nutrientes y aumento de la salinidad del suelo, por lo que concluyeron que deben aplicarse dosis de vinaza adecuadas para evitar daños a los cultivos e inconvenientes ambientales (del Pino Machado et al., 2017). Además, un estudio realizado en Uruguay sobre los cambios de la comunidad microbiana del suelo tratado con vinaza mostró diferentes efectos de la aplicación de vinaza sobre la microbiota del suelo, dependiendo de la población estudiada y del tipo de suelo (Senatore, 2013). Todo lo mencionado anteriormente resalta la importancia del desarrollo de alternativas al fertirriego, que permita un uso y aprovechamiento más adecuado de la vinaza.

En una colaboración entre el Laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE e investigadores de la Escuela de Ingeniería de Sao Carlos de Brasil, se estudió en nuestro laboratorio las comunidades microbianas de dos reactores de producción de H<sub>2</sub> operados en condiciones extremas de pH (3) o temperatura (70°C).

## Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar los microorganismos presentes en estos dos reactores de producción de H<sub>2</sub> operados en condiciones extremas de pH y temperatura y determinar su posible rol dentro de la comunidad microbiana.

## Objetivos específicos

1. Aislar los microorganismos presentes en los dos reactores de producción de H<sub>2</sub> en condiciones extremas.
2. Conocer el género y especie de los aislamientos.
3. Estudiar la capacidad de producir H<sub>2</sub> de los aislamientos.
4. Estudiar la composición de la comunidad microbiana del reactor termófilo mediante secuenciación masiva.

## Materiales y métodos

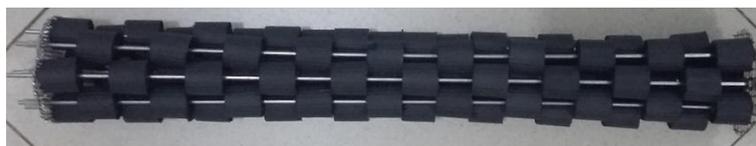
### Muestras y reactores

En este trabajo se aislaron microorganismos correspondientes a dos reactores productores de H<sub>2</sub> que fueron operados por investigadores de la Escuela de Ingeniería Química de Sao Carlos, Brasil, quienes también se encargaron de tomar las muestras y enviarlas al laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE para su análisis microbiológico. A continuación se describe la operación de ambos reactores y el muestreo realizado por los investigadores de Brasil.

### Reactor termófilo

El reactor operado fue un ASTBR con soporte material de polietileno dentro del mismo como estrategia para la retención de la biomasa (fig. 3). El sustrato utilizado fue vinaza de caña de azúcar. Dado que la vinaza se produce a alta temperatura (90-100°C), el reactor fue operado a 70°C para evitar el gasto energético y económico que requiere el enfriamiento del sustrato. Se tomaron cuatro muestras diferentes de vinaza (V1-V4) de una biorrefinería de producción de etanol y azúcar ubicada en Pradópolis, San Pablo, Brasil. Las muestras de vinaza presentaban diferencias en su composición debido a las demandas cambiantes de la biorrefinería (Tabla 1). Como inóculo se utilizó la misma vinaza previamente fermentada para promover el crecimiento de los microorganismos autóctonos. El reactor fue operado durante 125 días bajo un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 19 horas, pH 5 y sin control de la tasa de carga orgánica (TCO), que varió según la composición de la vinaza. La producción de H<sub>2</sub> fue continua a lo largo de la operación (Tabla 1).

Se tomaron cuatro muestras de la biomasa microbiana del reactor a lo largo de la operación. Dos de ellas corresponden a la biomasa suspendida durante la operación con las vinazas V1 y V3 (BS V1 y BS V3), y las otras dos a la biomasa suspendida o adherida al soporte material al final de la operación con la vinaza V4 (BS V4 y BA V4, respectivamente). Las muestras se conservaron refrigeradas (4°C), para el aislamiento de los microorganismos, y congeladas (-20°C) para extracción de ADN y análisis por secuenciación masiva. Por un error de laboratorio una de las muestras (BS V1) solamente se conservó a 4°C.



**Figura 3.** Soporte de polietileno para la retención de la biomasa dentro del reactor ASTBR. Imagen tomada de Niz *et al.* 2019.

**Tabla 1.** Composición y características de las 4 muestras de vinaza (V1-V4) utilizadas durante la operación del reactor y producción de H<sub>2</sub> resultante. DQO: demanda química de oxígeno. TCO: tasa de carga orgánica. CH: carbohidratos. PVH: producción volumétrica de H<sub>2</sub>. Tabla tomada de Niz *et al.* 2019.

Vinaza	DQO (g.L <sup>-1</sup> )	TCO (gDQO.L <sub>reactor</sub> <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	CH (g.L <sup>-1</sup> )	PVH (mLH <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Rendimiento (molH <sub>2</sub> .mol <sub>glucosa</sub> <sup>-1</sup> )
V1	36	56	0.4	5.9	630 ± 47	2.6 ± 0.5
V2	44	54	7.1	5.1	543 ± 49	2.1 ± 0.5
V3	24	28	0.8	5.6	538 ± 98	1.2 ± 0.2
V4	19	20	0.1	3.9	358 ± 81	1.3 ± 0.3

## Reactor acidófilo

Este reactor, de tipo UASB, fue operado sin la aplicación de reguladores de pH. La continua producción de ácidos y CO<sub>2</sub> llevó a una fuerte acidificación del efluente y el pH se auto ajustó consistentemente a valores menores a 3, con un valor promedio de 2.7. La estrategia utilizada para la retención de la biomasa dentro del reactor fue la formación de flóculos. El sustrato utilizado fue agua residual a base de sacarosa, compuesta por azúcar demerara (Native®) y una solución de diversos nutrientes. Como inóculo se utilizó lodo granular de un reactor UASB de tratamiento de agua residual de un matadero de aves de corral (Pereiras, San Pablo, Brasil). El TRH fue de 4.6 horas y la TCO correspondiente fue de 25.0 gDQO L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>. La temperatura se mantuvo a 30 ± 2°C. El reactor presentó producción de H<sub>2</sub> constante y estable durante el período de operación (Mota *et al.*, 2018), siendo la producción volumétrica de H<sub>2</sub> (PVH) 175 ± 44 mLH<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> y el rendimiento 3.35 mol H<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup> sacarosa consumida.

Se tomaron dos muestras al final de la operación, una fue conservada a 4°C y otra a -70°C con glicerol como crioprotector. En nuestro laboratorio ambas muestras se mantuvieron a 4°C hasta el aislamiento de los microorganismos.

## Aislamiento de los microorganismos

Se utilizaron diferentes estrategias para aislar microorganismos anaerobios, aerobios y bacterias ácido lácticas de acuerdo a lo descrito en Fuentes *et al.* (2018).

### Aislamiento a partir de muestras del reactor termófilo

Para el aislamiento de microorganismos anaerobios a alta temperatura se utilizó el medio de cultivo PYG (Peptone Yeast Extract Glucose). El mismo se compone de 10 g/L glucosa (Sigma-Aldrich, MO, USA), 5 g/L extracto de levadura (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA),

5 g/L peptona (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 5 g/L extracto de carne (Frigonal, Uruguay) y el pH se ajustó a 6,8 con NaOH 10 M. Se aplicaron tres estrategias diferentes de aislamiento:

- Método 1. Dilución hasta extinción.

Se realizaron 3 diluciones seriadas 1:10 de cada muestra en viales con medio líquido PYG anaerobio (diluciones -1, -2 y -3). Estas diluciones fueron incubadas hasta que se observó crecimiento macroscópico. Posteriormente se transfirió 1 mL de cultivo, de la última dilución con evidencia de crecimiento macroscópico, a un vial con medio líquido PYG anaerobio que se incubó en las mismas condiciones. Dado que estos cultivos no crecieron, se optó por continuar trabajando con las diluciones originales. A partir de estas se procedió de dos maneras diferentes:

- 1a. Aislamiento por siembra en viales con medio sólido.

Se sembró 0,1 mL de los cultivos procedentes de las diluciones en viales con medio sólido PYG anaerobio suplementado con agar 15% (Sigma-Aldrich). Cuando se observó presencia de colonias aisladas se procedió a transferir estas colonias a viales con medio líquido PYG anaerobio. Para mantener las condiciones de anaerobiosis durante esta transferencia se utilizó una carpa para anaerobiosis (Captair Pyramid 2200 A, Erlab) con atmósfera de N<sub>2</sub> (99,99% Linde). Posteriormente, se tomaron muestras de los viales con crecimiento a partir de los cuales se realizó el re-aislamiento mediante estrías en placas de petri con medio PYG agar. Las placas se incubaron en jarra para anaerobiosis (Oxoid™ AnaeroJar™ 2.5L) con catalizador (Thermo Scientific AnaeroGen™ 2.5L) para la generación de la atmósfera anaeróbica.

- 1b. Aislamiento por estrías en placas.

A partir de los cultivos procedentes de las diluciones -1 se realizó el aislamiento mediante estrías en placas de petri con medio PYG agar que se incubaron en jarra para anaerobiosis. Las colonias crecidas se inocularon en viales con medio líquido, a partir de los cuáles se realizaron dos cultivos paralelos en viales con medio líquido PYG anaerobio. Uno de los cultivos se utilizó para la extracción de ADN y el otro para el análisis de H<sub>2</sub> en el gas producido por cromatografía de gases.

- Método 2. Siembra directa.

A cada muestra se le realizó siembra en estría en placas de petri con medio PYG sólido (suplementado con agar 13%). Las placas se incubaron en jarra para anaerobiosis con catalizador. En cada placa se aisló una colonia con morfología diferente utilizando el mismo método. Una vez crecidas las placas, se transfirió una colonia aislada a un vial con medio líquido PYG utilizando la carpa para anaerobiosis mencionada anteriormente. A partir de los viales que presentaron crecimiento se hicieron dos subcultivos: uno para extracción de ADN y otro para la detección de H<sub>2</sub> en el gas producido por cromatografía de gases.

- Método 3. Enriquecimiento y siembra en estría.

Cada una de las 4 muestras se sembraron en viales con medio líquido PYG anaerobio. Una vez observado crecimiento macroscópico, se realizó el aislamiento a partir de cada enriquecimiento mediante estriado en placas con medio PYG sólido anaerobio. Las placas se incubaron en jarra para anaerobiosis con catalizador. Las colonias obtenidas se reaislaron en

nuevas placas con el mismo medio que fueron incubadas en jarra anaerobia. Las colonias de estas placas luego se subcultivaron a viales con medio líquido PYG anaerobio.

Las temperaturas de incubación en todos los casos anteriores fueron termófilas, variando entre 60 y 70°C. Debido a que se logró aislar pocos microorganismos a altas temperaturas se decidió realizar los aislamientos en condiciones mesófilas y luego probar su capacidad de crecer a altas temperaturas.

- Método 4. Aislamiento de microorganismos anaerobios mesófilos.

Para el aislamiento de los microorganismos anaerobios a 37°C se utilizó el medio de cultivo PYG agar y se realizó siembra directa de las muestras en placas. Estas se incubaron en bolsas con un sistema de generación de gas para la incubación en atmósfera anaeróbica siguiendo las indicaciones del fabricante (Anaerocult® A mini, Merck, Alemania). Las colonias morfológicamente diferentes se transfirieron a viales con medio líquido. Estos viales quedaron reservados como stock de cepas. A partir de ellos se realizó otro repique a nuevos viales para extracción de ADN.

- Método 5. Aislamiento de microorganismos aerobios mesófilos.

Para aislar microorganismos aerobios se realizó siembra directa de cada muestra en placas con medio TSA (Acumedia, Lansing, MI, USA), las cuáles fueron incubadas en condiciones aerobias a 37°C. Las colonias morfológicamente diferentes se reaislaron sucesivas veces en placas con el mismo medio hasta obtenerlas de forma pura. Una vez aisladas se sembraron en tubos con medio TSB líquido (Oxoid, Hampshire, UK) y se incubaron con agitación a 37°C. A partir de estos tubos se tomaron 500 µl de cultivo que junto con el mismo volumen de glicerol (50% v/v) se guardaron a -80°C como stock de cepas. El resto del cultivo se centrifugó durante 2 minutos a 13.000 rpm y se reservó el pellet para su posterior extracción de ADN.

- Método 6. Aislamiento de bacterias ácido lácticas mesófilas.

Se realizó el aislamiento mediante siembra directa en placas con medio MRS sólido (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) que se incubaron a 37°C en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>. Para conservar las cepas y realizar la extracción de ADN se realizó el procedimiento descrito anteriormente para las bacterias aisladas en aerobiosis.

En la tabla 2 se resumen las estrategias de aislamiento utilizadas.

**Tabla 2.** Estrategias de aislamiento aplicadas a cada grupo objetivo de microorganismos del reactor termófilo.

Método	Grupo objetivo	Técnica	Medio	Atmósfera	Temp. (°C)
1	Anaerobios termófilos	Dilución hasta extinción	PYG	Anaerobia	60-70
2	Anaerobios termófilos	Siembra directa	PYG	Anaerobia	60-70
3	Anaerobios termófilos	Enriquecimiento/ siembra en placa	PYG	Anaerobia	60-70
4	Anaerobios mesófilos	Siembra directa	PYG	Anaerobia	37
5	Aerobios mesófilos	Siembra directa	TSA	Aerobia	37
6	Bacterias ácido lácticas mesófilas	Siembra directa	MRS	Aerobia enriquecida con CO <sub>2</sub>	37

### Aislamiento a partir de muestras del reactor acidófilo

Los microorganismos anaerobios se aislaron utilizando la técnica de dilución hasta extinción, mencionada anteriormente, en viales con medio PYS ajustado a pH 3 (igual composición del medio PYG a excepción de la glucosa que se sustituyó por 5 g/L de sacarosa (azúcar Bella Union). Se utilizó sacarosa como sustrato, ya que el reactor se alimentó con este carbohidrato. A partir de la última dilución que presentó crecimiento macroscópico se procedió a realizar el aislamiento mediante estrías en placas con medio PYS suplementado con agar (13%) a pH 7 (dado que el agar no solidificó a pH 3). Estas placas sembradas se incubaron en las bolsas con sistema de generación de gas para anaerobiosis mencionadas anteriormente. Se seleccionaron colonias de las placas y se transfirieron a viales con medio PYS líquido para la conservación de las cepas. Esta técnica se llevó a cabo utilizando las muestras con y sin tratamiento térmico previo (métodos 7 y 8, respectivamente). La aplicación del tratamiento térmico implica la exposición de las muestras a 90°C durante 15 minutos con el objetivo de eliminar las células vegetativas y seleccionar los microorganismos formadores de esporas (Fuentes et al., 2018). Además, se realizó siembra directa por estrías de las muestras en placas con medio PYS-agar a pH 7 incubadas en bolsas de anaerobiosis (método 9). Posteriormente se realizaron subcultivos de las colonias aisladas a viales con medio líquido para conservar las cepas.

Los microorganismos aerobios se aislaron mediante la técnica de siembra en placa a partir de las diluciones 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-8</sup> de las muestras con y sin tratamiento térmico (método 10 y 11, respectivamente). También se realizó siembra directa en placa de las muestras (método 12). Ambas estrategias se llevaron a cabo en medio sólido TSA en condiciones aerobias.

Las bacterias ácido lácticas se aislaron siguiendo el mismo procedimiento descrito para el reactor termófilo (método 13). En todos los casos la temperatura de incubación fue 30°C, temperatura a la que se operó el reactor.

En la tabla 3 se resumen las estrategias de aislamiento utilizadas.

**Tabla 3.** Estrategias de aislamiento aplicadas a cada grupo objetivo de microorganismos del reactor acidófilo.

Método	Grupo objetivo	Tratamiento térmico	Técnica	Medio	Atmósfera
7	Anaerobios	Si	Dilución hasta extinción/siembra placa	PYS pH 3/PYS pH 7	Anaerobia
8	Anaerobios	No	Dilución hasta extinción/siembra placa	PYS pH 3/PYS pH 7	Anaerobia
9	Anaerobios	No	Siembra directa	PYS pH 7	Anaerobia
10	Aerobios	Si	Dilución y siembra en placa	TSA	Aerobia
11	Aerobios	No	Dilución y siembra en placa	TSA	Aerobia
12	Aerobios	No	Siembra directa	TSA	Aerobia
13	Bacterias ácido lácticas	No	Siembra directa	MRS	Aerobia enriquecida con CO <sub>2</sub>

Para generar condiciones anaerobias en el interior de todos los viales con el medio de cultivo se gasearon con nitrógeno (99% Linde, Uruguay) durante 5 minutos y se sellaron con un tapón de goma y precinto metálico. Los medios de cultivo fueron luego esterilizados por autoclave (121°C, 20 minutos). Antes de ser inoculados se les inyectó solución reductora de sulfuro-cisteína (25 g/L L-cisteína y 25 g/L Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O) para eliminar cualquier posible resto de oxígeno. Esta solución fue previamente esterilizada por filtración, utilizando filtros de 0,22 micras (Minisart®, Sartorius).

## Caracterización filogenética de los aislamientos

La caracterización filogenética de los aislamientos se realizó mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. Para ello se realizó la extracción de ADN de los aislamientos utilizando el kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de cultivo crecido en medio líquido.

Se realizó la amplificación del gen por PCR, utilizando los siguientes reactivos como describió Castelló et al., 2009: 15,25 µL agua, 2,5 µL buffer 10x, 1,5 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,25 µL BSA, 2 µL dNTP mix 2,5 mM, 1 µL de cada primer y 0,5 µl Taq polimerasa. Los primers utilizados fueron 27-F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG y 1492-R GGTTACCTTGTTACGACTT 10 µM (Weisburg et al., 1991). Se utilizó 1 µL de ADN para llegar a un volumen final de reacción de 25 µL. El programa configurado en el termociclador (GeneAmp® PCR System 2400, Perkin

Elmer) comenzó por 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94 °C (1 minuto), 55°C (1 minuto) y 72°C (3 minutos), y finalizó con 7 minutos a 72°C. Para verificar que la reacción de amplificación se haya dado correctamente, 5 µL de cada mezcla de reacción se sembraron en un gel de agarosa 1% (Bioron, Alemania), utilizando Goodview (Sbs genetech Co., Ltd, China) como fluorocromo, *buffer* de carga (Thermofisher Scientific) como *buffer* de corrida y marcador de peso molecular (Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder, Thermofisher Scientific). La corrida electroforética se realizó a 100 mV. Una vez que se verificó el tamaño correcto del producto de PCR de 1,5 Kb, los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (Seoul, Corea). Las secuencias del gen ARNr 16S de cada aislamiento se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando la herramienta BLAST de nucleótidos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## Crecimiento en condiciones extremas de temperatura y pH de los aislamientos

Debido a la dificultad de obtener aislamientos a altas temperaturas, parte de los aislamientos del reactor termófilo fueron aislados a temperaturas mesófilas y se testeó posteriormente su capacidad de crecer a alta temperatura.

En el caso de los aislamientos anaerobios se repicó cada cepa a dos placas de petri con medio PYG agar que se incubaron en jarra para anaerobiosis a 37°C (como control positivo) y a 60°C.

En el caso de los aislamientos aerobios, se repicaron a placas con medio TSA, que luego se incubaron en condiciones aerobias a 37°C como control positivo. Las colonias crecidas se repicaron a viales con medio PYG líquido y se incubaron a 60°C. También se realizó la siembra de las cepas en placas con medio TSA tanto a 37°C (como control) como a 60°C en condiciones aerobias en frasco de vidrio para evitar la desecación.

Las cepas ácido lácticas se repicaron a placas con medio MRS que se incubaron en condiciones aerobias a 70°C en un frasco de vidrio para protegerlas de la desecación. Se realizó el mismo procedimiento (excepto por el frasco) pero a 37°C como control positivo. De esta manera se estudió el crecimiento de estas cepas a alta temperatura en medio sólido y con presencia de oxígeno. Las cepas lácticas también se cultivaron en placas con medio PYG y se incubaron a 37°C en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>, a partir de las que se subcultivaron a viales con medio PYG líquido, los cuales se incubaron a 60°C. De esta forma se analizó el crecimiento de estas cepas a alta temperatura en medio líquido en anaerobiosis.

Debido a la dificultad también de obtener aislamientos a pH 3, parte de los aislamientos del reactor acidófilo se realizaron a pH neutro y se estudió posteriormente la capacidad de crecimiento a pH 3. Para esto, los aislamientos se cultivaron en viales con medio PYS líquido a pH 3 y 30°C hasta observar crecimiento macroscópico.

## Estudio de la capacidad de producir H<sub>2</sub> de los aislamientos

Uno de los objetivos del trabajo fue aislar microorganismos que pudieran producir H<sub>2</sub> a altas temperaturas y a bajos pH, por lo que se estudió la capacidad de producir H<sub>2</sub> de los aislamientos obtenidos en esas condiciones extremas.

Por un lado, se estudió la capacidad de producción de H<sub>2</sub> en los aislamientos obtenidos en anaerobiosis a alta temperatura. Para esto los aislamientos se cultivaron en viales con medio PYG líquido a la misma temperatura en la que fueron aislados. Una vez observado el crecimiento en el cultivo, se analizó la composición del biogás producido utilizando un cromatógrafo de gases (SRI 310C Gas Chromatograph) equipado con una columna 6' Hayesep-D column (SRI Instruments, CA, USA) y un detector TCD. La temperatura de la columna fue de 30°C. Por otro lado, también se estudió la capacidad de producción de H<sub>2</sub> tanto en condiciones mesófilas (37°C) como termófilas (60°C) de las cepas aisladas en anaerobiosis a 37°C. Para esto, las cepas se repicaron a viales con medio líquido PYG. La producción de H<sub>2</sub> se determinó de la misma forma previamente mencionada.

Además, se estudió la capacidad de producir H<sub>2</sub> de los aislamientos obtenidos en condiciones anaerobias del reactor acidófilo. Los microorganismos se cultivaron en viales con medio líquido PYS a pH 3. Una vez detectado crecimiento macroscópico, se determinó la producción de H<sub>2</sub> por análisis de la composición del biogás producido mediante cromatografía de gases.

## Análisis de la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S

Se realizó el análisis de la comunidad microbiana de muestras tomadas de ambos reactores mediante la secuenciación masiva del gen ARNr 16S. En el caso del reactor acidófilo el análisis fue realizado por Mota *et al.* (2018) a partir de una muestra tomada al final de la operación. En el caso del reactor termófilo el ensayo se llevó a cabo en el marco de este trabajo. Para ello, las muestras destinadas a la extracción de ADN se descongelaron y centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 minutos. Se utilizó 250 mg del lodo centrifugado para extraer el ADN usando un kit comercial (ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se verificó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa como ya fue explicado. Posteriormente se amplificó la región V4 del gen ARNr 16S por PCR con los primers 520f AYTGGGYDTAAAGNG y 802r TACNVGGGTATCTAATCC (Claesson *et al.*, 2009). Se utilizaron 12,5 µL de RANGER Mix (Bioline), 0,5 µL de cada primer, 10 µL de agua y 1,5 µL de ADN para un volumen final de 25 µL. El ciclo de PCR consistió de una primera etapa a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C (30 segundos), 55°C (30 segundos), 72°C (90 segundos), y por último 10 minutos a 72°C. Los adaptadores y barcodes para la secuenciación en Ion Torrent se incluyeron en los oligómeros de los primers siguiendo la estrategia descrita por Claesson *et al.* (2009). Se verificó el tamaño de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% como ya fue explicado. Los productos de PCR de tamaño esperado se purificaron a partir de la extracción de banda del gel utilizando un kit comercial (ZR Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, USA). La secuenciación de las librerías de amplicones del gen ARNr 16S se llevó a cabo en el Ion Torrent Personal Genome Machine en la plataforma del IIBCE. El análisis de los datos crudos se realizó con el paquete de software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (Caporaso *et al.*, 2010). El filtrado de calidad de los reads consistió en una longitud mínima de secuencia de 200 pb y un quality score Q>25. El control de quimeras se realizó usando USEARCH6.1 (Edgar, 2013) y los OTUs se crearon *de novo* usando un criterio de similitud del 97%. Las secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo PyNASt. La asignación taxonómica fue llevada a cabo mediante el algoritmo UCLAST (Caporaso *et al.*, 2010) usando la base de datos curada de ARNr 16S de Greengenes (Zhang *et al.*, 2016a).

Con el objetivo de determinar si los aislamientos obtenidos corresponden con la secuenciación masiva de las muestras, se construyeron árboles filogenéticos con las secuencias del gen ARNr 16S de los aislamientos y de las OTUs correspondientes a los géneros más abundantes obtenidos por secuenciación masiva. Además, se incluyeron secuencias del gen ARN 16S que presentaron alta homología con las secuencias de los aislamientos y las OTUs según los resultados del BLAST. Se construyeron árboles separados para los aislamientos de bacterias ácido lácticas y de microorganismos termófilos productores de H<sub>2</sub>. El árbol de las bacterias ácido lácticas incluyó los aislamientos y las OTUs. Sin embargo, en el caso de las bacterias termófilas productoras de H<sub>2</sub> se construyó un árbol para los aislamientos y otro para las OTUs, siendo el resto de los microorganismos los mismos para ambos árboles. Esto se debió a que las secuencias de los aislamientos no fueron de buena calidad y el segmento que se seleccionó para trabajar no coincidió con la secuencia obtenida por secuenciación masiva. Todos los árboles fueron inferidos por el método Neighbor-Joining con un valor de bootstrap de 1.000, utilizando el software MEGA 7. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Maximum Composite Likelihood.

## Resultados

### Aislamiento y caracterización filogenética de los microorganismos

#### Aislamientos del reactor termófilo

En total se obtuvieron 27 aislamientos, de los cuales 10 se obtuvieron en condiciones anaerobias (3 fueron aislados a alta temperatura y 7 fueron aislados a 37°C); otras 10 cepas fueron aisladas en condiciones aerobias y 7 fueron aisladas en condiciones específicas para bacterias ácido lácticas (Tabla 4). Todos los microorganismos aislados se obtuvieron mediante la técnica de siembra directa. No se lograron aislar microorganismos mediante la técnica de dilución hasta extinción y mediante la técnica de enriquecimiento, ya que los cultivos en medio líquido al cabo de un tiempo dejaron de crecer no permitiendo continuar con las siguientes etapas de aislamiento.

**Tabla 4.** Aislamientos del reactor termófilo y su capacidad de crecimiento a alta temperatura y producción de H<sub>2</sub>. Métodos 2 y 4: siembra directa en anaerobiosis a 60-70 y 37°C, respectivamente. Método 5: siembra directa en aerobiosis a 37°C. Método 6: siembra directa en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub> a 37°C.

Método	Grupo	n° cepas	Producción H <sub>2</sub> a 37°C	Crecimiento a alta temp.	Producción H <sub>2</sub> a alta temp.
2	Anaerobios	3	-	Si	Si
4	Anaerobios	7	No	No	No
5	Aerobios	10	No	No	No
6	Bacterias	7	-	No	No

El guion (-) indica que el análisis correspondiente no se realizó en este trabajo.

De todos los aislamientos obtenidos, se seleccionaron los microorganismos anaerobios termófilos y las bacterias ácido lácticas para ser caracterizados filogenéticamente mediante secuenciación del gen del ARNr 16S. Esta selección se realizó según los datos obtenidos de los análisis de las comunidades microbianas, de la secuenciación masiva del gen del ARNr 16S, que indicaba que estos grupos fueron los más importantes. De estos microorganismos seleccionados, se lograron caracterizar 2 aislamientos termófilos y 6 aislamientos de bacterias ácido lácticas.

Según la comparación de las secuencias obtenidas de los aislamientos con secuencias de la base de datos NCBI, los microorganismos anaerobios termófilos presentaron alto porcentaje de identidad con secuencias del gen ARNr 16S de cepas de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* y con secuencias provenientes de bandas de DGGE de la comunidad microbiana de un quimiostato termófilo (55°C) de producción de H<sub>2</sub> (Zhang et al., 2016a) (Tabla 5). Además, uno de los aislamientos presentó una secuencia con un alto porcentaje de homología con la secuencia de una cepa de *Thermohydrogenium kirishiense*. Las bacterias ácido lácticas se clasificaron como pertenecientes al género *Lactobacillus* (Tabla 6). Específicamente, una de las cepas se clasificó como *Lactobacillus harbinensis* y dos como *Lactobacillus paracasei*, mientras que los otros tres aislamientos presentaron secuencias con el mismo porcentaje de identidad con las secuencias de las especies *L. paracasei* y *L. casei*.

**Tabla 5.** Caracterización filogenética por secuenciación del gen ARNr 16S de los aislamientos anaerobios termófilos del reactor termófilo. Se indica el nombre, porcentaje de homología y el número de acceso de las secuencias relacionadas de acuerdo al análisis de BLAST.

Aislamiento	Descripción	% homología	n° acceso
63	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> Y-1	99,36	KM036188.1
63	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band clone 20	99,36	KT185045.1
64	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> Y-1	99,73	KM036188.1
64	Uncultured bacterium isolate DGGE gel band clone 20	99,46	KT185045.1
64	<i>Thermohydrogenium kirishiense</i> ZE-7	99,73	NR_104808.1

**Tabla 6.** Caracterización filogenética por secuenciación del gen ARNr 16S de las bacterias ácido lácticas del reactor termófilo. Se indica nombre, porcentaje de homología y número de acceso de las secuencias más parecidas proporcionados por BLAST.

Aislamiento	Descripción	% homología	n° acceso
55	<i>Lactobacillus harbinensis</i> HBUAS53069	99,43	MH393143.1
56	<i>Lactobacillus casei</i> CE28.4	99,79	MH899338.1
56	<i>Lactobacillus paracasei</i> TSGB1266	99,79	MN255766.1
57	<i>Lactobacillus casei</i> CE28.4	99,69	MH899338.1
57	<i>Lactobacillus paracasei</i> KU-104	99,69	MG815835.1
58	<i>Lactobacillus paracasei</i> MRTL4	99,41	KC456365.1
59	<i>Lactobacillus paracasei</i> UP2F	97,96	MK071312.1
60	<i>Lactobacillus paracasei</i> UP2F	99,67	MK071312.1
60	<i>Lactobacillus casei</i> ChOPR-I-str35	99,67	HM462414.1

### Aislamientos del reactor acidófilo

En este caso fue posible aislar microorganismos aplicando todas las técnicas utilizadas. Se aislaron 31 microorganismos en total, de los cuales 14 se aislaron en condiciones anaerobias, 13 en condiciones aerobias y 4 en las condiciones específicas para las bacterias ácido lácticas (Tabla 7).

De acuerdo al análisis de las secuencias del gen del ARNr 16S de los aislamientos, las secuencias de las cepas obtenidas en condiciones anaerobias presentaron alta homología con secuencias del género *Clostridium*, excepto por un aislamiento que fue clasificado como una cepa de *Cutibacterium acnes* (Tabla 8). Dentro del género *Clostridium*, 11 aislamientos fueron clasificados como *Clostridium guangxiense* y 2 como *Clostridium carboxidivorans*.

En cuanto a los aislamientos aerobios, 11 fueron clasificados como *Lysinibacillus pakistanensis* pero las secuencias fueron de muy mala calidad, pudiéndose tratar de una contaminación, por lo que habría que repetir la caracterización. De las dos cepas restantes una fue clasificada como *Paenibacillus favisporus* y otra como *Bacillus fortis*.

Los aislamientos obtenidos a partir de la estrategia de selección de bacterias ácido lácticas se clasificaron como *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus casei*. Al igual que en el caso del reactor termófilo, tres de las cepas presentaron el mismo porcentaje de identidad con ambas especies, por lo que no se pudo diferenciar a cuál de las especies pertenecen.

**Tabla 7.** Aislamientos del reactor acidófilo y su capacidad de crecimiento y producción de H<sub>2</sub> a pH 3. Métodos 7 y 8: dilución hasta extinción y siembra en placa en anaerobiosis con y sin tratamiento térmico, respectivamente. Método 9: siembra directa en anaerobiosis. Métodos 10 y 11: dilución y siembra en placa en aerobiosis con y sin tratamiento térmico, respectivamente. Método 12: siembra directa en aerobiosis. Método 13: siembra directa en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>.

Método	Grupo	n° cepas	Crecimiento a pH 3	n° cepas productoras de H <sub>2</sub> a pH 3
7	Anaerobios	7	Si	5
8	Anaerobios	3	Si	0
9	Anaerobios	4	Si	2
10	Aerobios	2	No	-
11	Aerobios	6	No	-
12	Aerobios	5	No	-
13	Bacterias ácido lácticas	4	-	-

El guion (-) indica que el análisis correspondiente no se realizó en este trabajo.

**Tabla 8.** Caracterización filogenética por secuenciación del gen ARNr 16S de los aislamientos del reactor acidófilo. Se indica nombre, porcentaje de homología y número de acceso de la secuencia más parecida, proporcionado por la herramienta BLAST.

Grupo	Aislamiento	Descripción	% homología	n° acceso
Anaerobios	S1	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Anaerobios	S2	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Anaerobios	S3	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Anaerobios	S4	<i>Clostridium carboxidivorans</i> P7	94	NR_104768.1
Anaerobios	S5	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Anaerobios	S6	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Anaerobios	S7	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1

Anaerobios	S8	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Anaerobios	S9	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Anaerobios	S10	<i>Cutibacterium acnes</i> ATCC 6919	86	NR_040847.1
Anaerobios	S11	<i>Clostridium carboxidivorans</i> P7	94	NR_104768.1
Anaerobios	S12	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Anaerobios	S13	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Anaerobios	S14	<i>Clostridium guangxiense</i> ZGM211	99	NR_156155.1
Aerobios	1	<i>Paenibacillus favisporus</i> GMP01	99	NR_029071.1
Aerobios	7	<i>Bacillus fortis</i> R-6514	98	NR_042905.1
Bacterias lácticas	48	<i>Lactobacillus casei</i> cw3	99,4	MF191597.1
Bacterias lácticas	50	<i>Lactobacillus paracasei</i> TSGB1229	100	MN255545.1
Bacterias lácticas	50	<i>Lactobacillus casei</i> TSGB1198	100	MN250811.1
Bacterias lácticas	53	<i>Lactobacillus paracasei</i> TSGB1229	99	MN255545.1
Bacterias lácticas	53	<i>Lactobacillus casei</i> TSGB1198	99	MN250811.1
Bacterias lácticas	54	<i>Lactobacillus paracasei</i> HBUAS53078	99,8	MH393152.1
Bacterias lácticas	54	<i>Lactobacillus casei</i> YQ116	99,8	MF083138.1

## Crecimiento en condiciones extremas y análisis de la producción de H<sub>2</sub> de los aislamientos

### Aislamientos del reactor termófilo

En condiciones de alta temperatura no hubo crecimiento de ninguno de los aislamientos obtenidos a 37°C (Tabla 4). Con respecto a la producción de H<sub>2</sub>, los tres microorganismos

aislados en anaerobiosis a alta temperatura fueron capaces de producir H<sub>2</sub> a alta temperatura, pero los que se aislaron a 37°C no fueron capaces de producir H<sub>2</sub> a temperatura mesófila ni termófila (Tabla 4).

## Aislamientos del reactor acidófilo

Todos los aislamientos realizados en condiciones anaerobias fueron capaces de crecer a pH 3, mientras que no se observó crecimiento de los aislamientos aerobios en medio PYS a pH 3 (Tabla 7). En total 7 aislamientos anaerobios fueron capaces de producir H<sub>2</sub> en medio PYS a pH 3. Estos resultaron ser microorganismos clasificados dentro de la especie *Clostridium guangxiense*.

## Análisis de la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva del gen ARNr 16S

En este trabajo se analizó la comunidad microbiana del reactor termófilo, la comunidad microbiana del reactor acidófilo ya fue analizada en el trabajo publicado por Mota et al., (2018). Se analizaron tres muestras que correspondieron a biomasa suspendida tomada del reactor durante la operación con la vinaza V3 (BS V3), biomasa suspendida tomada del reactor al final de la operación con la vinaza V4 (BS V4) y biomasa adherida al soporte tomada del reactor al final de la operación con la vinaza V4 (BA V4). Se obtuvieron 514.173 *reads*, de los cuales 253.367 correspondieron a la muestra BS V3, 118.158 a BS V4 y 142.648 a BA V4.

La clasificación de los *reads* a nivel de filo mostró la dominancia del filo Firmicutes en las tres muestras analizadas (fig. 4). El filo Proteobacteria también se observó en la muestra BS V3, donde presentó una abundancia relativa de 21,9% (fig. 4).

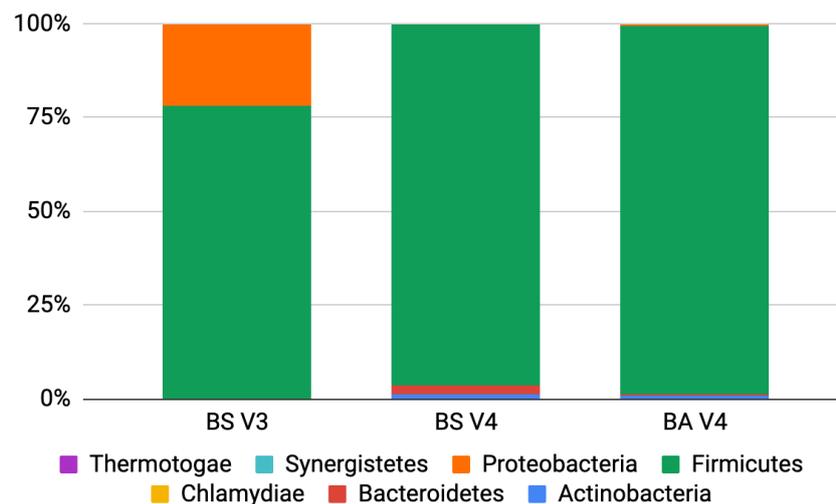
La clasificación de los *reads* a nivel de género o familia reveló la presencia de microorganismos productores de H<sub>2</sub> como *Caldanaerobius*, *Caproiciproducens*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Ruminiclostridium* y *Thermoanaerobacterium*. Las bacterias ácido lácticas también estuvieron presentes (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*). Además, se detectaron microorganismos pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Dialister* y *Prevotella*.

Los resultados indicaron diferencias en las abundancias relativas de los microorganismos en las tres muestras analizadas. En la muestra BS V3 *Lactobacillus* fue el género predominante (36,6%). En cambio, en la muestra BS V4 se destacó el género *Pectinatus* (32,4%) y en la muestra BA V4 *Clostridium* (33%). A pesar de los cambios registrados, *Lactobacillus* y *Clostridium* presentaron altas abundancias relativas en las tres muestras analizadas (Tabla 9).

La comunidad microbiana presente en suspensión con la vinaza V3 (BS V3) presentó diferencias con respecto a la comunidad microbiana presente en suspensión con la vinaza V4 (BS V4). El género *Acetobacter* se observó en la muestra BS V3 con una alta abundancia relativa de 19,7%. Sin embargo, este género no fue detectado en la muestra BS V4. *Lactobacillus* también presentó una gran diferencia en su abundancia relativa entre ambas muestras, siendo 36,6% en BS V3 y 13,6% en BS V4. *Caldanaerobius*, *Dialister*, *Leuconostoc* y las enterobacterias también presentaron mayor abundancia relativa en BS V3, pero la diferencia fue menor. En cambio, los géneros *Megasphaera* y *Pectinatus* presentaron abundancias relativas mucho mayores en la comunidad suspendida con V4 (BS V4) (20 y

32,4%, respectivamente) en comparación con la comunidad suspendida con V3 (BS V3) (0,9 y 0,1%, respectivamente). La abundancia relativa del género *Clostridium* fue igualmente alta en ambas muestras.

También se observaron diferencias entre la comunidad microbiana en suspensión y la adherida al soporte interno del reactor con la vinaza V4 (BS V4 y BA V4, respectivamente). Por ejemplo, los géneros *Caldanaerobius*, *Caproiciproducens*, *Clostridium* y *Thermoanaerobacterium* se destacaron por presentar una alta abundancia relativa en la comunidad adherida. En cambio, los géneros *Megasphaera* y *Pectinatus*, que presentaron bajas abundancias relativas en la comunidad adherida, se destacaron en la suspendida. La abundancia relativa de *Lactobacillus*, si bien no fue baja en la comunidad adherida, también fue mayor en la suspendida.



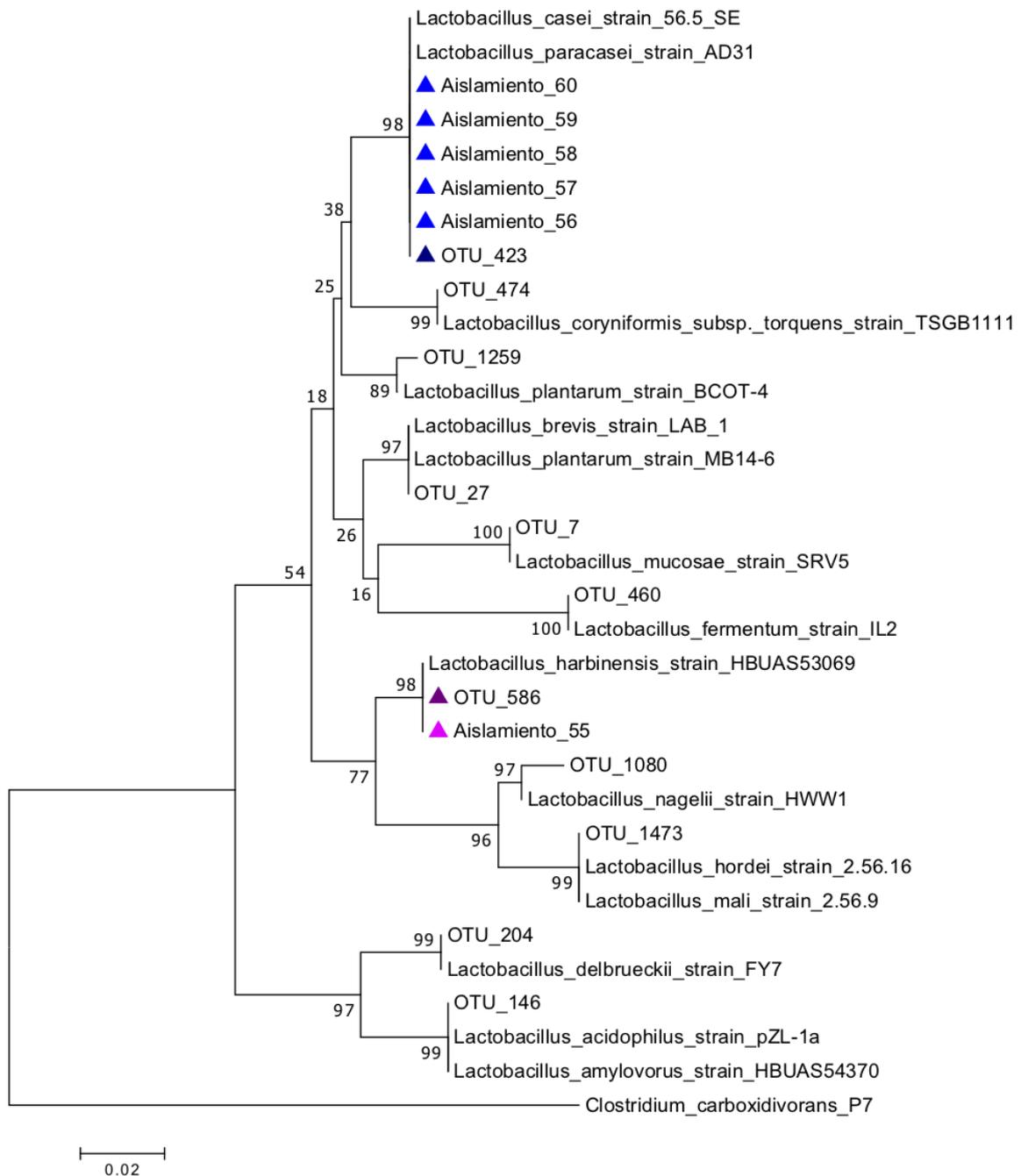
**Figura 4.** Abundancia relativa (%) de los microorganismos clasificados a nivel de filo de acuerdo al análisis de secuenciación masiva del gen ARNr 16S de las tres muestras del reactor termófilo. Se muestran los fillos con abundancia relativa > 0.1% en al menos una muestra. BS V3: biomasa suspendida vinaza 3. BSV4: biomasa suspendida vinaza 4. BA V4: biomasa adherida vinaza 4.

**Tabla 9.** Abundancia relativa (%) de los microorganismos clasificados a nivel de género o familia por el análisis de secuenciación masiva del gen ARNr 16S de las tres muestras del reactor termófilo. Se presentan los géneros/familias con abundancia relativa >1% en al menos una muestra, el filo correspondiente y su capacidad de producir H<sub>2</sub> de acuerdo con la bibliografía (Vos et al., 2011). BS V3: biomasa suspendida vinaza 3. BSV4: biomasa suspendida vinaza 4. BA V4: biomasa adherida vinaza 4.

Filo	Género/Familia	BS V3 (%)	BS V4 (%)	BA V4 (%)	H <sub>2</sub>
Proteobacteria	<i>Acetobacter</i>	19,7	0	0	No
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	0,2	1,1	0,7	No
Firmicutes	<i>Caldanaerobius</i>	9,3	3,2	15,6	Si
Firmicutes	<i>Caproiciproducens</i>	0,1	1,6	15,5	Si
Firmicutes	<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	0	2,1	2,5	Si
Firmicutes	<i>Clostridium sensu stricto 12</i>	20,8	20,5	33	Si
Firmicutes	<i>Dialister</i>	4,1	0,2	0,1	No
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	2	0	0	Si
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	36,6	13,6	7,9	No
Firmicutes	<i>Leuconostoc</i>	3,7	0,7	1,8	No
Firmicutes	<i>Megasphaera</i>	0,9	20	1,8	Si
Firmicutes	<i>Pectinatus</i>	0,1	32,4	3,5	Si
Bacteroidetes	<i>Prevotella 7</i>	0	2,3	0,5	No
Firmicutes	<i>Ruminiclostridium</i>	0	0,4	4,5	Si
Firmicutes	<i>Thermoanaerobacterium</i>	1,2	0,7	8,4	Si

Se obtuvieron 874 OTUs sin incluir secuencias únicas, de las cuales 184 fueron asignadas al género *Lactobacillus* y 32 al género *Thermoanaerobacterium*. Ninguna OTU fue asignada al género *Thermohydrogenium*.

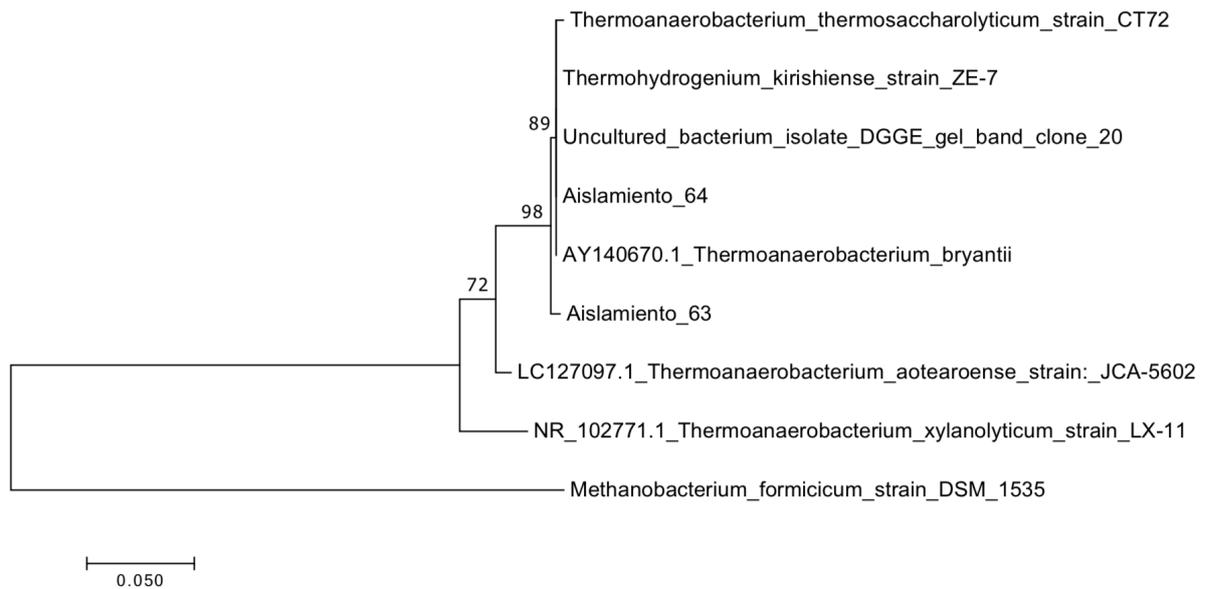
Para poder comparar las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva y las secuencias de los aislamientos, se realizó un árbol filogenético con ambos grupos de secuencias. Las secuencias de los aislamientos de bacterias ácido lácticas se agruparon en dos clusters diferentes, cada uno de ellos conteniendo una secuencia de OTU asignada al género *Lactobacillus* distinta (fig. 4). Las secuencias de los aislamientos clasificados como *L. paracasei* o *L. casei* se agruparon con la secuencia representativa de la OTU 423 y la secuencia del aislamiento clasificado como *L. harbinensis* se agrupó con la secuencia de la OTU 586 (fig. 4).



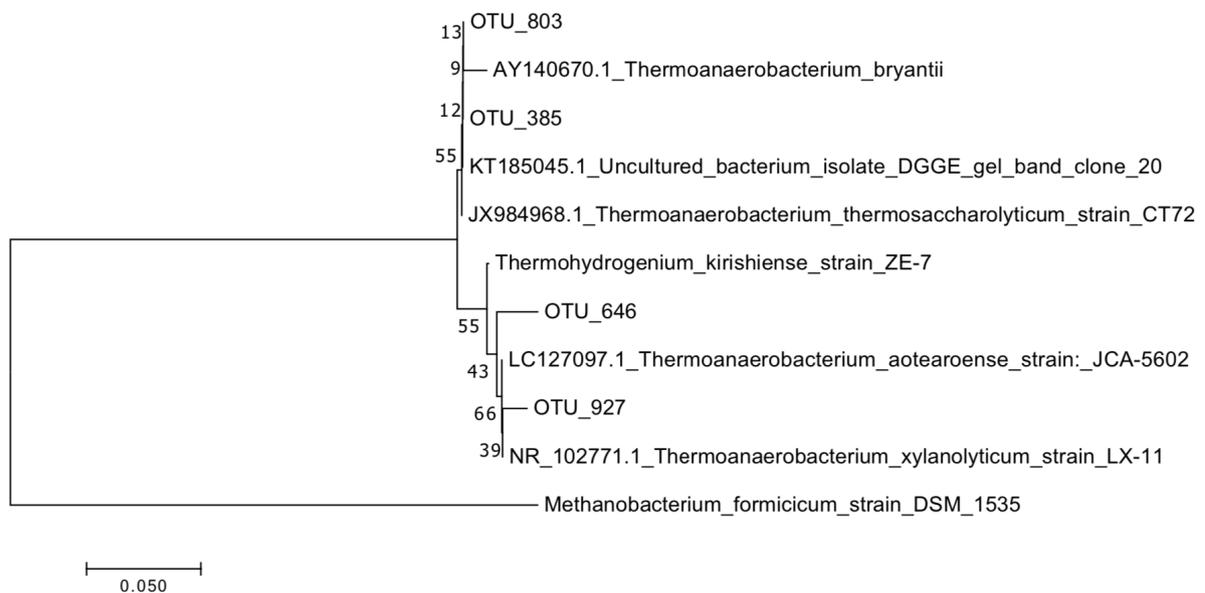
**Figura 4.** Relaciones evolutivas de los aislamientos de bacterias ácido lácticas (triángulos rosados) y las OTU más abundantes del género *Lactobacillus* (triángulos violetas) obtenidas por secuenciación masiva del gen ARNr 16S del reactor termófilo. La secuencia del gen ARNr 16S de *Clostridium carboxidivorans* P7 se utilizó como grupo externo.

Los aislamientos de bacterias termófilas productoras de H<sub>2</sub> se agruparon con *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermohydrogenium kirishiense*, *Thermoanaerobacterium bryantii* y con el aislamiento no cultivado del quimiostato termófilo para la producción de H<sub>2</sub> a partir de vinaza de caña de azúcar (fig. 5). Las OTUs 803 y 385 se agruparon con los mismos microorganismos, a excepción de *Thermohydrogenium kirishiense* (fig. 5).

A)



B)



**Figura 5.** Relaciones evolutivas de los A) aislamientos de bacterias termófilas productoras de H<sub>2</sub> y de las B) OTUs más abundantes del género *Thermoanaerobacterium* obtenidas por secuenciación masiva del gen ARNr 16S del reactor termófilo. La secuencia del gen ARNr 16S de *Methanobacterium formicicum* DSM 1535 se utilizó como grupo externo.

# Discusión

## Aislamiento a partir de muestras del reactor termófilo

### Efectividad de las técnicas de aislamiento aplicadas

El aislamiento utilizando condiciones termófilas presentó varias dificultades. El uso de medios de cultivo sólidos se vio limitado, ya que al exponerlos a alta temperatura el agar se fundió. Sin embargo, en este trabajo se logró sortear estas dificultades protegiendo las placas en recipientes herméticos para evitar que se sequen (como la jarra para anaerobiosis) o al suplementar el medio con un porcentaje de agar mayor (como en el caso de los viales con medio PYG sólido).

La termofilia también presentó inconvenientes a la hora de conservar las cepas. En este trabajo se optó por conservarlas en viales anaerobios con el mismo medio en el que fueron aisladas pero a temperatura ambiente. Sin embargo, pasado un tiempo las cepas perdieron la capacidad de crecer al ser repicadas a partir de dichos viales stock, lo que podría significar que los microorganismos termófilos murieron al estar expuestos a temperatura ambiente. Para futuros trabajos que impliquen el aislamiento de microorganismos termófilos es importante establecer formas más apropiadas de almacenamiento de las cepas.

En cuanto a las estrategias de aislamiento utilizadas, la siembra directa resultó ser la técnica más apropiada para aislar los microorganismos de este reactor. También cabe destacar la efectividad del método de selección de bacterias ácido lácticas (medio MRS y atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>), ya que mediante este método se aislaron únicamente microorganismos del género *Lactobacillus*. Sin embargo, no se aislaron microorganismos de otros géneros, como *Leuconostoc*. Una posible explicación es la menor proporción en la que estaban presentes en el reactor, al menos en las muestras analizadas por secuenciación masiva, en relación al género *Lactobacillus* que fue más abundante. En base a esto, puede plantearse como estrategia para aislar una mayor diversidad de bacterias ácido lácticas el enriquecimiento de las muestras previamente a la siembra en placa. En relación al aislamiento de microorganismos capaces de producir H<sub>2</sub>, dado que por secuenciación masiva se detectaron géneros de microorganismos productores de H<sub>2</sub> formadores de esporas, como *Clostridium* y *Ruminiclostridium*, incluir el tratamiento térmico de las muestras antes de la siembra en placa podría representar una buena estrategia de selección.

### Características de los aislamientos obtenidos

Mediante las distintas técnicas aplicadas se aislaron microorganismos caracterizados como *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermohydrogenium kirishiense*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus harbinensis*.

A pesar de que uno de los aislamientos termófilos productores de H<sub>2</sub> presentó un alto porcentaje de identidad con una cepa de *T. kirishiense*, ninguna OTU obtenida por secuenciación masiva fue clasificada dentro de ese género. Esto podría deberse a que *T. kirishiense* estuviera en baja proporción en el reactor, por lo que no se habría detectado mediante secuenciación masiva. También podría explicarse por el hecho de que se utilizaron

diferentes bases de datos para cada caso (NCBI para la caracterización de los aislamientos y Greengenes para la secuenciación masiva).

Tanto *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* como *Thermohydrogenium kirishiense* son microorganismos anaerobios, termófilos y productores de H<sub>2</sub> (Vos et al., 2011; Zacharova et al., 1993). Ambos han sido reportados en diversos sistemas de producción de H<sub>2</sub>, operados a base de diferentes sustratos e inóculos (Lazaro et al. 2014; O-Thong et al., 2008; Ueno et al., 2001; Lebuhn et al., 2014; Ratti et al., 2015; Ottaviano et al., 2017). Específicamente, *T. thermosaccharolyticum* fue reportado en sistemas que, al igual que el reactor de este trabajo, utilizan vinaza de caña de azúcar como sustrato y como inóculo (Ferraz et al., 2014; Ferraz et al., 2015a; Fuess et al., 2018). La recurrencia de este microorganismo en reactores alimentados con vinaza de caña de azúcar podría indicar que este desecho es un buen inóculo para la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura a alta temperatura, ya que *T. thermosaccharolyticum* es un microorganismo productor de H<sub>2</sub> con un óptimo de crecimiento a 55-62°C (Vos et al., 2011).

El género *Lactobacillus* está compuesto por 145 especies (Sikora et al., 2013), las cuales se caracterizan por su metabolismo fermentativo, no formar esporas y ser anaerobias facultativas (Vos et al., 2011). Su crecimiento en la superficie de un medio sólido es potenciado por una atmósfera anaeróbica o de baja presión de oxígeno y 5-10% CO<sub>2</sub> (Vos et al., 2011). Específicamente *L. paracasei*, *L. casei* y *L. harbinensis*, son microorganismos heterolácticos facultativos, es decir que producen lactato, etanol y CO<sub>2</sub> por la fermentación de los carbohidratos (Vos et al., 2011; Miyamoto et al., 2005; Sikora et al., 2013). Las bacterias ácido lácticas se encuentran frecuentemente en sistemas de producción de H<sub>2</sub> (incluidos los termófilos), pero su rol aún no ha sido entendido del todo ya que existen evidencias tanto de efectos positivos como negativos sobre la producción de H<sub>2</sub> (Fuess et al., 2018). El aislamiento de estos microorganismos permite realizar ensayos de co-cultivo con microorganismos productores de H<sub>2</sub> bajo diferentes condiciones, lo que podría llevar a responder algunas preguntas sobre el papel de las bacterias ácido lácticas en la producción de H<sub>2</sub>. Por ejemplo, Fuentes et al. (2018) mediante ensayos de co-cultivo evaluaron el efecto de una cepa de *Lactobacillus* sobre la producción de H<sub>2</sub> de cepas de *Megasphaera* y *Clostridium*, todas aisladas de un reactor de producción de H<sub>2</sub> a partir de suero de queso. Los resultados indicaron que la cepa de *Lactobacillus* inhibió completamente la producción de H<sub>2</sub> por *Clostridium*. Sin embargo, cuando la cepa de *Megasphaera* fue incorporada la inhibición no fue completa, detectándose producción de H<sub>2</sub>, lo que podría explicarse por la capacidad de *Megasphaera* de consumir ácido láctico. Estos resultados permiten avanzar en la síntesis de inóculos definidos para la producción estable de H<sub>2</sub> utilizando efluentes industriales.

## Crecimiento en condiciones extremas y análisis de producción de H<sub>2</sub> de los aislamientos

Los microorganismos aislados a 37°C, tanto aerobios como anaerobios, no crecieron al incubarse a alta temperatura. Esto podría deberse a las condiciones en las cuáles se incubaron o que dichos microorganismos requieren establecer relaciones sintróficas con otros para desarrollarse a alta temperatura. Los aislamientos de bacterias lácticas tampoco crecieron a alta temperatura. A pesar de que la mayoría crece mejor a temperaturas mesófilas, con un límite superior de aproximadamente 40°C, están reportados lactobacilos termófilos que presentan crecimiento hasta los 55°C (Vos et al., 2011). A pesar de dicho límite

de temperatura, el género *Lactobacillus* fue abundante en el reactor termófilo operado a 70°C, lo que podría indicar que los lactobacilos son capaces de crecer a mayor temperatura. Los aislamientos de bacterias lácticas se agruparon con dos de las OTUs más abundantes asignadas al género *Lactobacillus*, las cuales podrían no corresponder con las OTUs de microorganismos termófilos de dicho género. Por lo tanto, la ausencia de crecimiento de los aislamientos lácticos a alta temperatura podría deberse, además de las posibles causas ya mencionadas, a que los microorganismos del género *Lactobacillus* aislados no fueran termófilos sino mesófilos. Esto pudo haber sido causado por la temperatura de incubación (37°C) aplicada para su aislamiento, bajo la cual las bacterias ácido lácticas termófilas quizás crecen mucho más lento que las mesófilas, o directamente no crecen. Para seleccionar y aislar bacterias ácido lácticas termófilas, se podría aplicar la estrategia que se utilizó (método 6) pero a alta temperatura directamente, impidiendo el crecimiento de bacterias mesófilas. Los aislamientos anaerobios aislados a 37°C no produjeron H<sub>2</sub> a 37°C. Esto también podría deberse a las condiciones de incubación o que se tratara de microorganismos no productores de H<sub>2</sub>. Por ejemplo, podrían corresponder a los géneros de microorganismos anaerobios no productores de H<sub>2</sub> *Dialister* o *Prevotella*, detectados por secuenciación masiva.

## Análisis de la comunidad microbiana de muestras del reactor termófilo mediante secuenciación masiva del gen del ARNr 16S

### Diversidad microbiana detectada

El filo Firmicutes, predominante en las tres muestras analizadas, representa el filo más relacionado a la producción de H<sub>2</sub> en las fermentaciones acidogénicas (Ottaviano et al., 2017).

Dentro de los microorganismos productores de H<sub>2</sub> se destacaron los géneros *Caldanaerobius*, *Caproiciproducens*, *Clostridium*, *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Ruminiclostridium*, *Thermoanaerobacterium* y organismos de la familia Enterobacteriaceae, los cuales se reportan frecuentemente en sistemas de producción de H<sub>2</sub> tanto mesófilos como termófilos (Zhang et al., 2016b; Feng et al., 2018; Karakashev et al., 2009; Ohnishi et al., 2010; An et al., 2018; Cabrol et al., 2017).

Zhang et al. (2016b) mostraron que *Caldanaerobius* junto con *Thermoanaerobacter* y *Caldicellulosiruptor* predominó en la comunidad bacteriana de un quimiostato termófilo (70°C) de producción de H<sub>2</sub>. En el caso del reactor termófilo estudiado en este trabajo presentó una alta abundancia relativa, pudiéndose tratar de uno de los principales productores de H<sub>2</sub> de la comunidad.

El género *Clostridium* se destacó en todas las muestras analizadas por su alta abundancia relativa, sobre todo en la muestra BA V4 donde fue el más abundante. Su predominancia indica que fue un grupo influyente en la comunidad microbiana del reactor. Sin embargo, dado que la asignación taxonómica no alcanzó el nivel de especie y que las diferentes especies de *Clostridium* varían en sus capacidades metabólicas, es difícil inferir el rol específico que cumplió este género dentro de la comunidad microbiana del reactor termófilo.

Los microorganismos del género *Megasphaera* son bacterias capaces de consumir ácidos grasos de cadena corta, pudiendo cumplir un rol beneficioso dentro de la comunidad

microbiana de los sistemas de producción de H<sub>2</sub>, ya que previenen la acumulación de estos ácidos y por ende la disminución del pH (Cabrol *et al.*, 2017). *Megasphaera elsdenii* es un microorganismo capaz de consumir ácido láctico (Xing *et al.*, 2008; Ohnishi *et al.*, 2010). En el reactor de este trabajo, *Megasphaera* se destacó en la muestra BS V4, correspondiente al período en el que se observó mayor producción de ácido láctico, por lo que quizás este género se favoreció por el aumento de dicho ácido.

Los microorganismos del género *Pectinatus* son capaces de producir H<sub>2</sub>, pero se los ha asociado a bajos rendimientos en reactores mesófilos de producción de H<sub>2</sub> (Castelló *et al.*, 2009; Ferraz *et al.*, 2015b). En el reactor de este trabajo fue uno de los microorganismos más abundantes durante el período de menor producción de H<sub>2</sub>, por lo que pudo haber sido el responsable de la menor producción de H<sub>2</sub>.

Dentro de la familia Enterobacteriaceae, los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* se destacan como productores de H<sub>2</sub> (Cabrol *et al.*, 2017). Su capacidad de producción de H<sub>2</sub> depende de las condiciones ambientales y no todas las especies son iguales en términos de eficiencia de producción de H<sub>2</sub>, ya que algunas han sido identificadas en períodos de baja producción de H<sub>2</sub>, mientras que otras han sido asociadas a altos rendimientos (Cabrol *et al.*, 2017). La clasificación de estos microorganismos alcanzó el nivel de familia, por lo que no es posible inferir su rol específico dentro de la comunidad microbiana del reactor. A grandes rasgos, debido a su naturaleza facultativa (Lukajtis *et al.*, 2018) se podría decir que cumplieron el papel de consumo de oxígeno. Hung *et al.* (2007) obtuvieron una buena producción de H<sub>2</sub> sin la adición de un agente reductor en el medio para la eliminación del O<sub>2</sub>, lo que atribuyeron a la existencia de anaerobios facultativos como *Klebsiella* en el sistema.

En cuanto a los microorganismos no productores de H<sub>2</sub> se destacaron las bacterias ácido lácticas y los géneros *Acetobacter*, *Dialister*, *Prevotella* y *Bifidobacterium*. A pesar de no ser productores de H<sub>2</sub> han sido ampliamente reportados en sistemas de producción de H<sub>2</sub> (Castelló *et al.*, 2011; Arooj *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2008).

El género *Acetobacter* está conformado por microorganismos aerobios estrictos (Kerstens *et al.*, 2006). En el reactor termófilo de este trabajo, *Acetobacter* se destacó por su alta abundancia relativa en la muestra BS V3 (19,7%), seguido de su ausencia en BS V4, lo que podría explicarse por una entrada accidental de aire al reactor, que habría estimulado su crecimiento hasta que las condiciones anaerobias se restablecieron por su propio consumo de oxígeno. Si este fuera el caso, *Acetobacter* habría cumplido el rol de consumo de oxígeno dentro del reactor.

Se ha planteado a *Dialister* y *Prevotella* como géneros que compiten por el sustrato con los microorganismos productores de H<sub>2</sub>, provocando bajos rendimientos de H<sub>2</sub> (Castelló *et al.*, 2009; Castelló *et al.*, 2011). Castelló *et al.* (2011) atribuyeron a este y otros géneros no productores de H<sub>2</sub> la responsabilidad del bajo rendimiento de H<sub>2</sub> obtenido en un reactor mesófilo UASB de producción de H<sub>2</sub> a escala de laboratorio. En el reactor de este trabajo es probable que estos microorganismos hayan competido por el sustrato con los productores de H<sub>2</sub> afectando negativamente la producción de H<sub>2</sub>. De todas formas, sus abundancias relativas en las muestras analizadas mediante secuenciación masiva fueron bajas, por lo que podría inferirse que las condiciones de operación aplicadas en el reactor no favorecieron su desarrollo.

Los microorganismos del género *Bifidobacterium* se caracterizan por colonizar de forma natural el tracto gastrointestinal inferior de humanos y animales, un ambiente pobre en mono y disacáridos, ya que estos azúcares son consumidos preferentemente por el animal (Fushinobu, 2010). Para sobrevivir en dicho ambiente, las bifidobacterias presentan varios tipos de glicosidasas extracelulares y vías metabólicas únicas por las cuáles pueden utilizar diversos carbohidratos (Fushinobu, 2010). Se lo ha asociado a diferentes roles dentro de la comunidad microbiana de los reactores, tanto positivos como negativos. Sivagurunathan et al. (2014) lo vincularon con la disminución de la producción de H<sub>2</sub>, mientras que Cheng et al. (2008) propusieron que su capacidad hidrolítica de almidón favoreció la producción de H<sub>2</sub> al proveer de compuestos más simples utilizables por especies productoras de H<sub>2</sub> como *Clostridium*.

Para realizar un estudio más completo de la comunidad microbiana se podría incluir en el análisis de secuenciación masiva el inóculo y muestras de biomasa de los periodos en los que se utilizó V1 y V2, lo que permitiría conocer la comunidad microbiana inoculada inicialmente y cómo se fue moldeando según las condiciones establecidas durante la operación.

## Efecto de los microorganismos sobre el desempeño del reactor

### Producción de ácido láctico

Durante la utilización de las vinazas V1 y V2 se consumió ácido láctico dentro del reactor (Niz et al., 2019). En cambio, durante la utilización de las vinazas V3 y V4 hubo producción de ácido láctico (Niz et al., 2019). Esta observación concuerda con la alta abundancia relativa de bacterias ácido lácticas detectada en la comunidad microbiana por secuenciación masiva, destacándose *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. En general las bacterias ácido lácticas predominan en reactores alimentados con vinaza de caña de azúcar debido a eventos de contaminación que se producen durante el proceso de fermentación del jugo en la biorrefinería, ya que estas bacterias sobreviven a las condiciones de bajo pH (2.0-2.5) generadas por los aportes de ácido sulfúrico que se utilizan para la prevención de la contaminación (Fuess et al., 2018). Es probable que durante el uso de las vinazas V3 y V4 se hayan establecido condiciones dentro del reactor que potenciaron el desarrollo de estas bacterias, provocando el aumento de la concentración de ácido láctico. De hecho, durante la utilización de V3 ocurrió un error de ajuste de pH en el afluente que podría ser la causa de la disminución del pH en el reactor durante V3 y V4 (fig. 6D). La caída del pH pudo haber sido la causa del desarrollo de las bacterias ácido lácticas.

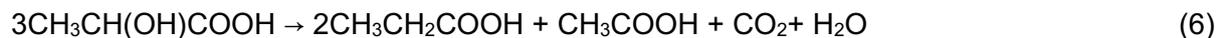
Debido a cambios en el perfil de producción de la biorrefinería, las vinazas V3 y V4 presentaron menor demanda química de oxígeno con respecto a V1 y V2, resultando en una menor tasa de carga orgánica en el reactor (Niz et al., 2019). El contenido de carbohidratos (CH) fue similar en V1-V3 y menor en V4, lo que pudo haber causado la disminución de la tasa volumétrica de producción de H<sub>2</sub> (TPVH) observada en V4 (Niz et al., 2019). Sin embargo, la conversión de CH aumentó en V3 y V4, la cual al no ser acompañada por el aumento de la TPVH, provocó la disminución del rendimiento de H<sub>2</sub> (Niz et al., 2019). Esto podría estar relacionado a la producción de ácido láctico observada en V3 y V4 (Niz et al., 2019).

De esta manera, si la caída del pH provocó la proliferación de las bacterias ácido lácticas y la producción de ácido láctico la disminución del rendimiento de H<sub>2</sub>, se puede inferir que para una buena producción de H<sub>2</sub> en las condiciones del reactor termófilo es importante controlar el pH y el crecimiento de estas bacterias. En cuanto al rol de las bacterias ácido lácticas en la comunidad microbiana, es necesario realizar más experimentos para entender su función pero a raíz de lo observado en el reactor termófilo podría plantearse que su efecto es dependiente de su abundancia.

### Producción de ácido propiónico

Cuando se utilizó la vinaza V3 y sobre todo V4, se observó un aumento del ácido propiónico en el reactor (Niz *et al.*, 2019).

En la muestra BS V4 el género *Pectinatus* fue el de mayor abundancia relativa (32,4%), el cual produce principalmente ácido propiónico como producto de la fermentación de la glucosa (Juvonen & Suihko, 2006). Por lo tanto, *Pectinatus* podría ser responsable de la producción de ácido propiónico durante V4, afectando negativamente la producción de H<sub>2</sub>. Sin embargo, *Pectinatus* no fue el único microorganismo presente en el reactor capaz de producir ácido propiónico. Algunas especies del género *Clostridium* pueden utilizar ácido láctico o etanol como fuente de energía, produciendo ácido propiónico y acético (ec. 6 y 7, respectivamente) (Fuess *et al.*, 2018). Fuess *et al.*, (2018) observaron una correlación entre el ácido propiónico y acético y *Clostridium* en un reactor termófilo (55°C) alimentado con vinaza de caña de azúcar, que resultó de la alta concentración de ácido láctico presente. Dado que la abundancia relativa del género *Clostridium* y la concentración de ácido láctico fueron altas en V3 y V4, este género también pudo haber contribuido al aumento del ácido propiónico en el reactor.



*Megasphaera elsdenii* se caracteriza por su capacidad de fermentar lactato, produciendo entre otros productos ácido propiónico (Soto-Cruz *et al.*, 2002). Dado que en presencia de lactato y glucosa utiliza preferentemente lactato (Hino *et al.*, 1994), *Megasphaera* pudo haberse beneficiado de la producción de ácido láctico en el reactor, aumentando su abundancia relativa durante V4 y contribuyendo al aumento del ácido propiónico observado cuando se utilizó dicha vinaza. Además, los microorganismos del género *Bifidobacterium* bajo ciertas condiciones de crecimiento y nutrientes, pueden producir ácido propiónico, afectando negativamente la producción de H<sub>2</sub> (Sivagurunathan *et al.*, 2014). Asimismo, algunas especies del género *Dialister* y *Ruminiclostridium* son capaces de producir ácido propiónico, por lo que también pudieron haber contribuido al aumento de dicho ácido en el reactor.

## Efecto del material de soporte interno del reactor sobre la comunidad microbiana

Ferraz et al. (2015b) estudiaron el efecto de cuatro materiales de soporte diferentes en la producción de H<sub>2</sub> en reactores APBR mesófilos. Concluyeron que el tipo de material utilizado como soporte interno para la adhesión de la biomasa tiene una fuerte influencia en la selección de las poblaciones microbianas, siendo el polietileno de baja densidad, dentro de los evaluados, el material más apropiado para la producción de H<sub>2</sub>.

Perna et al. (2013) analizaron la comunidad microbiana de un reactor APBR mesófilo de producción de H<sub>2</sub>, cuyo material de soporte interno fue polietileno de baja densidad. Para el análisis microbiano tomaron muestras de biomasa suspendida en dos puntos diferentes del reactor a lo largo de la operación y una muestra de biomasa adherida al final de la operación. La composición microbiana de la biomasa se estudió mediante T-RFLP del gen ARNr 16S y se observaron diferencias en la composición microbiana de las muestras analizadas. Además, los resultados de cuantificación por q-PCR mostraron que las bacterias productoras de H<sub>2</sub> representadas por el gen de la Fe-hidrogenasa fueron detectadas en todas las muestras, pero con mayor proporción en una de las muestras de biomasa suspendida. Estos resultados indicaron que la distribución de la biomasa no fue homogénea.

En el presente trabajo los resultados también mostraron diferencias en la composición de la comunidad microbiana suspendida y adherida. De esto se desprende que la biomasa suspendida representa sólo una parte de la comunidad microbiana del reactor, resaltando la importancia de incluir muestras de ambas biomasas en los análisis microbiológicos para poder comprender la composición y la dinámica de la comunidad en su totalidad.

Koskinen et al. (2007) analizaron la comunidad suspendida y adherida a un material silíceo para la formación de biofilms de un reactor FBR mesófilo. Observaron un rápido enriquecimiento y eficiente adhesión en el soporte que cambió la estructura de la comunidad microbiana y su metabolismo, desde la producción de acetato-butirato a acetato-propionato, resultando en la disminución de la producción de H<sub>2</sub>. Por este motivo, concluyeron que la formación de biofilms no favoreció la producción mesófila de H<sub>2</sub> al atraer microorganismos consumidores de H<sub>2</sub> en lugar de productores. Sin embargo, en el caso del reactor termófilo del presente trabajo los géneros *Caldanaerobius*, *Caproiciproducens*, *Clostridium*, *Ruminiclostridium* y *Thermoanaerobacterium* presentaron mayor abundancia relativa de forma adherida, mientras que *Lactobacillus*, *Pectinatus* y *Megasphaera* estuvieron presentes en mayor proporción de forma suspendida, por lo que se podría decir que el soporte interno seleccionó microorganismos favorables para la producción de H<sub>2</sub>.

Específicamente, el efecto del soporte sobre *Thermoanaerobacterium* resultó contrario a lo reportado en la bibliografía. Fuess et al. (2018) aplicaron descargas de biomasa periódicas como estrategia de operación en un reactor termófilo (55°C) alimentado con vinaza de caña de azúcar, cuyo material de soporte fueron pellets de polietileno de baja densidad. Observaron que las descargas no favorecieron el establecimiento del género *Thermoanaerobacterium*, por lo que concluyeron que estas bacterias no son capaces de crecer eficientemente de manera adherida al soporte. En contraste con este resultado, en el reactor termófilo de este trabajo se observó una mayor abundancia relativa de *Thermoanaerobacterium* en la muestra de biomasa adherida (BA V4).

Los resultados de este y otros trabajos demuestran que el soporte material utilizado para la retención de la biomasa dentro de los reactores influye sobre la producción de H<sub>2</sub>, debido a su capacidad de seleccionar determinados microorganismos. Sin embargo, el efecto específico de dicho soporte parece depender de las condiciones y parámetros operacionales de cada reactor.

## Comparación de los microorganismos aislados con la comunidad microbiana detectada mediante secuenciación masiva

La agrupación de las secuencias de los aislamientos lácticos en dos cluster junto con secuencias de OTUs obtenidas por secuenciación masiva indica que dichos aislamientos formaron parte de la comunidad microbiana del reactor termófilo. Cinco aislamientos presentaron secuencias que se agruparon con la secuencia de la OTU 423, mientras que el aislamiento restante se agrupó con la secuencia de una OTU distinta (OTU 586). Este resultado apoya los resultados de BLAST, según los cuáles los cinco aislamientos con secuencias agrupadas con la secuencia de la OTU 423 se clasificaron como *L. paracasei* o *L. casei* y el aislamiento con secuencia agrupada con la secuencia de la OTU 586 se clasificó como *L. harbinensis*. Además, el análisis de la secuencia de las OTU 423 y 586 mediante BLAST, mostró que los microorganismos más similares fueron *L. paracasei/casei* y *L. harbinensis*, respectivamente.

Dado que las secuencias de los aislamientos termófilos productores de H<sub>2</sub> y las secuencias de las OTUs 803 y 385 se agruparon con secuencias de los mismos microorganismos, es probable que dichas OTUs representen a los aislamientos obtenidos, por lo que se podría decir que los aislamientos termófilos también formaron parte de la comunidad microbiana del reactor.

En futuros trabajos sería importante utilizar los mismos primers para la PCR del gen ARNr 16S tanto de los aislamientos como de la comunidad microbiana para la secuenciación masiva, evitándose inconvenientes a la hora de comparar las secuencias.

## Aislamiento a partir de muestras del reactor acidófilo

### Efectividad de las técnicas de aislamiento aplicadas

Se aislaron microorganismos mediante todos los métodos aplicados, a pesar de que la condición acidófila también presentó obstáculos a la hora del aislamiento. En general, los resultados de la identificación filogenética de los aislamientos concordaron con lo esperado de acuerdo a las técnicas aplicadas para el aislamiento de cada uno de ellos. Mediante los métodos que incluyeron tratamiento térmico de las muestras se aislaron únicamente microorganismos formadores de esporas, lo que indica que dicho tratamiento fue efectivo para la eliminación de células vegetativas. A su vez, mediante los métodos aplicados bajo condiciones anaerobias se aislaron microorganismos anaerobios y mediante los métodos aplicados bajo condiciones aerobias se aislaron microorganismos aerobios o anaerobios facultativos. Al igual que en el caso del reactor termófilo, la estrategia de selección de bacterias ácido lácticas fue efectiva, ya que se lograron aislar microorganismos del género *Lactobacillus*. De todas formas, no se aislaron microorganismos de otros géneros de bacterias

ácido lácticas detectados por secuenciación masiva, como *Sporolactobacillus*. Para ello también podría ser útil el enriquecimiento de la muestra previo al cultivo en placa.

## Características de los aislamientos obtenidos

Mediante las diferentes estrategias utilizadas se aislaron microorganismos caracterizados como *Clostridium guangxiense*, *Clostridium carboxidivorans*, *Bacillus fortis*, *Paenibacillus favisporus*, *Cutibacterium acnes*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus casei*.

*C. guangxiense* y *C. carboxidivorans* son microorganismos productores de H<sub>2</sub> capaces de utilizar la sacarosa como fuente de energía y carbono (Liou *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2017b). A diferencia de *C. guangxiense*, *C. carboxidivorans* es un microorganismo homoacetogénico, por lo que también puede crecer autotróficamente a partir de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>/CO (Liou *et al.*, 2005). A pesar del aislamiento de *C. carboxidivorans* del reactor acidófilo, este presentó una producción de H<sub>2</sub> estable y constante a lo largo de la operación (Mota *et al.*, 2018). Quizás este microorganismo no alcanzó una abundancia relativa suficiente para que su actividad provoque una disminución sostenida de la producción de H<sub>2</sub>. Otra posible explicación es que *C. carboxidivorans* haya mantenido su metabolismo quimioorganótrofo dadas las condiciones establecidas en el reactor y no haya cambiado hacia el metabolismo autotrófico. La homoacetogénesis, al afectar la estabilidad de la producción de H<sub>2</sub>, limita la rentabilidad del proceso, por lo que es vital estudiarla a fondo para desarrollar estrategias que la minimicen o eliminen. El aislamiento de *C. carboxidivorans* abre la posibilidad de realizar varios ensayos con este objetivo. Por ejemplo, posibilita el co-cultivo con microorganismos productores de H<sub>2</sub> también aislados en este trabajo como *C. guangxiense*, para evaluar las interacciones entre ellos y cómo la homoacetogénesis afecta la producción de H<sub>2</sub>. También permite investigar cómo los distintos parámetros y condiciones de operación influyen sobre el metabolismo de estos microorganismos.

Debido a que *B. fortis* y *P. favisporus* son microorganismos aerobios y aerobios/anaerobios facultativos, respectivamente (Scheldeman *et al.*, 2004; Vos *et al.*, 2011), se podría pensar que cumplieron el importante rol de consumo de oxígeno dentro del reactor. Sin embargo, estos géneros no se detectaron por el análisis de secuenciación masiva del gen del ARNr 16S, por lo que es probable que se encontraran en baja proporción dentro de la comunidad microbiana, siendo aislados por las condiciones adecuadas que se aplicaron para su selección.

*Cutibacterium acnes* podría tratarse de una contaminación, ya que es un microorganismo que forma parte de la flora comensal de la piel sana (Dréno *et al.*, 2018), no ha sido reportado en sistemas de producción de H<sub>2</sub> y además no fue detectado por el análisis de secuenciación masiva.

## Comparación de los microorganismos aislados con la comunidad microbiana detectada mediante secuenciación masiva

Los resultados de secuenciación masiva del gen ARNr 16S realizada por Mota *et al.* (2018) del reactor acidófilo revelaron la dominancia de microorganismos del género *Ethanoligenens* con una abundancia relativa de 81% al final de la operación. El segundo grupo de mayor

abundancia relativa (15%) perteneció a la familia Clostridiaceae, mientras que los géneros *Sporolactobacillus* y *Pectinatus* presentaron una abundancia relativa de 1%.

A través de las estrategias de aislamiento utilizadas se aislaron microorganismos del género *Clostridium*, perteneciente a la familia Clostridiaceae. Sin embargo, no se aislaron microorganismos de los géneros *Sporolactobacillus*, *Pectinatus* y *Ethanoligenens*.

El género *Ethanoligenens* está constituido por microorganismos anaerobios obligados no formadores de esporas (Xing *et al.*, 2006), lo que explicaría que no hayan sido aislados en condiciones aerobias o mediante las técnicas con tratamiento térmico de la muestra. De todas formas, es probable que las estrategias de aislamiento bajo condiciones anaerobias y sin tratamiento térmico no hayan sido adecuadas para aislar estos microorganismos. Xing *et al.* (2006) aislaron dos cepas de un reactor de tratamiento de melaza que dadas sus características resultaron pertenecer a un género nuevo, clasificándolas como *Ethanoligenens harbinense*. La técnica de aislamiento aplicada fue dilución seriada y posterior roll tube (Hungate, 1969) hasta obtener un cultivo puro, bajo una atmósfera de 100% N<sub>2</sub> y 35°C (Xing *et al.*, 2006). Esta metodología se podría aplicar para intentar recuperar microorganismos del género *Ethanoligenens* de las muestras del reactor acidófilo.

## Crecimiento en condiciones extremas y producción de H<sub>2</sub> de los aislamientos

Todos los aislamientos clasificados como *Clostridium guangxiense* (11) crecieron a pH 3 y 7 de ellos produjeron H<sub>2</sub> a pH 3, a pesar de estar reportado que crece en un rango de pH de 4.5-8, siendo 7 el valor óptimo (Zhao *et al.*, 2017b).

Al cultivarse los aislamientos de *Cutibacterium acnes* a pH 3 se observó crecimiento pero no se detectó producción de H<sub>2</sub>. Este microorganismo, reportado en ambientes ricos en lípidos (glándulas sebáceas), puede degradar los triglicéridos presentes en el sebo para formar ácidos grasos de cadena corta, como el ácido propiónico, cuya acumulación participa en el mantenimiento del pH ácido de la piel (Dréno *et al.*, 2018). Esto podría implicar que *C. acnes* sea tolerante a pH ácido, lo que explicaría su crecimiento a pH 3.

Algunos miembros del género *Bacillus* son capaces de crecer a pH ácido (<4.6) (Albert *et al.*, 2005). Sin embargo, este no es el caso de *Bacillus fortis*, cuyo crecimiento no ocurre a pH 5 (Scheldeman *et al.*, 2004), lo que concuerda con lo observado en este trabajo, ya que el aislamiento correspondiente a dicha especie no creció a pH 3.

No se observó crecimiento de *Paenibacillus favisporus* a pH 3, lo que podría explicarse por su pH óptimo de crecimiento a pH 7 (Velázquez *et al.*, 2004).

Tras la incubación a pH 3 de los aislamientos de *Clostridium carboxidivorans* se detectó crecimiento pero sin producción de H<sub>2</sub>. Esto podría deberse a que el microorganismo consumió el H<sub>2</sub> luego de haberlo producido, mediante la vía de homoacetogénesis. Para verificar esta hipótesis se debería repetir el cultivo del aislamiento y analizar la composición del biogás por cromatografía de gases a intervalos regulares durante todo el periodo de incubación. De esta manera se podrían monitorear los posibles cambios en los gases producidos a lo largo del tiempo. Además, este ensayo se podría complementar con el análisis de los metabolitos producidos por HPLC y la cuantificación de azúcares por DNS, para lo que es necesario tomar muestras del cultivo líquido. Así, se podría inferir sobre las rutas metabólicas utilizadas por el microorganismo.

## Conclusiones

- I. Mediante las técnicas de aislamiento aplicadas se lograron aislar diversos microorganismos, incluyendo cepas productoras de H<sub>2</sub> en condiciones extremas de temperatura y pH.
- II. Los microorganismos aislados representaron sólo una porción de la comunidad microbiana, por lo que para un estudio más completo de las comunidades microbianas de los reactores de producción de H<sub>2</sub> es necesario incluir otras técnicas de análisis como la secuenciación masiva.
- III. Mediante el análisis de la comunidad se encontraron microorganismos característicos de sistemas de producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura. Estos permitieron explicar algunos procesos observados durante la operación del reactor, como la producción de ácido propiónico o ácido láctico, así como la consecuencia de algunas acciones como la caída del pH.
- IV. La caracterización de los microorganismos que componen la comunidad microbiana responsable de la producción de H<sub>2</sub> permitió inferir sobre sus roles, generando conocimiento para entender el funcionamiento de los reactores y crear estrategias de operación adecuadas para una buena producción de H<sub>2</sub>.

# Bibliografía

Albert, R. A., Archambault, J., Rosselló-Mora, R., Tindall, B. J., & Matheny, M. (2005). *Bacillus acidicola* sp. Nov., a novel mesophilic, acidophilic species isolated from acidic Sphagnum peat bogs in Wisconsin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 2125–2130. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02337-0>

Anzola-Rojas, M., 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(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.010>

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. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.052>

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. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1053727>

Azwar, M. Y., Hussain, M. A., & Abdul-Wahab, A. K. (2014). *Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review* (Vol. 31). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>

Bartacek, J., Zabranska, J., & Lens, P. N. L. (2007). Developments and constraints in fermentative hydrogen production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(3), 201–214. <https://doi.org/10.1002/bbb.17>

Bastidas-Oyanedel, J.-R., Bonk, F., Thomsen, M. H., & Schmidt, J. E. (2019). *The Future Perspectives of Dark Fermentation: Moving from Only Biohydrogen to Biochemicals*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_15)

Blanco, V. M. C., Oliveira, G. H. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>

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), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Gonzales, A., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenkov,

Zaneveld, J. & Knight, R. (2010, April). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data | *Nature Methods*. Retrieved November 21, 2019, from <https://www.nature.com/articles/nmeth.f.303/>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>

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. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.706>

Cheng, C. H., Hung, C. H., Lee, K. S., Liao, P. Y., Liang, C. M., Yang, L. H., Lin, P., J & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.017>

Chojnacka, A., Blaszczyk, M. K., Szczesny, P., Nowak, K., Sumińska, M., Tomczyk-Zak, K., Zielenkiewicz, U. & 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.063>

Chong, M. L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2009). *Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.010>

Christofolletti, C. A., Escher, J. P., Correia, J. E., Marinho, J. F. U., & Fontanetti, C. S. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>

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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006669>

Crabtree, G. W., Dresselhaus, M. S., & Buchanan, M. V. (2004). *The Hydrogen Economy*.

Das, D. & Veziroglu, T. (2001). *Hydrogen production by biological processes: A survey of literature* (pp. 13–28). Retrieved from [www.elsevier.com/locate/ijhydene](http://www.elsevier.com/locate/ijhydene)

Daud, M. K., Rizvi, H., Akram, M. F., Ali, S., Rizwan, M., Nafees, M., & Jin, Z. S. (2018). Review of upflow anaerobic sludge blanket reactor technology: Effect of different parameters and developments for domestic wastewater treatment. *Journal of Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1596319>

del Pino Machado, A., Casanova, O., Hernández, J., Takata, V., & Panissa, G. (2017). *Efecto de la aplicación de vinaza en suelos bajo cultivo de caña de azúcar*. Retrieved from <http://rephip.unr.edu.ar/xmlui/handle/2133/13727>

Diez-Gonzalez, F., Russell, J. B., & Hunter, J. B. (1995). The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. *Archives of Microbiology*, *164*(1), 36–42. <https://doi.org/10.1007/BF02568732>

Dos Reis, C. M., & Silva, E. L. (2014). Simultaneous Coproduction of Hydrogen and Ethanol in Anaerobic Packed-Bed Reactors. *BioMed Research International*, *2014*(September). <https://doi.org/10.1155/2014/921291>

Dréno, B., Pécastaings, S., Corvec, S., Veraldi, S., Khammari, A., & Roques, C. (2018). *Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: A brief look at the latest updates* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1111/jdv.15043>

Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., Cabrol, L., Carminato, V. M., Carrillo-Reyes, J., Cisneros-Perez, C., Fuentes, L., Moreno-Andrade, I., Razo-Flores, E., Ruiz, G., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J. & Zaiat, M. (2016). Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(7), 3371–3384. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7325-y>

Fang, H. H. P., Liu, H., & Zhang, T. (2002). Characterization of a hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, *78*(1), 44–52. <https://doi.org/10.1002/bit.10174>

Feng, K., Li, H., & Zheng, C. (2018). Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresource Technology*, *270*(September), 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.035>

Ferraz Júnior, A., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015a). High organic loading rate on thermophilic hydrogen production and metagenomic study at an anaerobic packed-bed reactor treating a residual liquid stream of a Brazilian biorefinery. *Bioresource Technology*, *186*, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.035>

Ferraz Júnior, A., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015b). Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. *Anaerobe*, *34*, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.008>

Ferraz Júnior, A., Koyama, M. H., de Araújo Júnior, M. M., & Zaiat, M. (2016). Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. *Renewable Energy*, *89*, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.11.064>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.017>

- Fuentes, L., Braga, L., Castelló, E., & Etchebehere, C. (2018). Work scheme to isolate the different micro-organisms found in hydrogen-producing reactors: A study of effectiveness by pyrosequencing analysis. *Journal of Applied Microbiology*, *125*(1), 96–110. <https://doi.org/10.1111/jam.13763>
- Fuess, Lucas T., Rodrigues, I. J., & Garcia, M. L. (2017). Ferrirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, *52*(11), 1063–1072. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1338892>
- Fuess, Lucas Tadeu, Ferraz, A. D. N., Machado, C. B., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. *Bioresource Technology*, *247*, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>
- Fuess, Lucas Tadeu, & Garcia, M. L. (2014). *Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation* (Vol. 145). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.003>
- Fushinobu, S. (2010). Unique Sugar Metabolic Pathways of Bifidobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *75*(1), 2011E1–2011E1. <https://doi.org/10.1271/bbb.2011e1>
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Gopalakrishnan, B., Khanna, N., & Das, D. (2019). *Dark-Fermentative Biohydrogen Production*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64203-5.00004-6>
- Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrre, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*(19), 10660–10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- Hallenbeck, P. C., Abo-Hashesh, M., & Ghosh, D. (2012). *Strategies for improving biological hydrogen production* (Vol. 110). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.103>
- Hay, J. X. W., Wu, T. Y., Juan, J. C., & Md. Jahim, J. (2013). Biohydrogen production through photo fermentation or dark fermentation using waste as a substrate: Overview, economics, and future prospects of hydrogen usage. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *7*(3), 334–352. <https://doi.org/10.1002/bbb.1403>
- Hino, T., Shimada, K., & Maruyama, T. (1994). Substrate preference in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(6), 1827–1831.

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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02444-09>

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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.084>

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 | SpringerLink. Retrieved November 21, 2019, from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-007-0854-7>

Hungate, R. E. (n.d.). *A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes*.

Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of Clostridium tyrobutyricum JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology*, 99(14), 6666–6672. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.067>

Juvonen, R., & Suihko, M. L. (2006). Megasphaera paucivorans sp. Nov., Megasphaera sueciensis sp. Nov. And Pectinatus haikarae sp. Nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus Pectinatus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(4), 695–702. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63699-0>

Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). *Bio-hydrogen production from waste materials* (Vol. 38). <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>

Karakashev, D., Kotay, S. M., Trably, E., & Angelidaki, I. (2009). A strict anaerobic extreme thermophilic hydrogen-producing culture enriched from digested household waste. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 1041–1049. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04071.x>

Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., & Swings, J. (2006). The Family Acetobacteraceae: The Genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia. In *The Prokaryotes* (pp. 163–200). [https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_9](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_9)

Koskinen, P. E. P., 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 fluidized-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(4), 742–758. <https://doi.org/10.1002/bit.21299>

Kothari, R., Pandey, A. K., Kumar, S., Tyagi, V. V., & Tyagi, S. K. (2014). Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 174–195. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.011>

Lazaro, Carolina Zampol, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.02.058>

Lazaro, C.Z., & Hallenbeck, P. C. (2019). *Fundamentals of Biohydrogen Production*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64203-5.00002-2>

Lebuhn, M., Hanreich, A., Klocke, M., Schlüter, A., Bauer, C., & Pérez, C. M. (2014). Towards molecular biomarkers for biogas production from lignocellulose-rich substrates. *Anaerobe*, 29(2014), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.04.006>

Levin, D. B., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)

Li, C., Zhang, T., & Fang, H. H. P. (2006). Fermentative hydrogen production in packed-bed and packaging-free upflow reactors. *Water Science and Technology*, 54(9), 95–103. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.712>

Lin, C. Y., Lay, C. H., Sen, B., Chu, C. Y., Kumar, G., Chen, C. C., & Chang, J. S. (2012). Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 15632–15642. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.072>

Liou, J. S. C., Balkwill, D. L., Drake, G. R., & Tanner, R. S. (2005). *Clostridium carboxidivorans* sp. Nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 2085–2091. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63482-0>

Liu, Y., Yu, P., Song, X., & Qu, Y. (2008). Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12), 2927–2933. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.04.004>

Lukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>

Matsumoto, M., & Nishimura, Y. (2007). Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(3), 236–241. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.236>

Merlin Christy, P., 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. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>

Miyamoto, M., Seto, Y., Dong, H. H., Teshima, T., Yan, B. S., Kabuki, T., Sun, Y. B. &

Nakajima, H. (2005). *Lactobacillus harbinensis* sp. Nov., consisted of strains isolated from traditional fermented vegetables “Suan cai” in Harbin, Northeastern China and *Lactobacillus perolens* DSM 12745. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8), 688–694. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.04.001>

Moraes, B. S., Zaiat, M., & Bonomi, A. (2015). *Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives* (Vol. 44). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.023>

Mota, V. T., Ferraz Júnior, A. D. N., Trabaly, E., & Zaiat, M. (2018). Biohydrogen production at pH below 3.0: Is it possible? *Water Research*, 128, 350–361. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.060>

Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). *A comparative overview of hydrogen production processes* (Vol. 67). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>

Niz, M. Y. K., Etchelet, I., Fuentes, L., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2019). Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.015>

Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., & Ohba, M. (2002). *Systematics and Paleobiology of Entelodontidae.pdf*. 27, 1367–1371. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00120-9)

Novaes, R. F. V. (1986). Microbiology of Anaerobic Digestion. *Water Science and Technology*, 18(12), 1–14. <https://doi.org/10.2166/wst.1986.0159>

Ntaikou, I., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2010). Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. *Waste and Biomass Valorization*, 1(1), 21–39. <https://doi.org/10.1007/s12649-009-9001-2>

Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2010). Development of a simple biohydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(16), 8544–8553. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.113>

O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2008). Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum PSU-2. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1204–1214. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.12.015>

Ottaviano, L. M., Ramos, L. R., Botta, L. S., Amâncio Varesche, M. B., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.168>

Patel, S. K., Kumar, P., & Kalia, V. C. (2012). Enhancing biological hydrogen production through complementary microbial metabolisms. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(14), 10590-10603. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.04.045>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.10.022>

Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., Giudici-Ortoni, M. T. & Steyer, J. P. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(12), 4975–4985. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.008>

Ratti, R. P., Delforno, T. P., Okada, D. Y., & Varesche, M. B. A. (2015). Bacterial communities in thermophilic H<sub>2</sub>-producing reactors investigated using 16S rRNA 454 pyrosequencing. *Microbiological Research*, 173, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.010>

Saady, N. M. C. (2013). *Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge* (Vol. 38). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>

Santos, S. C., Ferreira Rosa, P. R., Sakamoto, I. K., Amâncio Varesche, M. B., & Silva, E. L. (2014). Continuous thermophilic hydrogen production and microbial community analysis from anaerobic digestion of diluted sugar cane stillage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(17), 9000–9011. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.241>

Saratale, G. D., Saratale, R. G., Banu, J. R., & Chang, J.-S. (2019). *Biohydrogen Production From Renewable Biomass Resources*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64203-5.00010-1>

Scheldeman, P., Rodríguez-Díaz, M., Goris, J., Pil, A., De Clerck, E., Herman, L., ... Heyndrickx, M. (2004). *Bacillus farraginis* sp. Nov., *Bacillus fortis* sp. Nov. And *Bacillus fordii* sp. Nov., isolated at dairy farms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1355–1364. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63095-0>

Senatore, D. (2013). *Vinaza como fertilizante de caña azucarera: Efecto sobre la comunidad bacteriana del suelo*.

Senatore, D., Queirolo, A., Wajswol, S. & Bajsa, N. (2017). Monitoreo de la aplicación de vinaza como fertilizante en caña de azúcar con indicadores microbianos de suelo. *INNOTEC*. <https://doi.org/10.26461/13.09>

Shin, H.-S., Youn, J.-H., & Kim, S.-H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(13), 1355–1363. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.09.011>

Sikora, A., Baszczyk, 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*. <https://doi.org/10.5772/50364>

Sinha, P., & Pandey, A. (2011). *An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production* (Vol. 36). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.077>

Sinha, P., Roy, S., & Das, D. (2015). Role of formate hydrogen lyase complex in hydrogen production in facultative anaerobes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(29), 8806–8815. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.076>

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.03.260>

Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E., & Saucedo-Castañeda, G. (2002). Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnology Progress*, 18(2), 193–200. <https://doi.org/10.1021/bp010189y>

Stams, A. J. M., Dijkema, C., Plugge, C. M., & Lens, P. (1998). Contribution of <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy to the elucidation of pathways of propionate formation and degradation in methanogenic environments. *Biodegradation*, 9(6), 463–473. <https://doi.org/10.1023/A:1008342130938>

Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J. E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., ... Ruiz-Filippi, G. (2015). *Biohydrogen production by dark fermentation: Scaling-up and technologies integration for a sustainable system* (Vol. 14). <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9383-5>

Toledo-Alarcón, J., Capson-Tojo, G., Marone, A., Paillet, F., Ferraz Júnior, A. D. N., Chatellard, L., ... Trabaly, E. (2018). Basics of bio-hydrogen production by dark fermentation. In *Green Energy and Technology* (pp. 199–220). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7677-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7677-0_6)

Trchounian, K., & Trchounian, A. (2015). *Hydrogen production from glycerol by Escherichia coli and other bacteria: An overview and perspectives* (Vol. 156). <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.07.009>

Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2001). Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(4), 555–562. <https://doi.org/10.1007/s002530100806>

Valdez-Vazquez, I., & Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(5), 1000–1013. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.03.003>

Veeravalli, S. S., Shanmugam, S. R., Ray, S., Lalman, J. A., & Biswas, N. (2019). Chapter 15—Biohydrogen Production From Renewable Resources. In M. Hosseini (Ed.), *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts* (pp. 289–312).

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817941-3.00015-2>

Velázquez, E., de Miguel, T., Poza, M., Rivas, R., Rosselló-Mora, R., & Villa, T. G. (2004). *Paenibacillus favisporus* sp. Nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 59–64. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02709-0>

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. Whitman, W. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*—Google Libros. Retrieved November 21, 2019, from [https://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=0VqgLiCPFcC&oi=fnd&pg=PR1&dq=bergeys+firmicutes&ots=kHDbyWKp2z&sig=ycT\\_\\_BYDDmOw3bWV5RZfPwyWMEE&redir\\_esc=y#v=onepage&q=bergeys%20firmicutes&f=false](https://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=0VqgLiCPFcC&oi=fnd&pg=PR1&dq=bergeys+firmicutes&ots=kHDbyWKp2z&sig=ycT__BYDDmOw3bWV5RZfPwyWMEE&redir_esc=y#v=onepage&q=bergeys%20firmicutes&f=false)

Wang, J., & Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 799–811. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>

Wang, J., & Yin, Y. (2017). Principle and application of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(8), 4804–4823. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.01.135>

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Xing, D., Ren, N., Li, Q., Lin, M., Wang, A., & Zhao, L. (2006). *Ethanoligenens harbinense* gen. Nov., sp. Nov., isolated from molasses wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(4), 755–760. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63926-0>

Xing, D., Ren, N., & Rittmann, B. E. (2008). Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H<sub>2</sub>-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1232–1239. <https://doi.org/10.1128/AEM.01946-07>

Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J. A., & Benemann, J. R. (2007). Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(18), 4761–4771. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.038>

Yokoyama, H., Waki, M., Moriya, N., Yasuda, T., Tanaka, Y., & Haga, K. (2007). Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2), 474–483. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0647-4>

Zacharova, E. V., Mitrofanova, T. I., Krasilnikova, E. N., & Kondratieva, E. N. (1993). *Thermohydrogenium kirishiense* gen. Nov. And sp. Nov., a new anaerobic thermophilic bacterium. *Archives of Microbiology*, 160(6), 492–497. <https://doi.org/10.1007/BF00245311>

Zhang, F., Yang, J. H., Dai, K., Chen, Y., Li, Q. R., Gao, F. M., & Zeng, R. J. (2016a). Characterization of microbial compositions in a thermophilic chemostat of mixed culture fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1511–1521. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7130-z>

Zhang, F., Yang, J. H., Dai, K., Ding, Z. W., Wang, L. G., Li, Q. R., Gao, F. M. & Zeng, R. J. (2016b). Microbial dynamics of the extreme-thermophilic (70 °c) mixed culture for hydrogen production in a chemostat. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(26), 11072–11080. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.085>

Zhao, J., Song, W., Cheng, J., Liu, M., Zhang, C., & Cen, K. (2017a). Improvement of fermentative hydrogen production using genetically modified *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(6), 3676–3681. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.161>

Zhao, X., Li, D., Xu, S., Guo, Z., Zhang, Y., Man, L., Jiang, B. & Hu, X. (2017b). *Clostridium guangxiense* sp. Nov. And *Clostridium neuense* sp. Nov., two phylogenetically closely related hydrogen-producing species isolated from lake sediment (Vol. 67). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001702>