

***Producción de hidrógeno por fermentación  
oscura y producción de electricidad a partir de  
suero de queso y otros subproductos  
industriales***

**Autora:** Lic. Laura Carolina Fuentes Casullo

**Datos institucionales:** Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones  
Biológicas Clemente Estable.

**Montevideo**

**2020**



Red Latinoamericana de BioHidrógeno



Bio H<sub>2</sub>

Rede Latino-Americana de BioHidrogênio



AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN



COMISIÓN  
ACADÉMICA  
DE POSGRADO



FACULTAD DE  
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy



POSGRADO EN  
BIOTECNOLOGÍA

***Título: Producción de hidrógeno por fermentación oscura y producción de electricidad a partir de suero de queso y otros subproductos industriales***

**Autora:** Lic. Laura Carolina Fuentes Casullo

**Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Doctora en Biotecnología en el marco del Programa Biotecnología de Facultad de Ciencias.**

**Directora de tesis:**

Dra. Claudia Etchebehere

*Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-MEC, Uruguay.*

**Tribunal:**

Dra. Silvana Vero (Facultad de Química, UDELAR, Uruguay).

Dr. Francisco Noya (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-MEC, Uruguay).

Dr. Iván moreno (Universidad Autónoma de México, México).

**Lugar y fecha:** Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Diciembre 2020

## *Agradecimientos*

*Quisiera agradecer a todxs aquellxs que me han acompañado a lo largo de estos años de investigación sea en la cercanía o en la distancia, sea por una estación o toda la vida.*

*A mis padres por haberme apoyado incondicionalmente y motivado constantemente a alcanzar mis anhelos.*

*A mi hermana y a mis hermanos.*

*Al grupo de movimentación y a María por haberme acompañado en estos años en lo que significa ser humana.*

*A mi tutora Claudia por siempre transmitirme su entusiasmo y curiosidad en la ciencia. Su constante apoyo y sus indicaciones fueron indispensables en el desarrollo de este trabajo.*

*A mis amistades que me han prestado un gran apoyo moral y humano, su cariño y solidaridad.*

*A las instituciones que financiaron esta investigación FSE, Instituto Clemente Estable, Embajada de Francia y becas de doctorado ANII, CAP.*

*A mis compañerxs del IIBCE que de una u otra manera han contribuido en el trabajo de esta tesis desde lo profesional y lo humano.*

*Sin el apoyo de todas estas personas e instituciones este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también de ellos.*

*Al gran espíritu, al gran misterio, por todas mis relaciones... agradezco*

## Contenido

Contenido .....	ii
Resumen de la tesis .....	viii
Abstract .....	xi
Lista de abreviaciones .....	xiii
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
1. INTRODUCCION GENERAL.....	2
1.1. Importancia de las energías renovables en Uruguay.....	2
1.1. Valorización de residuos.....	4
1.2. Valorización del suero de queso .....	5
1.3. Obtención de H <sub>2</sub> por fermentación oscura .....	6
1.4. Celdas de combustible microbianas .....	6
1.5. Electrofermentación .....	7
1.6. Temas a abordar en esta Tesis .....	7
1.7. Objetivo general de la tesis .....	8
1.8. Organización de la tesis .....	9
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>10</b>
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>13</b>
1. INTRODUCCION.....	14
1.1. Hidrógeno como combustible .....	14
1.2. Fermentación oscura.....	16
1.3. Vías metabólicas de producción de H <sub>2</sub> .....	17
1.3.1 Bacterias productoras de H <sub>2</sub> .....	20
1.4. Microorganismos que compiten con la producción de H <sub>2</sub> .....	22
1.4.1. Bacterias del ácido láctico.....	22
1.4.2. Otros microorganismos fermentadores .....	23
1.5. Microorganismos consumidores de H <sub>2</sub> .....	24
1.5.1. Metanogénesis.....	24
1.5.2. Homoacetogénesis.....	25
1.6. Métodos para estudiar la microbiología de los procesos de producción de H <sub>2</sub> .....	27
1.7. Factores que afectan la producción de H <sub>2</sub> .....	28
1.7.1. pH y temperatura.....	29
1.7.2. Presión parcial de H <sub>2</sub> .....	29
1.7.3. Configuración del bio-reactor .....	30

1.7.4. <i>Inóculo</i> .....	35
1.7.5. <i>Sustratos utilizados para la producción de H<sub>2</sub></i> .....	38
2. <i>Objetivos de este capítulo</i> .....	41
<b>REFERENCIAS</b> .....	42
<b>Trabajo 1. Work scheme to isolate the different microorganisms found in hydrogen-producing reactors: a study of effectiveness by pyrosequencing analysis</b> .....	53
<b>Objetivos específicos abarcados en este trabajo</b> .....	53
<b>Contribución del autor de la tesis</b> .....	53
<i>Abstract</i> .....	55
1. <i>Introduction</i> .....	56
2. <i>Material and methods</i> .....	58
2.1 <i>Samples</i> .....	58
2.2 <i>Microbial community isolation methods</i> .....	58
2.3 <i>Characterization of the isolates using 16S rRNA gene sequence analysis</i> .....	61
2.4 <i>Production of hydrogen by the isolates</i> .....	61
2.5 <i>Co-cultures with the different isolates</i> .....	61
2.6 <i>Chemical analysis</i> .....	62
2.7 <i>DNA extraction and 16S rRNA gene pyrosequencing analysis</i> .....	62
2.8 <i>Phylogenetic analysis</i> .....	63
3. <i>Results</i> .....	63
3.1 <i>Strains isolated using the four methods</i> .....	63
3.2 <i>Community analysis by 16S rRNA gene pyrosequencing</i> .....	65
3.3 <i>Phylogenetic studies</i> .....	66
3.4 <i>Hydrogen production by the isolates</i> .....	71
3.5 <i>Interaction between the different strains studied using co-culture experiments</i> .....	72
4. <i>Discussion</i> .....	73
4.1 <i>Coverage of the culture methods</i> .....	73
4.2 <i>Comparison of sequences from isolates and from pyrosequencing analysis</i> .....	75
4.3 <i>Physiological role of the microorganism observed in the reactor samples</i> .....	77
4.4 <i>Interaction between the different strains</i> .....	78
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b> .....	79
<b>REFERENCES</b> .....	80
<b>SUPPORTING INFORMATION</b> .....	85
<b>Trabajo 2. Knowing the enemy: homoacetogens in hydrogen production reactors</b> .....	86

<b>Objetivos específicos abarcados en este capítulo.....</b>	<b>86</b>
<b>Contribución del autor de la tesis.....</b>	<b>86</b>
<i>Abstract.....</i>	<i>88</i>
1. <i>Introduction.....</i>	89
2. <i>Material and methods.....</i>	91
2.1 <i>Selection of H<sub>2</sub>-producing reactors: experimental conditions and monitoring.....</i>	91
2.2 <i>Source of inoculum in systems under study.....</i>	93
2.3 <i>Volumetric H<sub>2</sub> production rate and other key indicators of H<sub>2</sub> production performance.....</i>	93
2.4 <i>Sampling and DNA extraction.....</i>	94
2.5 <i>Quantification of homoacetogens by qPCR.....</i>	94
2.6 <i>qPCR Fe-Fe hydrogenase gene.....</i>	95
2.7 <i>Homoacetogenic community composition studied by fthfs gene amplicon sequencing.....</i>	95
3. <i>Results.....</i>	96
3.1 <i>Summary of reactors performance.....</i>	96
3.2 <i>Main relationships between H<sub>2</sub> production performance and homoacetogens abundance.....</i>	97
4. <i>Discussion.....</i>	102
4.1 <i>What do we learn from gathered reactor performance?.....</i>	102
4.2 <i>Two rings to rule them all: fthfs and hydA genes as “predictors” of H<sub>2</sub> production performance.....</i>	103
4.3 <i>Predominance of particular homoacetogens in each reactor.....</i>	104
<b>ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>107</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>107</b>
<b>Supplementary material.....</b>	<b>115</b>
<i>ANEXO 1.....</i>	<i>122</i>
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>125</b>
1. <i>Introducción.....</i>	126
1.1 <i>Celdas de combustible microbianas.....</i>	126
1.2 <i>¿Cómo generan electricidad los microorganismos?.....</i>	126
1.3 <i>Microorganismos asociados a la transferencia de electrones al ánodo.....</i>	127
1.4 <i>Mecanismos de transferencia de electrones.....</i>	129
1.5 <i>Utilización de aguas residuales como sustratos para MFCs.....</i>	131
1.6 <i>Antecedentes.....</i>	132
2. <i>Objetivos de este capítulo.....</i>	133
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>134</b>

<b>Trabajo 3. Microbial fuel cell coupled to biohydrogen reactor: a feasible technology to increases energy yield from cheese whey</b> .....	137
<b>Objetivos específicos abarcados en este trabajo</b> .....	137
<b>Contribución del autor de la tesis</b> .....	137
<i>Abstract</i> .....	139
1. <i>Introduction</i> .....	140
2. <i>Materials and methods</i> .....	141
2.2 <i>Complex substrates used to fuel the MFCs</i> .....	142
2.3 <i>Chemical analyses</i> .....	142
2.4 <i>Electrochemical measurements and coulombic efficiency calculation</i> .....	142
2.5 <i>Microbial community analysis</i> .....	143
3. <i>Results</i> .....	145
3.1 <i>Electrochemical performance of the microbial fuel cells</i> .....	145
3.2 <i>Microbial community analysis of anodes</i> .....	148
3.3 <i>Anode bacteria isolation</i> .....	151
4. <i>Discussion</i> .....	151
<b>Acknowledgements</b> .....	155
<b>REFERENCES</b> .....	155
<b>Supporting information</b> .....	161
<b>Trabajo 4. Taxonomy, physiology and genomics insights of a Raoultella strain able to produce H<sub>2</sub>, ethanol and electricity</b> .....	164
<b>Objetivos específicos abarcados en este trabajo</b> .....	164
<b>Contribución del autor de la tesis</b> .....	164
<i>ABSTRACT</i> .....	166
1. <i>Introduction</i> .....	167
2. <i>Material and methods</i> .....	170
2.1 <i>Isolation</i> .....	170
2.2 <i>Biochemical tests</i> .....	171
2.3 <i>Analysis of fermentation products</i> .....	172
2.4 <i>Fe (III) reduction capacity</i> .....	172
2.5 <i>Electron microscopy</i> .....	172
2.6 <i>DNA extraction and genome sequencing</i> .....	173
2.7 <i>Genome analysis</i> .....	173
2.8 <i>Study of the electrogenic capacity</i> .....	174
3. <i>Results</i> .....	174

3.1 Characterization of strain NAR.....	174
3.2 Fermentation products.....	176
3.3 Electroactivity tests .....	176
3.4 Genomic analysis of strain NAR .....	177
4. Discussion.....	180
4.1 Phylogenetic position of strain NAR based on the genome .....	180
4.2 Strain NAR characteristics and physiology compared with other species from the genus <i>Raoultella</i> .....	181
4.3 Electroactivity in the Microbial fuel cell .....	184
4.4 Metabolic insights from the genome .....	185
5. Conclusions.....	186
<b>REFERENCES.....</b>	<b>186</b>
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>191</b>
1. Introducción .....	192
1.1. Electrofermentación como forma de aumentar la producción de H <sub>2</sub> .....	192
1.2 Electrosíntesis microbiana .....	194
1.3 Microorganismos involucrados .....	195
1.4 Efecto de la densidad de corriente en la EF .....	196
1.5 Mecanismos involucrados en EF .....	197
1.6 Efecto de la EF en la producción de H <sub>2</sub> .....	198
1.7 Desarrollo de inóculos electroactivos.....	200
2. Objetivo.....	202
3. Materiales y métodos .....	202
3.1 Desarrollo de inóculos enriquecidos en bacterias electroactivas.....	202
3.2 Ensayos de fermentación .....	204
3.3. Ensayos de EF .....	205
3.4 Análisis de las comunidades microbianas .....	207
3.5 Análisis químicos .....	207
4. Resultados y discusión .....	208
4.1 Enriquecimientos de microorganismos electroactivos.....	208
4.2 Fermentaciones.....	213
4.2.1 Rendimientos de H <sub>2</sub> .....	213
4.2.2 Estudio de los productos de fermentación en los diferentes ensayos.....	214
4.2.3 Composición de las comunidades microbianas en los ensayos de fermentación .....	217



4.3	<i>Ensayos de electrofermentación</i>	222
4.3.1	<i>Rendimiento de H<sub>2</sub></i>	222
4.3.2	<i>Estudio de los productos de EF</i>	223
4.3.3	<i>Comunidades microbianas en los ensayos de EF</i>	224
5.	<i>Conclusiones</i>	227
	<b>REFERENCIAS</b>	228
	<b>Capítulo 5</b>	236
	<i>Discusión general</i>	237
1.	<i>El H<sub>2</sub> en el marco de las biorefinerías</i>	237
2.	<i>Situación actual de la producción de H<sub>2</sub> y nuestros aportes</i>	238
2.1	<i>Rol de las bacterias ácido lácticas en la producción de H<sub>2</sub>, aportes de esta Tesis</i>	239
2.2	<i>El efecto de la homoacetogénesis, su importancia y los aportes de esta Tesis</i>	239
3.	<i>Situación actual de la fermentación oscura</i>	240
3.1	<i>Enfoque en la mejora de producción de H<sub>2</sub> mediante sistemas bioelectroquímicos</i>	240
3.1.1	<i>Electrofermentación, aportes de esta Tesis</i>	240
3.1.2	<i>Celdas de electrosíntesis microbiana (MEC)</i>	241
3.2	<i>Producción de Hytano</i>	242
3.3	<i>Utilización de los AGV generados durante la fermentación oscura</i>	242
3.3.1	<i>Celdas de combustible microbianas, aportes de esta Tesis</i>	243
3.4	<i>Obtención de AGV de interés industrial por fermentación oscura</i>	245
3.4.1	<i>Homoacetogénesis para la obtención de acetato y otros componentes de interés industrial</i>	245
4.	<i>Uso de otros modelos de biorefinería</i>	246
4.1	<i>Microorganismos autótrofos</i>	246
5.	<i>Técnicas abordadas en estos estudios</i>	247
6.	<i>Perspectivas</i>	248
6.1	<i>Integración de la fermentación oscura y MEC</i>	249
6.2	<i>Integración de la fermentación oscura con la foto fermentación</i>	249
6.3	<i>Desafíos en la purificación, uso, almacenamiento y transporte de H<sub>2</sub></i>	251
6.4	<i>Materiales de segunda generación</i>	251
6.5	<i>Nuevas tecnologías para el estudio de las comunidades microbianas</i>	252
6.6	<i>Biorefinería y economía circular</i>	253
7.	<i>Conclusiones finales</i>	255
	<b>REFERENCIAS</b>	256

## Resumen de la tesis

Nuestro país está transitando hacia la aplicación de una matriz energética limpia y renovable. En este marco, la utilización de residuos agroindustriales para obtener energía tiene un gran potencial debido a la gran cantidad de residuos generados para los cuales aún no está implementado un manejo sustentable.

En los últimos años se ha investigado varios procesos biológicos novedosos de obtención de energía a partir de residuos. Pero, la aplicación de estos procesos depende de entender como funcionan y optimizar las condiciones.

En este trabajo de Tesis se estudiaron tres procesos novedosos de obtención de energía limpia: la producción de hidrógeno por fermentación oscura la producción de electricidad en celdas de combustible microbianas y la electrofermentación. Se estudiaron aspectos básicos de los tres procesos.

En el tema de producción de hidrógeno mediante fermentación oscura, en un primer trabajo, se buscó entender las interacciones entre los microorganismos involucrados en el proceso. Para ello el primer paso fue aislar los microorganismos predominantes para luego estudiar las interacciones entre ellos. Se diseñó entonces un esquema de trabajo para aislar los microorganismos predominantes en los reactores de producción de H<sub>2</sub>. Se aplicó esta metodología a dos muestras de un reactor de producción de hidrógeno, una muestra tomada durante baja producción y otra tomada durante buena producción de H<sub>2</sub>. Se comparó los resultados de los aislamientos con los resultados del análisis de las comunidades microbianas mediante secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S. Los resultados mostraron que mediante la metodología empleada se logró aislar la mayoría de los microorganismos detectados mediante secuenciación masiva. Se aislaron organismos de los géneros *Clostridium*, *Rahnella*, *Megasphaera*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Chryseobacterium* y *Acetobacter*. Se confirmó la capacidad de producción de H<sub>2</sub> de los aislados de *Clostridium*, *Rahnella* y *Megasphaera*. Los experimentos de cocultivo indicaron que el cocultivo con *Megasphaera* logró evitar la inhibición total de *Clostridium* por *Lactobacillus*.

Se estudió también una de las principales fuentes de inestabilidad en los reactores de producción de H<sub>2</sub>: la homoacetogénesis. Mediante este proceso algunos microorganismos producen acetato consumiendo hidrógeno y CO<sub>2</sub>. En el marco de una colaboración con investigadores de México y Chile, se analizaron 19 biorreactores de producción de H<sub>2</sub> con

diferentes configuraciones y condiciones de funcionamiento. Las muestras se analizaron mediante qPCR y secuenciación masiva del gen funcional *fthfs* (marcador de microorganismos homoacetogénicos). La secuenciación masiva reveló que, en los sistemas alimentados con glucosa predominó *Acetobacterium woodii*. Los sistemas alimentados con suero de queso en polvo dieron como resultado la codominancia de *Blautia coccooides* y especies no clasificadas dentro de *Sporoanaerobacter*. En sistemas alimentados con glicerol *Eubacterium limosum* y *Selenomonas* sp. eran dominantes. Estas dinámicas poblacionales fueron influenciadas por el inóculo utilizado, el sustrato y las condiciones de operación.

Dentro del tema de celdas de combustible microbianas (MFC), se buscó conocer cuáles son los microorganismos electroactivos y cómo funcionan. Se aislaron microorganismos de tres celdas: una operada con suero de queso, otra operada con la salida del reactor hidrogenogénico y otra celda control alimentada con acetato. El objetivo de la operación de estas celdas fue determinar la factibilidad de obtener energía en MFC utilizando la corriente de salida del reactor hidrogenogénico. Se logró aislar microorganismos pertenecientes a 10 géneros diferentes que incluyen poblaciones electrogénicas conocidas como *Geobacter* (en MFC con efluente del reactor) y poblaciones fermentativas conocidas como *Lactobacillus* (en MFC alimentada con suero de queso). Se logró aislar y caracterizar una cepa (cepa NAR) de una especie no descrita como electrogénica y se decidió profundizar en la caracterización de esta cepa. Los estudios filogenéticos con el genoma completo posicionaron la cepa dentro de la especie *R. ornithinolytica*. Las pruebas electrogénicas revelaron una débil actividad electrogénica. Mediante el estudio del genoma se determinó la presencia de genes que podrían estar involucrados en la transferencia de electrones. Este es el primer aislado de *R. ornithinolytica* con una capacidad electrogénica débil y la segunda especie dentro del género *Raoultella*, lo que sugiere que este género puede desempeñar un papel importante en MFC.

Por último, se estudió el proceso de electrofermentación (EF) como forma de aumentar el rendimiento en la producción de H<sub>2</sub>. Este proceso es una mezcla del proceso de fermentación con sistemas bioelectroquímicos. Mediante la aplicación de determinado voltaje al sistema es posible cambiar los productos de fermentación obtenidos. En esta Tesis se estudió el efecto del agregado de microorganismos electroactivos en la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura y por EF. Para ello se realizaron enriquecimientos de bacterias electroactivas a partir de diferentes inóculos y se determinó el efecto del agregado de estos enriquecimientos en la producción de H<sub>2</sub> por fermentación y EF. Los resultados mostraron que los enriquecimientos fueron efectivos para la selección de microorganismos electroactivos y fermentadores detectándose una

especialización de la comunidad. Si bien los enriquecimientos fueron útiles para lograr mayores rendimientos en la EF, se requieren más estudios para mejorar la reproducibilidad del proceso.

El conocimiento adquirido en este trabajo permitirá avanzar en el entendimiento de estos tres procesos novedosos de producción de energía limpia. Sin embargo, se requiere más investigación para que la mejora de los procesos y lograr su aplicación a gran escala.

## Abstract

Our country is moving towards the application of a clean and renewable energy matrix. In this framework, the use of agro-industrial waste to obtain energy has great potential due to the large amount of waste generated for which sustainable management has not yet been implemented.

In recent years, several novel biological processes for obtaining energy from waste have been investigated. However, the application of these processes depends on understanding how they work and optimizing the conditions.

In this thesis work, three novel processes for obtaining clean energy were studied: the production of hydrogen by dark fermentation, the production of electricity in microbial fuel cells, and electrofermentation. Basic aspects of the three processes were studied.

On the subject of hydrogen production through dark fermentation, in a first work, it was sought to understand the interactions between the microorganisms involved in the process. For this, the first step was to isolate the predominant microorganisms and then study the interactions between them. A working scheme was then designed to isolate the predominant microorganisms in the H<sub>2</sub> production reactors. This methodology was applied to two samples from a hydrogen production reactor, a sample taken during low production and another taken during good H<sub>2</sub> production. The results of the isolates were compared with the results of the analysis of the microbial communities by massive sequencing of the 16S rRNA gene. The results showed that by means of the methodology used, it was possible to isolate most of the microorganisms detected by massive sequencing. Organisms of the genera *Clostridium*, *Rahnella*, *Megasphaera*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Chryseobacterium* and *Acetobacter* were isolated. The H<sub>2</sub> production capacity of the isolates of *Clostridium*, *Rahnella* and *Megasphaera* was confirmed. Coculture experiments indicated that coculture with *Megasphaera* was able to avoid total inhibition of *Clostridium* by *Lactobacillus*.

One of the main sources of instability in H<sub>2</sub> production reactors was also studied: homoacetogenesis. Through this process some microorganisms produce acetate consuming hydrogen and CO<sub>2</sub>. In the framework of a collaboration with researchers from Mexico and Chile, 19 H<sub>2</sub> production bioreactors with different configurations and operating conditions were analyzed. The samples were analyzed by qPCR and massive sequencing of the functional *fthfs* gene (marker of homoacetogenic microorganisms). Massive sequencing revealed that *Acetobacterium woodii* predominated in glucose-fed systems. Systems fed whey cheese powder resulted in the codominance of *Blautia coccoides* and species not classified within *Sporoanaerobacter*. In systems fed with glycerol *Eubacterium limosum* and *Selenomonas* sp. they were dominant. These population dynamics were influenced by the inoculum used, the substrate and the operating conditions.

Within the topic of Microbial Fuel Cells (MFC), the Thesis was focus in know who the electroactive microorganisms are and how they work. Microorganisms from three cells were isolated: one operated with cheese whey, another operated with the outlet of the hydrogen-

producing reactor and another control fed with acetate. The objective of the operation of these cells was to determine the feasibility of obtaining energy in MFC using the outlet stream of the hydrogen-producing reactor. It was possible to isolate microorganisms belonging to 10 different genera that include known electrogens as *Geobacter* (in MFC with reactor effluent) and fermentative populations as *Lactobacillus* (in MFC fed with cheese whey). It was possible to isolate and characterize a strain (strain NAR) of a species not described as electrogenic and it was decided to deepen the characterization of this strain. Phylogenetic studies with the whole genome positioned the strain within the species *R. ornithinolytica*. Electrogenic tests revealed weak electrogenic activity. By studying the genome, the presence of genes that could be involved in the transfer of electrons was determined. This is the first isolate of *R. ornithinolytica* with a weak electrogenic capacity and the second species within the genus *Raoultella*, suggesting that this genus may play an important role in MFC.

Finally, the electrofermentation (EF) process was studied as a way to increase the yield in the H<sub>2</sub> production. This process is a mixture of the fermentation process with bioelectrochemical systems. By applying a certain voltage to the system, it is possible to change the fermentation products obtained. In this thesis, the effect of the addition of electroactive microorganisms in the production of H<sub>2</sub> by dark fermentation and by EF was studied. For this, enrichments of electroactive bacteria were made from different inocula and the effect of adding these enrichments on the production of H<sub>2</sub> by fermentation and EF was determined. The results showed that the enrichments were effective for the selection of electroactive and fermenting microorganisms, detecting a specialization of the community. Although the enrichments were useful to achieve higher yields in electrofermentation, more studies are required to improve the reproducibility of the process.

The knowledge acquired in this work will allow to advance in the understanding of these three novel processes of clean energy production. However, more research is required for the improvement of the processes and its implementation on a large scale.

### *Lista de abreviaciones*

- AEF, electrofermentación anódica
- AGV/VFA, ácidos grasos volátiles
- ARB, bacterias respiradoras de ánodos
- BES, sistemas bioelectroquímicos
- CEF, electrofermentación catódica
- CH<sub>4</sub>, metano
- CO, monóxido de carbono
- CO<sub>2</sub>, dióxido de carbono
- COV, carga orgánica volumétrica
- CSTR, reactor de tanque agitado
- CV/VC, voltametría cíclica
- DBO, demanda biológica de oxígeno
- DIET, transferencia de electrones extracelulares directos
- DQO/COD, demanda química de oxígeno
- EF, electrofermentación
- EGSB, reactor de expansión de biomasa granular
- FBR, reactores anaeróbicos de lecho fijo
- Fd, ferredoxina
- fthfs*, formil tetrahidrofolato sintetasa
- GEI gases de efecto invernadero
- GC, cromatografía de gases
- H<sub>2</sub>, hidrógeno

HPLC, cromatografía líquida de alta resolución

HY, rendimiento de hidrógeno

IET, transferencia de electrones interespecies

VHPR, tasa de producción volumétrica de H<sub>2</sub>

*hydA*, hierro hidrogenasa

LAB, bacterias ácido lácticas

MDC, celdas microbianas de desalinización

MES, celdas de electrosíntesis microbiana

MIET, transferencia de electrones mediada

MFC, celdas de combustible microbianas

OLR, tasa de carga orgánica

ORP, potencial de oxidación-reducción

OTUs, unidades taxonómicas operacionales

PDO, 1,3-propanodiol

PHA, polihidroxialcanoatos

PHB, polihidroxibutirato

qPCR, reacción de cadena de polimerasa en tiempo real

TCD, detector de conductividad térmica

TRH/HTR, tiempo de retención hidráulico

TPH, tasa volumétrica de hidrógeno

TPEH, tasa volumétrica específica de hidrógeno

UASB, reactor anaerobio de flujo ascendente

SBR, secuenciación por lotes



SST, solidos suspendidos totales

SSV, solidos suspendidos volátiles

RT, roll tube

WE, electrodo de trabajo

# Capítulo 1

## 1. INTRODUCCION GENERAL

### 1.1. Importancia de las energías renovables en Uruguay

En la actualidad la mayoría de los países dependen de los combustibles fósiles para sustentar las demandas energéticas. Dentro de los combustibles fósiles está el petróleo, carbón y gas natural. Sin embargo, estas fuentes son limitadas. Actualmente los combustibles fósiles proporcionan casi el 80 % del suministro mundial de energía representando alrededor del 40 % de las necesidades mundiales de energía totales y el 90 % de los combustibles en el sector del transporte (Ritchie y Roser, 2020). La combustión de los combustibles fósiles genera dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), dióxido de azufre y monóxido de carbono (CO) como principales subproductos (Modestra et al., 2020) que impactan negativamente en el medio ambiente contribuyendo en gran medida a los efectos adversos del calentamiento global.

La minería del carbón, la exploración de petróleo, y el refinamiento producen desechos tóxicos sólidos, como el mercurio y otros metales pesados (Allen et al., 2009).

La quema de carbón para producir electricidad utiliza grandes cantidades de agua y, a menudo se descarga el arsénico y el plomo en las aguas superficiales. Además, se libera CO<sub>2</sub>, dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno y mercurio en el aire (Mastorakis et al., 2011; Jacquet et al., 2007). La gasolina y otros productos derivados del petróleo causan contaminación similar. La liberación de estos contaminantes nocivos a la atmósfera provoca riesgos para la salud, como trastornos respiratorios y los problemas ambientales, como la lluvia ácida y el agotamiento de la capa de ozono. La quema indiscriminada de combustibles fósiles libera gases de efecto invernadero (GEI) a la atmósfera causantes del calentamiento global generalizado. El cambio climático puede dañar la agricultura, causar la extinción de la flora y fauna exótica, peligro del suministro de agua limpia, y propagación de enfermedades tropicales (Dalby, 2009).

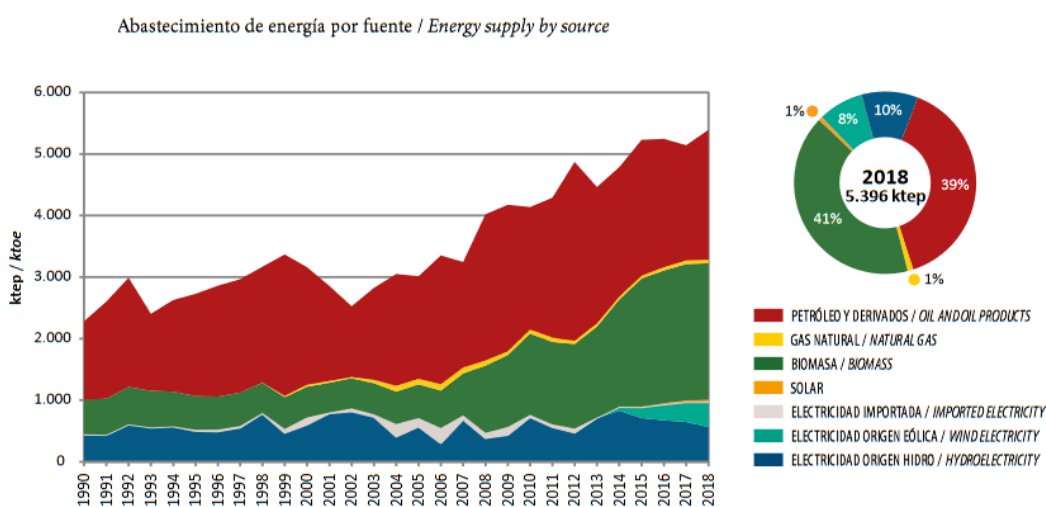
La energía eólica, la energía hidráulica, la energía a partir de biomasa se está desarrollando como alternativas a los combustibles fósiles-CO<sub>2</sub> intensivos. Debido al agotamiento de los combustibles fósiles, una economía basada en energía renovable es más atractiva, ya que es segura y sostenible. Además, las fuentes de energía renovable emiten concentraciones mucho más bajas de contaminantes en comparación con los combustibles fósiles (Allen et al., 2009).

En cuanto la situación energética de Uruguay, según el reporte del 2018, presenta una oferta energética compuesta en un 39 % por petróleo y 1 % de gas como fuentes no renovables. En cuanto a las renovables, la hidroenergía aporta un 10 %, la eólica un 8 % y la solar un 1 %. La

biomasa se ha incrementado de un 18 % en el 2007 a un 41% en el 2018 (Fig. 1). Por otro lado, en el 2018 el abastecimiento de petróleo y derivados aumentó 13 % (240 ktep) en relación al 2017, en tanto solar y la electricidad de origen eólico aumentaron 49 % (13 ktep) y 25 % (82 ktep) respectivamente. Estos crecimientos compensaron la reducción en la electricidad de origen hidroeléctrica (13 %; 83 ktep) y gas natural (6 %; 3 ktep), lo que resultó en un aumento neto en el abastecimiento de energía total (Fuente: <https://ben.miem.gub.uy/descargas/1balance/1-1-Libro-BEN2018.pdf>) (Fig. 1).

A pesar de los avances se evidencia la fuerte dependencia hacia las fuentes de energía no renovables (petróleo) que posee el país y la necesidad de diversificar la matriz energética, logrando potenciar la generación de energía a partir de fuentes renovables, de materias primas de producción nacional, en un intento de lograr la soberanía energética.

La utilización de otras fuentes de energía, como las renovables, generaría una serie de beneficios entre los que se encuentran la reducción en el gasto de divisas y la generación de mecanismos de encadenamiento positivo en sentido económico (generación de empleo, aumento de la cadena de valor de otros sectores) (Amulya et al., 2016).



Notas/Notes:  
 1) El abastecimiento de carbón y coque no se representa ya que resulta en valores pequeños respecto al resto de las fuentes.  
 2) El abastecimiento de energía solar incluye la energía solar térmica y la electricidad de origen solar fotovoltaico.  
 1) The supply of coal and coke is not represented as it is a small value compared to the rest of the sources.  
 2) Solar energy supply includes solar thermal energy and photovoltaic solar electricity.

Figura 1. Situación actual del abastecimiento de energía en Uruguay

### 1.1. Valorización de residuos

Por otro lado, se estima que la producción mundial de residuos, en el 2010, está entre 7 y 10 mil millones de toneladas, la mitad de las cuales son producidas por los países más industrializados (PNUMA, 2015). La globalización está causando un aumento de los residuos per cápita también en los países no desarrollados, trasladando a las personas de las zonas rurales a las urbanas y aumentando la tasa de residuos peligrosos e industriales (PNUMA, 2015).

La mayoría de los desechos en todo el mundo están destinados a ir a los vertederos o, en el peor de los casos, a la eliminación no controlada. Esto genera daños ambientales y pérdidas económicas debido a los efectos secundarios como la crisis turística y el alto costo de la limpieza de los entornos (Wilson y Velis, 2015). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar una gestión sostenible de los residuos destinada a reducir los desechos y mejorar la salud humana y del medio ambiente.

Los efluentes industriales representan un producto residual indeseable que genera grandes problemas ambientales (Wilson y Velis, 2015). Cada año se producen más de 300 km<sup>3</sup> de aguas residuales en todo el mundo. Este volumen es igual a un séptimo del volumen global del río. Alrededor del 60 % de estas aguas residuales se tratan antes de la liberación usando procesos biológicos (Wu et al., 2019).

En nuestro país, varias industrias han incorporado plantas de tratamiento de efluentes para disminuir la contaminación. Sin embargo, las metodologías que son usadas en dichos procesos son demasiado costosas generando una pérdida económica para las empresas. Por esta razón, se buscan alternativas para obtener energía a partir de las aguas residuales. Dada la alta concentración de materia orgánica y los grandes caudales generados, la producción de energía a partir de su tratamiento se vuelve muy atractiva (Henze et al., 2008).

En Uruguay el proyecto Biovalor tuvo como objetivo hacer un relevamiento de los residuos de nuestro país y promover su valorización. En este contexto se busca lograr la transformación de residuos generados a partir de las distintas actividades agropecuarias, agroindustriales y de pequeños centros poblados en energía y/o subproductos. Esto permitiría desarrollar un modelo sostenible de bajas emisiones (contribuyendo a la reducción de GEI) mediante el desarrollo y aplicación de tecnologías adecuadas. Dentro de estas tecnologías están consideradas la digestión anaerobia para generación de biogás y biofertilizante, el tratamiento de agua para fertirriego, el tratamiento de residuos para uso como mejoradores de suelo, entre otras. Esto ha permitido adoptar aplicaciones de conversión de residuos en energía y otras aplicaciones de

valorización de residuos viables, en los sectores mencionados (<https://biovalor.gub.uy/descarga/proyecto-completo-espanol/>).

## 1.2. Valorización del suero de queso

La industria láctea genera cantidades significativas de residuos líquidos, mayormente leche diluida, leche separada, crema y suero, incluyendo grasas, aceites, sólidos suspendidos y nitrógeno. La descarga de éstos sin tratamiento previo se convierte en un foco contaminante. En el caso del suero de queso, importante residuo de la industria láctea en Uruguay, se estima que su producción en el país es de 300.000 m<sup>3</sup>/año (datos proporcionados por las principales empresas lácteas del país).

El suero de queso es el líquido que se genera cuando la leche se coagula para la obtención del queso, e incluye todos los componentes de la leche que no se integran en la coagulación de la caseína. Se estima que a partir de 10 litros de leche de vaca se producen 1 a 2 kg de queso y se obtiene un promedio de 8 a 9 kg de suero (Prazeres et al., 2012). El mismo presenta la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de la leche como lactosa, proteínas y materia grasa en menor proporción. Su composición varía dependiendo del origen de la leche y el tipo de queso elaborado, pero en general está compuesto por: minerales (0,46 - 10 %), materia orgánica (entre 0,1 y 100 Kg.m<sup>-3</sup>). Presenta un alto valor de la materia orgánica por la lactosa (0,18 - 60 kg.m<sup>-3</sup>), contenido de proteínas (1,4 - 33,5 Kg.m<sup>-3</sup>) y grasas (0,08 - 10,58 Kg.m<sup>-3</sup>). Esta materia orgánica es aproximadamente 99 % biodegradable (Ergüder et al., 2001).

Dada su alto DQO (demanda química de oxígeno 60 g/ L) se estima que una industria quesera media que produzca diariamente 40.000 litros de suero sin depurar generaría una contaminación diaria similar a una población de 1.250.000 habitantes. Por ello la importancia de que este efluente sea tratado con el fin de no contaminar el ambiente. Además, debido a su alto contenido de materia orgánica es un subproducto que podría ser valorizado obteniendo energía u otros productos con valor agregado.

Con respecto a la valorización del suero de queso, se han estudiado varias alternativas, como la obtención de metano, la obtención de hidrógeno, y su utilización en celdas de combustible microbianas para producir electricidad y otros productos. La obtención de metano, que es una tecnología consolidada, no ha tenido buenos resultados para el suero de queso debido a su alta carga orgánica y el pH ácido (Castelló et al., 2009). Estas dos condiciones lo hace un sustrato muy promisorio para la producción de hidrógeno para la fermentación oscura. Por otro lado, el uso de celdas de combustibles microbianas sería otra manera de valorizar este sub-producto.

### 1.3. *Obtención de H<sub>2</sub> por fermentación oscura*

La fermentación oscura es un proceso similar que la digestión anaeróbica pero con obtención de H<sub>2</sub> al final del proceso (Aguilar-Aguilar et al., 2019). En la fermentación oscura, los sustratos son convertidos por bacterias anaeróbicas que crecen en la oscuridad. El H<sub>2</sub> es el sustrato clave en el metabolismo de muchos microorganismos anaeróbicos, que son capaces de utilizar moléculas de hidrógeno ricas en energía. En comparación con otros procesos, la fermentación oscura parece ser más prometedora ya que no necesita energía luminosa, y requiere menores demandas de energía (Aguilar-Aguilar et al., 2019).

### 1.4. *Celdas de combustible microbianas*

Las celdas de combustible microbianas (en inglés Microbial Fuel Cells, MFC) son dispositivos bioelectroquímicos (BES) que convierten un sustrato en electricidad mediante la actividad metabólica de microorganismos (Ieropoulos et al., 2005).

Se ha estudiado diversos compuestos orgánicos como fuentes de energía en MFCs. Desde carbohidratos (glucosa, sacarosa, celulosa y almidón), ácidos grasos volátiles (formiato, acetato, butirato), alcoholes (etanol, metanol), aminoácidos, proteínas e incluso compuestos inorgánicos como sulfuros y drenajes de minas (Cheng et al., 2011, Clauwaert et al., 2008, He et al., 2005, Heilmann and Logan, 2006, Ishii et al., 2013, Min et al., 2005, Rabaey y Rozendal 2010).

A pesar de que se ha obtenido buenos rendimientos energéticos con sustratos puros, su aplicación a gran escala no es factible económicamente. Por otro lado, la utilización de aguas residuales tiene la ventaja de eliminar un contaminante y obtener energía. En este sentido se ha utilizado un amplio rango de aguas residuales como agua residual doméstica (Liu et al., 2011), agua residual de producción cervecera (Feng et al., 2008), agua residual del reciclado de papel (Huang y Logan, 2008) y efluente de digestores anaeróbicos (Aelterman et al., 2006a).

Sin embargo, la cantidad de electricidad producida es alrededor de 10 veces menor que la producida por sustratos puros (Aelterman et al., 2006a, Clauwaert et al., 2008a) por lo cual es necesario optimizar los procesos. Además, se ha reportado que la composición del agua residual afecta fuertemente el potencial de las MFCs (Rabaey y Verstraete, 2005). El tipo de agua residual afecta la composición microbiana de la comunidad que coloniza el bioánodo por lo cual se afectará el rendimiento del proceso (Wenzel et al., 2017).

### 1.5. *Electrofermentación*

Dentro de los sistemas bioelectroquímicos se encuentra la electrofermentación (EF). La EF es un proceso que consiste en controlar electroquímicamente el metabolismo de la fermentación microbiana utilizando electrodos. Esto permite modificar el medio cambiando el equilibrio redox pudiéndose obtener mejores rendimientos de determinados productos de fermentación como, por ejemplo, el H<sub>2</sub>. Para esto, la elección de un buen inóculo es necesaria para la EF. Este inóculo debe estar compuesto de bacterias electroactivas y fermentadoras especializadas en el producto deseado. Se ha demostrado que se puede obtener enriquecimientos de bacterias electroactivas de muchas fuentes ambientales como como agua dulce, sedimentos marinos, lodo anaeróbico, lodos de plantas de tratamiento de aguas entre otros (Miceli et al., 2012). El estudio de las comunidades microbianas presente en estos sistemas es fundamental para entender los procesos y elaborar estrategias para la mejora de la producción de H<sub>2</sub>

### 1.6. *Temas a abordar en esta Tesis*

En esta Tesis se propuso estudiar la microbiología de tres procesos novedosos de producción de energía utilizando aguas residuales. En el tema de producción de H<sub>2</sub> por fermentación de aguas residuales, de las limitaciones que presenta este proceso es la competencia de los microorganismos productores de H<sub>2</sub> con otros microorganismos no productores o consumidores de H<sub>2</sub>. Se abordaron varias metodologías para estudiar este problema. Dentro de las técnicas dependientes de cultivo se aplicaron las técnicas de aislamiento y estudio de la producción de H<sub>2</sub> en cultivos puros. Además, se realizaron estudios de sinergia y competencia mediante cocultivos de varios microorganismos. Como métodos independientes de cultivo se aplicaron las técnicas de secuenciación masiva y qPCR de genes funcionales. Con estas últimas técnicas se estudió la homoacetogénesis como proceso que afecta los rendimientos en la producción de H<sub>2</sub>.

Por otro lado, se estudió la comunidad microbiana de tres MFC operadas con diferentes sustratos y se profundizó en la caracterización de una cepa mediante análisis bioquímicos y secuenciación del genoma.

Finalmente se realizó una pasantía en el instituto INRA, Narbonne, Francia para estudiar los procesos de electrofermentación como estrategia para optimizar la producción de H<sub>2</sub>.



### 1.7. Objetivo general de la tesis

Obtener conocimiento de tres procesos novedosos de obtención de energía: la producción de hidrógeno por fermentación oscura, la obtención de electricidad por celdas microbianas y la electrofermentación. En la figura 2 se indica el encuadre general de la tesis.

#### Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar las bacterias productoras de hidrógeno y competidoras de importancia en reactores hidrogenogénicos.
- Determinar el máximo rendimiento en H<sub>2</sub> que pueden obtener las bacterias productoras de H<sub>2</sub>.
- Determinar el efecto de sinergia y de competencia con otros microorganismos aislados del reactor.
- Conocer la relevancia de la homoacetogénesis como causante del bajo rendimiento y la inestabilidad en la producción de H<sub>2</sub>.
- Aislar y caracterizarlas microorganismos responsables de transferencia de electrones en MFC operadas en nuestro laboratorio.
- Profundizar en la caracterización de una cepa electrogénica aislada de una MFC operada en nuestro laboratorio.
- Estudio de los procesos de electrofermentación para la producción de H<sub>2</sub>

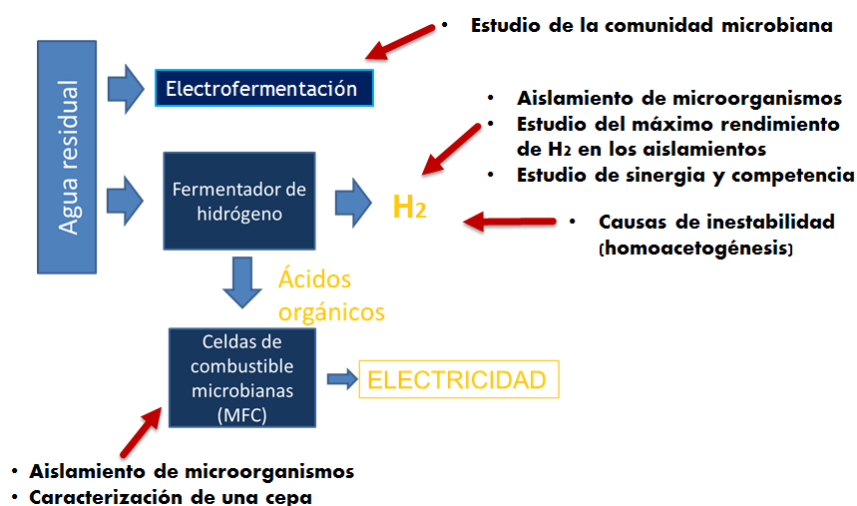


Figura 2. Esquema de objetivos de la tesis

### 1.8. Organización de la tesis

En el Capítulo 1 se realiza una introducción general de los temas que se van a ir abordando en la tesis así como la situación actual de las energías renovables en el país y en el mundo. Se establece el marco general de la tesis.

En el Capítulo 2 se enfoca específicamente en la producción de H<sub>2</sub> donde se recopiló información acerca de la microbiología de los procesos de producción de H<sub>2</sub> así como también los procesos que compiten con la producción de H<sub>2</sub>. Se recopilan las distintas configuraciones de reactores operados para la producción de H<sub>2</sub>. Asimismo, se mencionan algunas técnicas de Biología Molecular comúnmente aplicadas, así como trabajos recientes que muestran el estado del arte en esta área de estudio. En este capítulo se abordan los siguientes objetivos específicos relacionados al estudio de la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura:

- Aislar y caracterizarlas bacterias productoras de hidrógeno y competidoras de importancia en reactores hidrogenogénicos.
- Determinar el máximo rendimiento en H<sub>2</sub> que pueden obtener las bacterias productoras de H<sub>2</sub>.
- Determinar el efecto de sinergia y de competencia con otros microorganismos aislados del reactor.

La metodología empleada, los resultados y discusión de resultados se presentan en formato de dos publicaciones: Fuentes et al., 2018 y Fuentes at al., 2020 (en vías de publicación).

En el Capítulo 3 enfoca el tema de la microbiología de celdas de combustible microbianas. En este capítulo se abarcan los siguientes objetivos:

- Aislar y caracterizarlas microorganismos responsables de transferencia de electrones en MFC operadas en nuestro laboratorio.
- Profundizar en la caracterización de una cepa electrogénica aislada de una MFC operada en nuestro laboratorio.

La presentación de los resultados se realiza en el formato de dos publicaciones: Wenzel et al., 2017 y Fuentes at al., 2020 (en vías de publicación). En el primero se presentan los estudios de aislamiento y caracterización de cepas de MFCs operadas en nuestro laboratorio y en el segundo se profundiza en la caracterización y estudio del genoma de la cepa NAR aislada de una MFC.

El Capítulo 4 se enfocó en los trabajos de electrofermentación enmarcado en la pasantía realizada en Francia. En este capítulo se abarcó el siguiente objetivo específico:

- Estudio de los procesos de electrofermentación para la producción de H<sub>2</sub>

Finalmente en el Capítulo 5 se presenta la discusión y conclusiones generales de esta tesis.

La tesis fue realizada en el marco de los proyectos FSE 032, FSE\_1\_2011\_1\_6437, FSE\_1\_2014\_1\_102488

## REFERENCIAS

Aelterman, P., K. Rabaey, P. Clauwaert, and W. Verstraete. (2006a). Microbial fuel cells for wastewater treatment. *Water Science and Technology* 54:9-15.

Aguilar- Aguilar, F.A., Longoria, A., AU, J., AS, S., LA, P., & Sebastian, P. J. (2019). Optimization of Hydrogen Yield from the Anaerobic Digestion of Crude Glycerol and Swine Manure. *Catalysts*, 9(4), 316.

Allen, M. R., Frame, D. J., Huntingford, C., Jones, C. D., Lowe, J. A., Meinshausen, M., & Meinshausen, N. (2009). Warming caused by cumulative carbon emissions towards the trillionth tonne. *Nature*, 458(7242), 1163-1166.

Amulya, K., Reddy, M. V., & Mohan, S. V. (2014). Acidogenic spent wash valorization through polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis coupled with fermentative biohydrogen production. *Bioresource technology*, 158, 336-342.

Cheng, X. Y., & Liu, C. Z. (2011). Hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk by *Clostridium thermocellum*. *Energy & Fuels*, 25(4), 1714-1720.

Clauwaert, P., Rabaey, K., Aelterman, P., De Schamphelaire, L., Pham, T. H., Boeckx, P., ... & Verstraete, W. (2007). Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environmental science & technology*, 41(9), 3354-3360.

Dalby, S. (2009). *Security and environmental change*. Polity.

Ergüder, T. H., Tezel, U., Güven, E., & Demirer, G. N. (2001). Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste management*, 21(7), 643-650.

Feng, Y., Wang, X., Logan, B. E., & Lee, H. (2008). Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(5), 873-880.

He, Y., Li, M., Perumal, V., Feng, X., Fang, J., Xie, J., ... & Wang, F. (2016). Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments. *Nature microbiology*, 1(6), 1-9.

- Heilmann, J., & Logan, B. E. (2006). Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environment Research*, 78(5), 531-537.
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (Eds.). (2008). *Biological wastewater treatment*. IWA publishing.
- Huang, L., & Logan, B. E. (2008). Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(2), 349-355.
- Ieropoulos IA, Greenman J, Melhuish C, Hart J. (2005). Comparative study of three types of microbial fuel cell. *Enzyme Microb Technol*; 37: 238–45.
- Ishii, S. I., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Wu, A., Yamanaka, Y., Neelson, K. H., & Bretschger, O. (2013). Identifying the microbial communities and operational conditions for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water research*, 47(19), 7120-7130.
- Jacquet, F., Bamiere, L., Bureau, J. C., Guindé, L., Guyomard, H., & Treguer, D. (2007). Recent developments and prospects for the production of biofuels in the EU: Can they really be "Part of Solution"? (No. 807-2016-52528)
- Liu, G., Yates, M. D., Cheng, S., Call, D. F., Sun, D., & Logan, B. E. (2011). Examination of microbial fuel cell start-up times with domestic wastewater and additional amendments. *Bioresource technology*, 102(15), 7301-7306.
- Mastorakis, N. E., Jeles, A., Bulucea, C. A., Bulucea, C. A., & Brindusa, C. (2011). Evaluating the environmental impact of coal-fired power plants through wastewater pollutant vector. *EEC*, 1210, 90.
- Min, B., Cheng, S. y Logan, B.E. (2005). Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research* 39, 1675-1686.
- Miceli III, J. F., Parameswaran, P., Kang, D. W., Krajmalnik-Brown, R., & Torres, C. I. (2012). Enrichment and analysis of anode-respiring bacteria from diverse anaerobic inocula. *Environmental science & technology*, 46(18), 10349-10355.
- Modestra, J. A., Katakajwala, R., & Mohan, S. V. (2020). CO<sub>2</sub> Fermentation to Short Chain Fatty Acids using selectively Enriched Chemolithoautotrophic Acetogenic Bacteria. *Chemical Engineering Journal*, 124759.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis—revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 706-716.

Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*, 23(6), 291-298.

Ritchie, H. and Roser, M. (2020) - "Fossil Fuels". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/fossil-fuels>' [Online Resource]

Wilson, D. C., & Velis, C. A. (2015). Waste management—still a global challenge in the 21st century: An evidence-based call for action

Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., Shan, X., ... & Ling, F. (2019). Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature microbiology*, 4(7), 1183-1195.

## Capítulo 2

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Hidrógeno como combustible

El H<sub>2</sub> es considerado el combustible del futuro ya que posee muchos beneficios sociales, económicos y ambientales. Su utilización como energía tiene gran diversidad de aplicaciones y cumple con varios requerimientos ambientales ya que no contribuye a la formación de gases de efecto invernadero, ni lluvia ácida ni disminución de la capa de ozono. En base a estas ventajas se considera al H<sub>2</sub> como la mejor opción de energía limpia y sustentable (Kotay, Das, 2008). El H<sub>2</sub> es un portador de energía atractivo para el futuro debido a su alta eficiencia en su conversión en energía utilizable, posee el mayor contenido de energía por unidad de masa que cualquier otro combustible conocido. Su valor es de 142 MJ/kg en comparación con 50 MJ/kg del gas natural o con 44,6 MJ/kg del petróleo. Además, la generación de contaminantes es baja o nula, dado que su combustión produce solo agua (Benemann, 1996).

La posibilidad de su almacenamiento le permite competir favorablemente con la electricidad en algunos casos. Su capacidad de ser almacenado permite que sea un complemento de algunas energías renovables que funcionan intermitentemente o son irregulares como la eólica o la solar.

El H<sub>2</sub> es el elemento más abundante en el Universo presentándose en forma molecular o iónica. Sin embargo, a pesar de su abundancia, no está disponible para nosotros dado que en la Tierra el H<sub>2</sub> está combinado en su mayor parte formando agua (Graetz et al., 2013)

Además de la utilización como combustible, el H<sub>2</sub> tiene varios usos industriales. En los últimos años casi el 50 % del H<sub>2</sub> producido se dedica a la fabricación de amoníaco, 37 % a las refinerías de petróleo, 8 % en la obtención de metanol, 4 % en otros productos químicos y 1 % en diversas aplicaciones siendo su producción en el mundo de unos 60 millones de toneladas anuales (Singh et al., 2015)

El H<sub>2</sub> se puede producir de manera química o biológica. Actualmente, el H<sub>2</sub> molecular se produce principalmente a partir del uso de combustibles fósiles. La producción mundial de H<sub>2</sub> supera actualmente los mil millones de m<sup>3</sup>/día, el 48 % de la producción utiliza el reformado catalítico de gas natural con vapor. Le siguen el 30 % a partir de hidrocarburos, el 18 % del carbón gasificado y el 4 % por electrolisis (Dincer et al., 2015). Sin embargo, la producción de H<sub>2</sub> a partir de recursos de combustibles fósiles aumenta las emisiones de GEI. Alternativamente, la producción de H<sub>2</sub> a partir de biomasa a través de vías biológicas es una tecnología emergente porque es sostenible y ecológica (Chandrasekhar et al., 2015).

Otra de las formas de producirlo es de manera biológica mediante la actividad bacteriana en birreactores de producción de H<sub>2</sub>. Una gran ventaja del proceso biológico comparado con los procesos químicos es que no se necesita acoplar energía para la producción de H<sub>2</sub>. Por lo cual este proceso es atractivo económicamente además de solucionar un problema ambiental (Wang et al., 2009).

Los estudios en la producción de H<sub>2</sub> se han enfocado en: i) la biofotólisis directa e indirecta utilizando cianobacterias y algas verdes; ii) fotofermentación de H<sub>2</sub> utilizando bacterias fotofermentativas; iii) fermentación oscura mediante bacterias fermentativas (Fig. 1). Sin embargo, cada uno de los procesos tiene sus propias ventajas y desventajas (Wang et al., 2009). La producción fotosintética de H<sub>2</sub> es cuestionada por la baja transferencia de la eficiencia de la luz, la complejidad en el diseño de reactores y la baja tasa de producción de H<sub>2</sub>. Por otro lado, la fermentación oscura parece ser más prometedora ya que no necesita energía luminosa, requiere condiciones de proceso moderadas y tiene menores demandas de energía. Además, el rendimiento de H<sub>2</sub> y la tasa de producción de H<sub>2</sub> de este proceso son más atractivos en comparación con los otros procesos (Das et al., 2008). Por otro lado, si se utiliza materia orgánica de desecho se obtiene un producto con valor agregado a partir del mismo (Castelló et al, 2009). Por lo tanto, además de solucionar un problema ambiental se estaría obteniendo energía renovable y limpia (Hawkes et al, 2002).

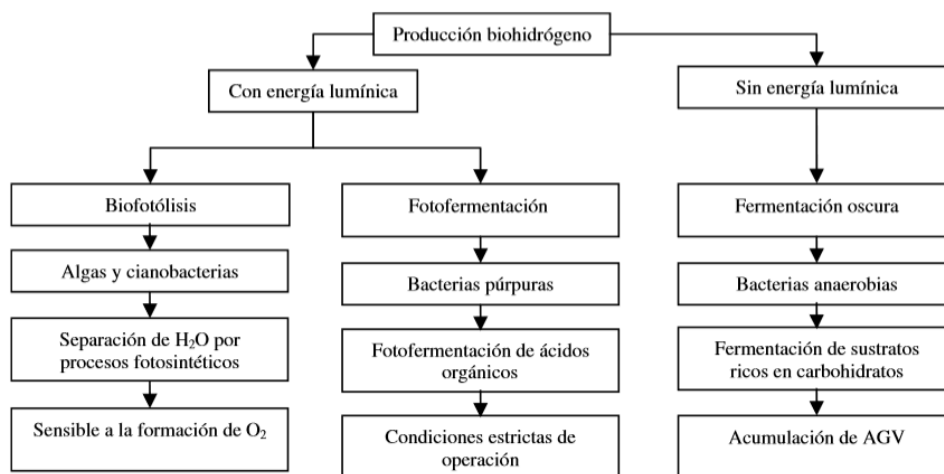


Figura 1. Procesos de producción biológica de H<sub>2</sub> (Blanco et al., 2012).



## 1.2. Fermentación oscura

La fermentación oscura se llama al proceso de obtención de H<sub>2</sub> por la fermentación de la materia orgánica. Este proceso es llevado a cabo por bacterias que pueden transformar compuestos orgánicos en H<sub>2</sub> y otros productos de fermentación (Ghimire et al., 2015).

En los ecosistemas anaerobios la materia orgánica sufre una serie de procesos oxidativos secuenciales en los que participan una compleja red trófica de microorganismos que convierten la materia orgánica en CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (Fig. 2) (Schink, 1997). Este proceso se produce en ausencia de aceptores de electrones inorgánicos (como ser oxígeno, nitrato o sulfato) y en ausencia de luz. Los electrones son finalmente transferidos al CO<sub>2</sub>, que es el aceptor final en esta compleja cadena trófica. Podemos distinguir en el proceso tres etapas básicas: I hidrólisis y fermentación, II acetogénesis y III metanogénesis, que permiten entender la necesidad de una estrecha cooperación entre los diferentes grupos fisiológicos de microorganismos de esta cadena trófica para que el proceso se lleve a cabo (Schink, 1997).

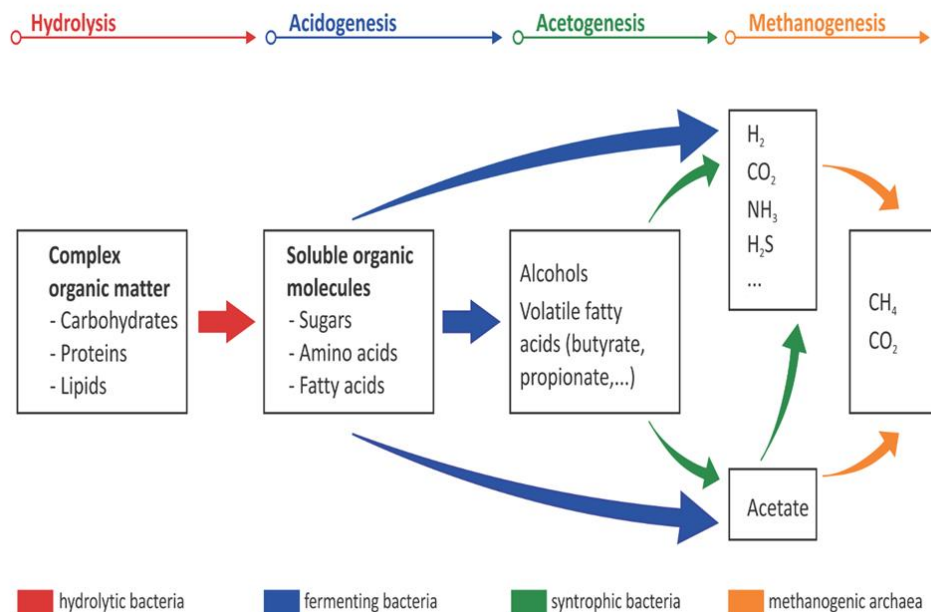


Figura 2. Esquema de la degradación anaerobia (Cabezas et al., 2015).

Para favorecer la obtención de H<sub>2</sub> a partir de compuestos orgánicos es necesario alterar esta cadena trófica de manera de evitar el último paso de consumo de H<sub>2</sub> por las bacterias metanogénicas y favorecer las bacterias fermentadoras productoras de H<sub>2</sub>. Además, se deben evitar los otros procesos en los cuales se consume H<sub>2</sub> (homoacetogénesis) (Wong et al., 2014). Para lograr este objetivo en reactores biológicos es necesario manipular las condiciones de

operación de manera de favorecer las vías fermentativas de producción de H<sub>2</sub> y desfavorecer las vías de consumo de H<sub>2</sub>.

### 1.3. *Vías metabólicas de producción de H<sub>2</sub>*

La fermentación oscura es realizada principalmente por bacterias anaerobias estrictas o facultativas. En general los monosacáridos son la principal fuente de carbono donde se destaca la glucosa seguido de la xilosa, el almidón y la celulosa. La fuente de carbono puede provenir también de la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos (Bundhoo et al., 2016).

En ausencia de oxígeno los protones actúan como aceptores de electrones. En estas condiciones la enzima hidrogenasa es la clave en el proceso de producción de H<sub>2</sub>. Las hidrogenasas son las enzimas que catalizan tanto la absorción como la producción de H<sub>2</sub>. Unos 40 genes hidrogenasas se han secuenciado hasta ahora. Todas las hidrogenasas conocidas contienen Fe, y algunas contienen Ni y Se (Voordouw, 1992; Fang et al., 2006). Las hidrogenasas que contienen Ni y Se facilitan la absorción de H<sub>2</sub>, mientras que los que contienen solo Fe (Fe-hidrogenasas) catalizan la producción de H<sub>2</sub> (Cammack, 1999).

El rendimiento máximo de H<sub>2</sub> que se puede obtener por fermentación oscura es de 4 moles de H<sub>2</sub>/mol de glucosa si se considera el ácido acético como único ácido graso volátil (AGV) producido. Sin embargo, en la práctica se obtiene una producción de H<sub>2</sub> menor a la teórica dado a que la glucosa es también empleada por los microorganismos para su biomasa. Además, los microorganismos presentan varias rutas metabólicas, con diferentes comportamientos fisiológicos (Levin et al., 2004).

Inicialmente las bacterias fermentativas hidrolíticas producen la hidrólisis de la materia orgánica compleja en compuestos más simples. Luego se producen varias reacciones enzimáticas donde la glucosa es degradada a ácido pirúvico por la vía de la glucólisis, también conocida como vía Embden-Meyer-Parnas (EMP), dando lugar a 2 moles de H<sub>2</sub>. Posteriormente, el ácido pirúvico sufre un proceso de descarboxilación oxidativa pasando a acetil-CoA que, dependiendo del sistema enzimático del microorganismo, puede ser metabolizada en acetato, butirato o formiato de los cuales se generan entre 2 o 4 moles de H<sub>2</sub>/mol de glucosa consumida (Levin et al., 2004).

Los microorganismos anaeróbicos facultativos transforman el piruvato en acetil-CoA a través de la catálisis de piruvato-formato liasa (PFL), y luego el H<sub>2</sub> es producido por la H<sub>2</sub> formiato liasa (Levin et al., 2004).

Sin embargo, en microorganismos anaerobios obligados, el piruvato se convierte en acetil-CoA y CO<sub>2</sub> por la ferredoxina oxidorreductasa donde la ferredoxina (Fd) es la coenzima que actúa como receptor de electrones. Esta vía metabólica está presente en algunas especies del género *Clostridium*. Los clostridios descomponen el piruvato en acetil-CoA para producir 2 moles de NADH y 2 moles de ferredoxina reducida (Fd<sub>red</sub>). La enzima piruvato ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) transfiere parte de los electrones a los protones para producir H<sub>2</sub> mediante la enzima hidrogenasa. Por ejemplo, en la enzima hidrogenasa de *Clostridium* (HydA), transfiere los electrones de la Fd<sub>red</sub> a los protones para formar H<sub>2</sub> (Latifi et al., 2019). Otra parte de los electrones los transfiere a NAD<sup>+</sup> para generar NADH. NADH se utiliza también para producir H<sub>2</sub> (Tanisho et al., 1998). El acetil-CoA puede además ser metabolizado a acetato o a butirato.

El rendimiento máximo teórico es de 4 moles de H<sub>2</sub>/mol de glucosa si todo el sustrato se convirtiera en ácido acético. Sin embargo, cuando se genera ácido butírico como subproducto, el NADH es empleado para la oxidación del acetil-CoA a butirato, por lo tanto, la producción de H<sub>2</sub> será de 2 moles/ mol de glucosa consumida (Lee et al., 2011). Estos microorganismos versátiles pueden producir H<sub>2</sub> mediante fermentación acética y fermentación butírica (Castelló et al., 2018).

Dependiendo de las condiciones de cultivo, así como del tipo de microorganismos, se puede generar simultáneamente acetato y butirato produciendo entre 2 y 4 moles de H<sub>2</sub>.

El H<sub>2</sub> producido a partir de la fermentación de glucosa está determinado por la proporción de butirato/acetato producido durante la fermentación. Está reportada una estrecha relación entre la producción de H<sub>2</sub> y la producción de butirato en lugar de la producción de H<sub>2</sub> y la producción de acetato (Cabrol et al., 2017).

Por otro lado, el estado de oxidación-reducción debe equilibrarse mediante el consumo de NADH para formar algunos compuestos reducidos, como lactato, etanol y butanol, lo que da como resultado un rendimiento reducido de H<sub>2</sub>. En los clostridios anaerobios, el formiato no es un intermediario importante en la descomposición del piruvato, aunque dichos organismos poseen formiato deshidrogenasa (Adams et al., 1980).

En microorganismos anaerobios facultativos también se puede generar formiato a partir de acetil-CoA. Esta reacción es catalizada por la piruvato formato liasa (PFL), donde se obtienen 2 moles<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol glucosa consumida. Si se genera ácido propiónico se consume 1 mol de H<sub>2</sub> por mol de ácido propiónico generado. La fermentación que produce ácido láctico y etanol no genera ni consume H<sub>2</sub> (Fig. 3) (Lee et al., 2011).

Hay dos tipos de fermentación de ácido fórmico. La fermentación ácida mixta que da como resultado la producción de etanol y una mezcla de ácidos, particularmente ácidos acético, láctico, succínico y fórmico. Microorganismos como *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus* y otros géneros realizan esta fermentación. La otra vía es la fermentación de butanodiol, el piruvato se convierte en acetoína, que luego se reduce a 2,3-butanodiol con NADH. El etanol también se produce con una cantidad menor de los ácidos que se encuentran en la fermentación de ácidos mixta. La producción de estos compuestos reducidos da como resultado un rendimiento de menos de 2 moles de H<sub>2</sub>/ mol de glucosa. Esta fermentación es característica de *Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia* y algunas especies de *Bacillus* (Lee et al., 2011).

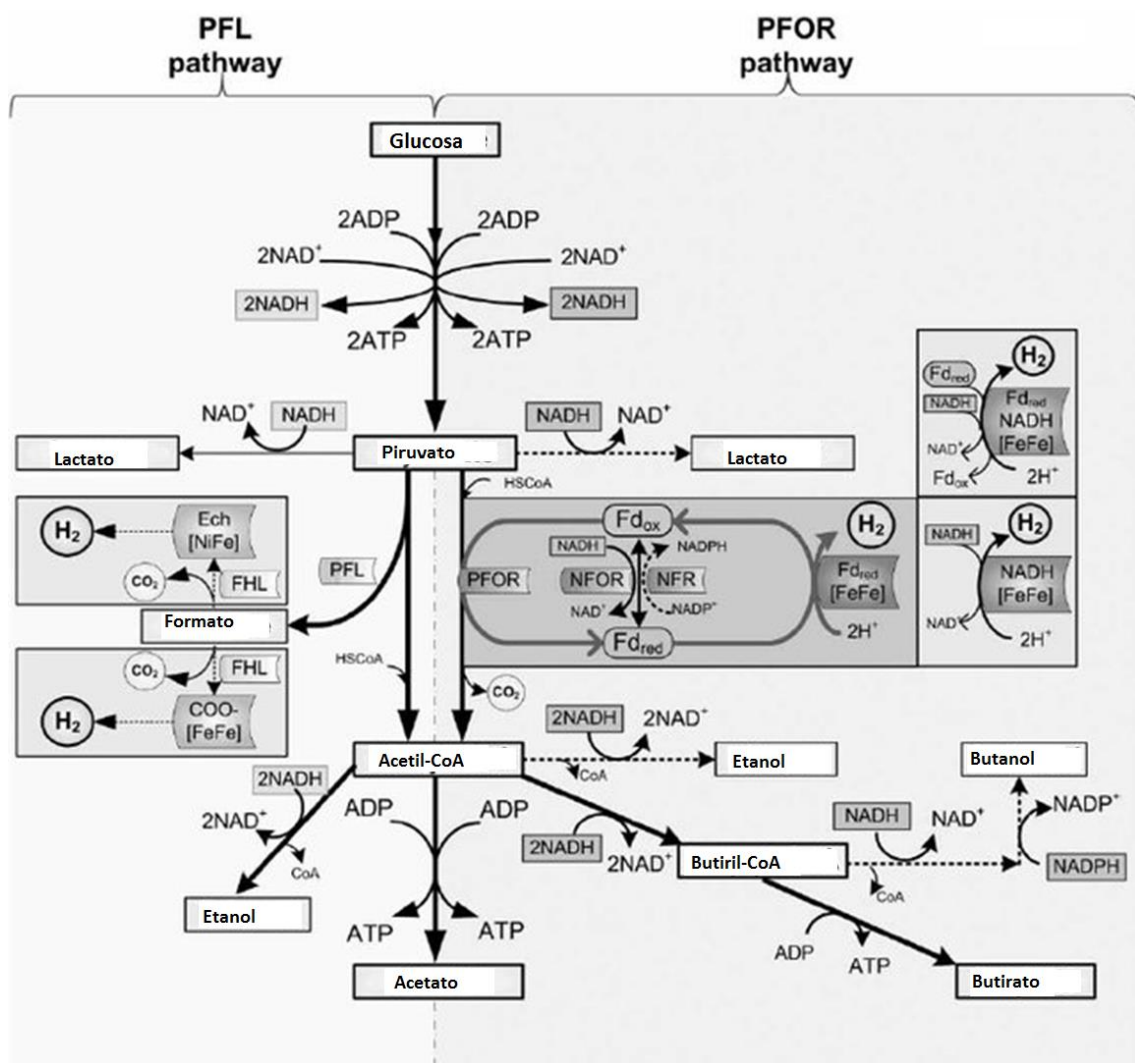


Figura 3. Vías metabólicas de producción de H<sub>2</sub> mediante fermentación. La vía PFL (piruvato formiato liasa) es frecuente en microorganismos anaerobios facultativos. La vía en anaerobios estrictos es la de piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR). NFOR: NADH ferredoxina oxidoreductasa; NFR: NADH ferredoxina reductasa. (Adaptado de Ramírez-Morales et al., 2015)

Las reacciones bioquímicas involucradas en la producción de H<sub>2</sub> en condiciones de termofilia podrían ser diferentes de las condiciones mesofílicas. En condiciones de termofilia, la conversión de glucosa en piruvato se puede lograr mediante una vía de Embden-Meyerhof modificada. La fermentación que sigue a esta última ruta no se combina con la síntesis de ATP. La energía se conserva en el curso de la formación de acetato a partir de acetyl-CoA catalizada por la acetyl-CoA sintetasa (Lee et al, 2011).

### 1.3.1 Bacterias productoras de H<sub>2</sub>

Dentro de las bacterias hidrolíticas y fermentativas se encuentran bacterias anaerobias facultativas como las Enterobacterias y bacterias anaerobias estrictas como organismos de los géneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Propionibacterium* y *Selenomonas* (Mariakakis et al., 2011; Wong et al., 2014; Guo et al., 2010). Los organismos del género *Clostridium* son bacilos gram-positivos, estrictamente anaerobios y formadores de esporas a diferencia de los organismos del género *Enterobacter* que son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos (Hung et al., 2011)

Hasta la fecha, la mayor parte de la investigación sobre la producción de H<sub>2</sub> involucra bacterias anaeróbicas debido a su alta tasa de producción y la capacidad de utilizar una amplia gama de materia orgánica como sustrato incluyendo aguas residuales. Los organismos del género *Clostridium* son productores de ácido y de H<sub>2</sub> típicos, en general, fermentan carbohidratos generando acetato, butirato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Las bacterias del género *Clostridium* son microorganismos anaerobios obligados formadores de esporas y se consideran los productores de H<sub>2</sub> más eficientes, ya que generalmente son dominantes en las comunidades microbianas durante los períodos de mejor rendimiento en los sistemas productores de H<sub>2</sub> (Castelló et al., 2020). *C. butyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. beijerinckii*, *C. thermolacticum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. tyrobutyricum*, *C. thermocellum* y *C. paraputrificum* son ejemplos de estos microorganismos (Chong et al., 2009). Los clostridios producen gas H<sub>2</sub> durante la fase de crecimiento exponencial. Al alcanzar la fase estacionaria, el metabolismo cambia rápido de la producción de H<sub>2</sub> a la producción de otros productos (Chong et al., 2009).

*C. thermocellum* es una bacteria termófila anaerobia que es capaz de producir H<sub>2</sub> a partir de la lactosa produciendo acetato, etanol y lactato en la fase líquida obteniendo un rendimiento de 3 moles de H<sub>2</sub>/ mol lactosa. En teoría, la producción potencial de H<sub>2</sub> es de 8 moles<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol lactosa a través de la vía de acetato. Sin embargo, la coproducción de etanol provoca la falta de disponibilidad de NADH para la generación de H<sub>2</sub>, haciendo que el rendimiento sea inferior a 4 moles de H<sub>2</sub>/ mol lactosa (Collet et al., 2004).

Las bacterias anaerobias facultativas producen ATP por la respiración aeróbica si el oxígeno está presente y son capaces de fermentar en condiciones anaerobias. Esto es una ventaja en comparación con las bacterias anaeróbicas que son sensibles a la presencia de oxígeno (Patel et al., 2014). Además, son importantes para los sistemas fermentativos debido a su capacidad de consumir oxígeno generando rápidamente un ambiente anaeróbico durante el arranque del reactor o colaborando con la supervivencia de microorganismos del género *Clostridium* en caso de una entrada accidental de oxígeno al reactor (Etchebehere et al., 2016)

Dentro de las bacterias anaerobias no esporulantes identificadas como productoras de H<sub>2</sub> pertenecen principalmente a los filos Firmicutes y Bacteroidetes. Dentro de los Firmicutes, microorganismos como *Ethanoligenens harbinense*, *Acetanaerobacterium elongatum* y bacterias del género *Megasphaera* producen H<sub>2</sub>, acetato, etanol y (CO<sub>2</sub>) a partir de glucosa (Castelló et al., 2020). Sin embargo, los géneros mencionados anteriormente están asociados con un menor rendimiento de H<sub>2</sub> en comparación con las bacterias del género *Clostridium* (Patel et al., 2014).

Dentro de los microorganismos facultativos están las especies del género *Enterobacter*. Este es el organismo anaerobio facultativo gram negativo más estudiado con la capacidad de producir H<sub>2</sub>. La especie *Enterobacter cloacae* es capaz de producir H<sub>2</sub> a partir de glucosa, sacarosa y celobiosa con un rendimiento de 2.2 moles<sub>H<sub>2</sub></sub>/ mol de glucosa, 6 moles<sub>H<sub>2</sub></sub>/ mol de glucosa y 5.4 moles<sub>H<sub>2</sub></sub>/ mol de glucosa, respectivamente (Chong et al., 2009). En la tabla 1 se resumen algunos microorganismos productores de hidrógeno.

Tabla 1. Microorganismos productores de H<sub>2</sub>, se muestra el sustrato y el rendimiento en hidrógeno.

Microorganismo	Sustrato	Rendimiento de H <sub>2</sub>	Característica del microorganismo	Rererencia
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	paja de trigo pretratada	3,8 mol/mol sustrato	termofílico	Ivanova et al., 2009
<i>Caloramator celer strain</i>	glucosa	3,0 mol H <sub>2</sub> /mol sustrato	termofílico	Ciranna et al., 2014
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	glucosa	408 mL/g sustrato.	anaerobio estricto	Alshiyab et al., 2008
<i>Clostridium acetobutylicum M121</i>	glucosa	1,8 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	anaerobio estricto	Lin et al., 2007
<i>Clostridium beijerinckii L9</i>	glucosa	2,8 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	anaerobio estricto	Lin et al., 2007
<i>Clostridium bifermentans 3AT-ma</i>	glucosa	33 mL	anaerobio estricto	Zhang et al., 2012
<i>Clostridium butyricum EB6</i>	glucosa	0,6 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	anaerobio estricto	Chong et al., 2009
<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum N1-4 (ATCC 13564)</i>	glucosa	232 mL	anaerobio estricto	Alalayah et al., 2009
<i>Clostridium thermocellum 7072</i>	Tallo de maíz	7,4 mol H <sub>2</sub> /mol hexosa	anaerobio estricto	Cheng et al., 2011
<i>Clostridium thermolacticum</i>	lactosa	3,0 mol H <sub>2</sub> /mol sustrato	anaerobio estricto	Chong et al., 2009
<i>Clostridium tyrobutyricum FYa102</i>	glucosa	1,5 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	anaerobio estricto	Chong et al., 2009
<i>Clostridium tyrobutyricum JM1</i>	glucosa	3,2 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	anaerobio estricto	Jo et al., 2008
<i>Citrobactersp. Y19</i>	glucosa	2,5 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	anaerobio facultativo	Chong et al., 2009
<i>Enterobacter aerogenes NCIMB 10102</i>	Hidrolizado de almidón	6,5 mol H <sub>2</sub> /mol hexosa	anaerobio facultativo	Fabiano et al., 2002
<i>Enterobacter cloacae IIT-BT 08</i>	sucrosa	2,2 mol H <sub>2</sub> /mol hexosa	anaerobio facultativo	Kumar y Das, 2000
<i>Escherichia coli S3</i>	glucosa	1,5 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	anaerobio facultativo	Seppälä et al., 2011
<i>Ethanoligenens harbinense YUAN-3</i>	glucosa	1,9 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	anaerobio estricto	Xing et al., 2008
<i>Klebsiella pneumoniae DSM2026</i>	glicerol	6,5 mol H <sub>2</sub> /mol hexosa	anaerobio facultativo	Lui et al., 2007
<i>Pantoea agglomerans</i>	glucosa	3,8 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	anaerobio facultativo	Zhu et al., 2008
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16</i>	xilosa	2,6 mol H <sub>2</sub> /mol hexosa	termofílico	Ren et al., 2008
<i>Thermoanaerobacter mathranii A3N</i>	glucosa	2,6 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa	termofílico	Jayasinghearachchi et al., 2012
<i>Thermotoga neapolitana</i>	hidrolizado de pulpa de zanahoria	2,7 mol H <sub>2</sub> /mol hexosa	termofílico	De Vrije et al., 2010

#### 1.4. Microorganismos que compiten con la producción de H<sub>2</sub>

La producción de H<sub>2</sub> está fuertemente correlacionada con la composición de la comunidad bacteriana. La existencia de los consumidores de sustrato no productores de H<sub>2</sub> tiene un efecto negativo en el rendimiento global del proceso. Estos microorganismos compiten con los productores de H<sub>2</sub> disminuyendo de ese modo los rendimientos (Jo et al., 2007). Por lo tanto, para mejorar la producción de H<sub>2</sub>, es necesario estudiar la fisiología de estos microorganismos y encontrar las condiciones óptimas de operación del reactor que inhiben su crecimiento (Kim et al., 2006). En la figura 4 se muestran los principales procesos microbianos que compiten con la producción de H<sub>2</sub> y las características de cada vía metabólica.

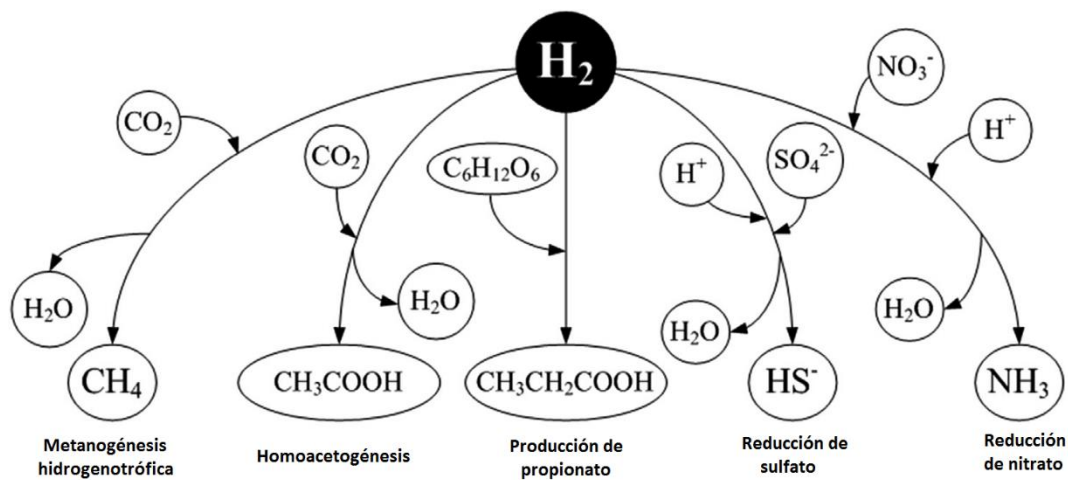


Figura 4. Rutas potenciales para el consumo de H<sub>2</sub> durante la fermentación oscura en un consorcio microbiano (figura extraída y modificada de Bundhoo y Mohee, 2016)

En las tablas 2 y 3 se indican algunos microorganismos consumidores reportados en reactores de producción de H<sub>2</sub>

##### 1.4.1. Bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico producen ácido láctico como un producto primario en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos. Su rol en los sistemas de producción de H<sub>2</sub> es controversial ya que se ha reportado que pueden tener un rol positivo en algunos trabajos y en otros un rol negativo en la producción de H<sub>2</sub>. Pueden tener un efecto adverso en la producción de H<sub>2</sub> ya que compiten por el sustrato con las bacterias productoras de H<sub>2</sub>. Además, pueden producir bacteriocinas que inhiben a algunos *Clostridium* productores de H<sub>2</sub>. Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos, que presentan propiedades antimicrobianas contra otros microorganismos, aumentando la permeabilidad de las membranas celulares permitiendo la

salida de compuestos esenciales en dichas bacterias (Bruno y Montville 1993). Por otro lado, algunos estudios informaron que el ácido láctico tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de H<sub>2</sub> en la fermentación oscura. Wang y Zhao (2009) informaron una disminución en el rendimiento de H<sub>2</sub> a medida que aumentaba la concentración de ácido láctico. Sin embargo, también informaron que la adición de pequeñas cantidades de ácido láctico daba como resultado una mejora en la producción de H<sub>2</sub> (Wang y Zhao, 2009). En consecuencia, se requieren más estudios sobre los efectos del ácido láctico en la fermentación oscura.

Tabla 2. Microorganismos consumidores de H<sub>2</sub> y sus principales productos de fermentación

Microorganismo	Tipo de metabolismo	Temperatura (°C)	Productos de fermentación	Referencia
<b>Productores de propionato</b>				
<i>Propionispira arboris</i>	fermentativo	35	acético, propiónico	Ueki et al., 2014
<i>Schwartzia succinivorans</i>	fermentativo	45	propiónico	Van Gylswyk et al., 1997
<i>Selonomonas</i> sp.	fermentativo	36-39	acético, láctico, propiónico, fórmico	Prins, 1971
<i>Selenomonas lactificifex</i>	fermentativo	30	acético, láctico, propiónico	Schleifer et al., 1990
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	fermentativo	30	propiónico, acético, succínico	Himmi et al., 2000
<i>Clostridium propionicum</i>	fermentativo	30	acético, propiónico, butírico	Ueki et al., 2017
<b>Metanogénicos hidrogenotróficos</b>				
Methanobacteriales and Methanomicrobiales	anaerobio estricto	mesofilia, termofilia	CH <sub>4</sub>	Cabrol et al., 2017
<b>Reductoras de sulfato</b>				
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	anaerobio estricto	30	H <sub>2</sub> S	Dalsgaard y Bak, 1994
<i>Desulfovibrio</i> sp.	anaerobio estricto	-	-	Chaganti et al., 2012
<b>Bacterias ácido lácticas</b>				
<i>Lactobacillus</i> spp	fermentativo	30	láctico, acético	Gomes et al., 2015
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> K13-2	fermentativo	30	láctico, acético	Gomes et al., 2015
<i>Pediococcus</i> spp	fermentativo	39	láctico, acético	Cobos et al., 2011
<i>Lactococcus lactis</i> CE-2	fermentativo	30	láctico	Gomes et al., 2015
<i>Streptococcus</i> spp	fermentativo	mesofilia, termofilia	láctico, acético, formico	Iyer et al., 2010
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	fermentativo	30	láctico, acético	Gomes et al., 2015
<i>Bifidobacterium</i> spp.	fermentativo	30	láctico, acético	Gomes et al., 2015
<i>Sporolactobacillus</i> spp	fermentativo	30	láctico	Chang et al., 2008
<i>Enterococcus</i> sp.	fermentativo	30	láctico	Cai, 1999
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	fermentativo	30	láctico	Shida et al., 2012
<b>Bacterias reductoras de nitrato</b>				
<i>Pseudomonas</i> spp	anaerobio facultativo	30	NH <sub>3</sub>	Gomes et al., 2015

#### 1.4.2. Otros microorganismos fermentadores

Los microorganismos que pertenecen al género *Bacillus* tienen efectos tanto positivos como negativos cuando se identificaron en los diferentes sistemas de H<sub>2</sub> por fermentación oscura (Bundhoo y Mohee, 2016). Se ha reportado que hay especies de *Bacillus subtilis* que poseen un factor anticlostridial que podría inhibir la microorganismos del género *Clostridium* (Teo y Tan 2005). Por otro lado se ha reportado la producción de H<sub>2</sub> por parte de este microorganismo. De hecho los microorganismos del género *Bacillus* demostraron ser unos consumidores eficaces de oxígeno y, en consecuencia, en la mejora del proceso de producción de H<sub>2</sub> fermentativo (Patel et al., 2014).



En el caso de los microorganismos productores de propionato, pueden usar  $H_2$  como donante de electrones y producir propionato. Estos microorganismos también consumen NADH en el proceso, lo que afecta la producción de  $H_2$ . Este es el caso de *Clostridium propionicum* y *C. homopropionicum*. También se ha informado que el propionato tiene efectos inhibitorios en la producción de  $H_2$  (Saady et al., 2013).

#### 1.5. Microorganismos consumidores de $H_2$

Varios grupos de microorganismos son capaces de consumir  $H_2$  en condiciones anaerobias, entre estos procesos tenemos las bacterias sulfato reductoras y nitrato reductoras, las arqueas metanogénicas y las bacterias homoacetogénicas.

Las bacterias reductoras de sulfato pueden usar una amplia variedad de sustratos como donantes de electrones y reducir el sulfato a sulfuro. Las bacterias reductoras de sulfato hidrogenotróficas usan  $H_2$  como donante de electrones. Además, la presencia de sulfuro tiene un efecto tóxico sobre el crecimiento de ciertos microorganismos. Dhar y et al. (2012) informaron que las concentraciones de sulfuro superiores a 100 mg/ L afectan negativamente las actividades de las bacterias productoras de  $H_2$  (Dhar y et al., 2012)

Las bacterias reductoras de nitrato autotróficas también consumen  $H_2$  como donante de electrones y producen amonio. Además, se ha reportado que el amonio inhibe la fermentación oscura (Bundhoo y Mohee, 2016).

##### 1.5.1. Metanogénesis

La metanogénesis es llevada a cabo por un grupo restringido de organismos anaerobios estrictos del Dominio Archaea (Whitman et al., 1992). Los metanogénicos pueden ser acetoclásticos o hidrogenotróficos. Estos últimos son los que producen metano ( $CH_4$ ) utilizando  $CO_2$  como aceptor de electrones y  $H_2$  como donador de electrones, lo que reduce el rendimiento de  $H_2$ . La metanogénesis es el último paso de la degradación anaerobia. El  $CH_4$  es una causa común de inestabilidad y bajo rendimiento en los reactores productores de  $H_2$ . Se han identificado metanogénicos hidrogenótrofos relacionados con los géneros *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium* en sistemas productores de  $H_2$ . Para evitar este proceso, se aplican estrategias como el mantenimiento del pH ácido y tiempos de retención hidráulicos más cortos (Dinamarca et al., 2011). Sin embargo, se ha reportado la persistencia de metanogénesis a pH ácido (Castelló et al., 2009, Carrillo-Reyes et al., 2012). Las bacterias productoras de  $H_2$  del género *Clostridium* al ser esporuladas pueden resistir cuando se exponen a condiciones extremas como alta temperatura o pH muy bajo o alto en comparación con las arqueas

metanogénicas y algunas bacterias del ácido láctico. Esta es la base de las tecnologías de pretratamiento de los inóculos. Dentro de las tecnologías de pretratamiento, el tratamiento térmico es el más reportado a escala de laboratorio (Bundhoo et al., 2015). La eficacia del pretratamiento térmico depende de la temperatura y del tiempo durante el cual se aplica el mismo. Se ha reportado que, aunque los metanógenos pueden eliminarse eficazmente del inóculo mediante tratamiento térmico, durante la operación a largo plazo se detectó nuevamente metano y el lodo debió tratarse nuevamente. Por otro lado, el pretratamiento del inóculo no solo conserva las especies de *Clostridium* sino todas las especies que pueden esporular, como algunas bacterias homoacetogénicas pertenecientes al género *Clostridium* y también organismos del género *Sporolactobacillus*. Por otro lado, también hay microorganismos productores de H<sub>2</sub> no esporulados como las especies de los géneros *Enterobacter* y los organismos *Megasphaera* que se eliminan en el pretratamiento (Castelló et al., 2020).

El control del tiempo de retención hidráulico (TRH) también ha demostrado ser una buena estrategia para eliminar los microorganismos metanogénicos durante la operación cuando se trabaja con CSTR, ya que se eliminan por lavado debido a su baja tasa de crecimiento en comparación con las bacterias fermentativas. Este control es una alternativa al tratamiento térmico para controlar los metanógenos (Cabrol et al., 2017).

#### 1.5.2. Homoacetogénesis

La homoacetogénesis es un proceso llevado a cabo por algunos organismos del género *Clostridium* y de otros anaerobios estrictos que producen acetato a partir de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Gottschalck, 1986). La acetogénesis debe distinguirse de la homoacetogénesis. La acetogénesis es la producción de acetato por microorganismos heterotróficos a través de la oxidación de ácidos orgánicos como los ácidos propiónico, butírico, valérico y los alcoholes. Aunque tanto la acetogénesis como la homoacetogénesis producen acetato, la primera también produce H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, mientras que la segunda consume H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. No todos los microorganismos acetogénicos son homoacetogénicos. La diferencia es una condición trófica o metabólica en lugar de filogenética (Diekert et al., 1994). Los acetogénicos crecen lentamente en una relación sintrófica con los metanogénicos para mantener una presión parcial de H<sub>2</sub> baja p<sub>H<sub>2</sub></sub> (<10 Pa). Los homoacetogénicos comparten con los acetogénicos su capacidad para tolerar una amplia gama de condiciones ambientales. Sin embargo, los homoacetogénicos crecen en H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> más rápido que los acetogénicos en sustrato orgánico. Además, los homoacetogénicos no dependen de la actividad de los metanogénicos porque no están inhibidos por la alta presión H<sub>2</sub>. Se ha informado la homoacetogénesis en la producción de H<sub>2</sub> en condiciones mesofílica, termofílica e

hipertermófila (Diekert et al., 1994). Sin embargo, las bacterias homoacetogénicas y acetogénicas han recibido menos atención que los acidogénicos y metanogénicos, especialmente en los estudios de producción de H<sub>2</sub>.

Este proceso es perjudicial a la producción de H<sub>2</sub> ya que se consume el H<sub>2</sub> producido. La forma de evitar la homoacetogénesis en reactores hidrogenogénicos aún no está muy estudiado (Saady, 2013).

Los microorganismos homoacetogénicos son bacterias muy versátiles, anaerobias estrictas que pueden crecer a partir de diferentes sustratos monocarbonados formando acetato como producto mayoritario (Diekert, 1994). Como se han encontrado mayores indicios de consumo de H<sub>2</sub> en reactores de alta densidad celular se postula que pueden existir mecanismos de transferencia de H<sub>2</sub> en los cuales el H<sub>2</sub> producido es consumido antes de ser liberado, similar a la sintrofia que ocurre en la metanogénesis (Saady, 2013; Dinamarca, 2011). Se ha reportado que la homoacetogénesis presenta inhibición por producto y, siendo el acetato el producto mayoritario, a partir de determinada concentración el proceso se detendría (Dinamarca et al., 2011).

La temperatura de operación influye sobre la cinética de todos los procesos involucrados y sobre la solubilidad de los gases. A mayores temperaturas la solubilidad de los gases es menor lo que disminuiría la disponibilidad del H<sub>2</sub> para las bacterias homoacetogénicas pero a la vez la reacción será más rápida por lo cual tenemos dos fenómenos contrapuestos (Diekert, 1994).

Si bien se ha sugerido que este proceso es una de las principales causas del bajo rendimiento e inestabilidad de los reactores productores de H<sub>2</sub>, no se ha estudiado aún con profundidad, no se conoce su relevancia en los reactores ni las condiciones que la favorecen. Un problema para su estudio es que estos microorganismos son difíciles de aislar y cultivar en el laboratorio. Mediante una técnica basada en la detección del ADN de genes involucrados es posible determinar su prevalencia sin necesidad de aislar los microorganismos. En este trabajo se propone poner a punto una técnica de PCR en tiempo real previamente descrita para cuantificar bacterias homoacetogénicas en rumen (Parameswaran et al., 2011). Esta técnica se basa en la amplificación del gen de formil tetrahidrofolato sintetasa (*fthfs*) presente en bacterias homoacetogénicas. Este gen codifica para una enzima clave en la vía de síntesis de acetyl-CoA en la homoacetogénesis (Xu et al., 2009).

Por otro lado, no se han realizado muchos estudios enfocados a la competencia entre las bacterias homoacetogénicas y las productoras de H<sub>2</sub>. Los trabajos realizados en cultivos puros

de bacterias homoacetogénicas han demostrado que estos microorganismos representan un grupo heterogéneo cuyo metabolismo y rol ecológico es todavía enigmático y debe ser elucidado. Para entender el rol de estas bacterias es necesario estudiarlas además en cultivo puro, de esta forma se podrá entender el rol fisiológico y ecológico en los reactores (Boga et al., 2003). Conociendo cómo funcionan estos organismos se podrá elaborar estrategias para obtener una mayor eficiencia en la producción de H<sub>2</sub> en los reactores.

Tabla 3. Microorganismos homoacetogénicos reportados en reactores de producción de H<sub>2</sub> (Modificada de Schiel-Bengelsdorf y Dürre, 2012; Fast et al., 2015)

Microorganismo	Temperatura (°C)	Formación de espora	Productos de fermentación
<i>Acetitomaculum ruminis</i>	38	-	acético
<i>Acetoanaerobium noterae</i>	37	+	acético
<i>Acetobacterium</i> sp.	27-30	-	acético
<i>Acetobacterium woodii</i>	mesofílico	no reportado	acético
<i>Acetobacterium tundrae</i>	20	no reportado	acético
<i>Acetogenium kivui</i>	no reportado	no reportado	acético
<i>Acetohalobium</i>	38-40	-	acético
<i>Acetonema</i>	30	+	acético, butírico
<i>Acetonema longum</i>	no reportado	no reportado	acético, butírico
<i>Clostridium aceticum</i>	mesofílico	+	acético
<i>Eubacterium aggregans</i>	35	-	acético, fórmico, butírico
<i>Clostridium drakei</i>	5-40	no reportado	acético, etanol, butírico
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	no reportado	+	acético, fórmico
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	no reportado	+	2,3 butanodiol, acético, etanol
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	37	+	acético, etanol, butírico, butanol
<i>Eubacterium limosum</i>	no reportado	no reportado	acético, butírico, láctico, caprónico
<i>Eubacterium aggregans</i>	35	-	acético, fórmico
<i>Moorella thermoacetica</i>	no reportado	no reportado	acético
<i>Peptostreptococcus</i>	35-42	+	acético
<i>Clostridium carboxidivorans</i> P7T	38	+	acético, etanol, butírico, butanol, hexanol
<i>Blautia coccooides</i>	37	+	acético
<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	35-37	no reportado	acético
<i>Sporomusa</i> spp.	30	+	acético
<i>Syntrophococcus</i>	no reportado	-	acético

### 1.6. Métodos para estudiar la microbiología de los procesos de producción de H<sub>2</sub>

Para comprender el comportamiento de los reactores productores de H<sub>2</sub>, es necesario conocer las comunidades microbianas que se seleccionan durante la operación del mismo. Para ello, se utilizan con frecuencia herramientas moleculares basadas en ADN porque son rápidas y se pueden analizar varias muestras al mismo tiempo, y el ADN se puede almacenar y analizar al final de los experimentos. Además permite el estudio de microorganismos no cultivables. Técnicas como DGGE, T-RFLP, SSCP, FISH, clonación y secuenciación de Sanger se han utilizado para estudiar la comunidad microbiana de estos reactores (Fuentes et al., 2018).

La PCR en tiempo real (qPCR) se utiliza en investigaciones de ciencias ambientales debido a su alta sensibilidad, exactitud, precisión y capacidad de alto rendimiento. La qPCR se ha utilizado para la cuantificación de grupos funcionales, lo que permite estudiar su abundancia en la comunidad microbiana en muestras ambientales (Sharma et al., 2007). La técnica de qPCR de el gen funcional de hierro hidrogenasa (*hydA*) se ha utilizado para la cuantificación de microorganismos productores de hidrógeno correspondiente al género *Clostridium* (Perna et al., 2013).

Más recientemente, se ha aplicado la secuenciación masiva para identificar la composición taxonómica de varias muestras de reactores. La secuenciación masiva permite estudiar la comunidad microbiana mediante el uso de uno o unos pocos genes marcadores filogenéticos, siendo un método rentable e independiente del cultivo (Cabezas et al., 2015).

Por otro lado, los métodos que dependen del cultivo permiten el aislamiento y la caracterización de bacterias que pueden ser críticas para el rendimiento del reactor. La principal ventaja de estos métodos es que la capacidad fisiológica de los microorganismos se puede estudiar en cultivo puro. Para los sistemas de producción de H<sub>2</sub>, esto es crucial porque diferentes vías de fermentación tienen diferentes rendimientos de hidrógeno (Castelló et al., 2011). El papel de algunos microorganismos notificados con frecuencia en los reactores de H<sub>2</sub> no está completamente claro, por lo tanto, los aislamientos podrían utilizarse para la producción de H<sub>2</sub> en cultivos puros o consorcios construidos para inocular los reactores productores de H<sub>2</sub>.

### *1.7. Factores que afectan la producción de H<sub>2</sub>*

La producción de H<sub>2</sub> depende de varios factores. Estos están asociados con condiciones ambientales, operacionales y químicas que han sido evaluados por diferentes investigadores con el objetivo de obtener la máxima producción de 4 moles de H<sub>2</sub> por mol de glucosa.

La formación del producto por microflora anaeróbica se ve afectada de manera significativa por las características específicas de las sustancias de alimentación, tipos de reactores, y las condiciones operativas (Prakasham et al., 2010) (Figura 5). Las nuevas técnicas moleculares se han utilizado en determinar las estructuras de la comunidad bacteriana de los reactores productores de H<sub>2</sub> operados en diversas condiciones (Hung et al, 2008; Rittmann, 2008).

## Problemas asociados a la inestabilidad de la producción de H<sub>2</sub>

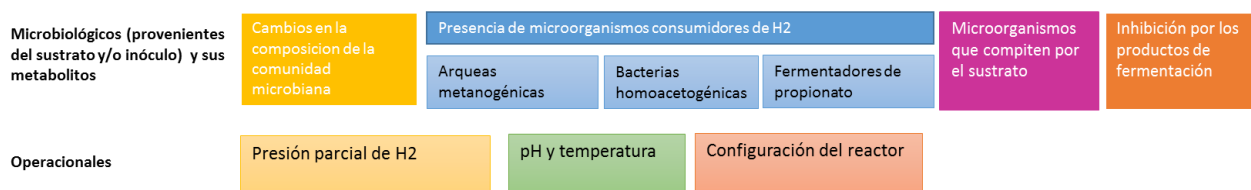


Figura 5. Factores que afectan la producción de H<sub>2</sub>. Adaptada de Castelló et al., 2020

### 1.7.1. pH y temperatura

El pH influye en la actividad de la enzima hidrogenasa así como también sus rutas metabólicas. Por otro lado, cuando los cultivos se alimentan con alta concentración de azúcar, se produce una alta concentración de ácidos que inhibe la producción de H<sub>2</sub>. Esto se debe al aumento de la fuerza iónica en la solución al aumentar la concentración de ácidos disociados, lo que resulta en el cambio de la producción de H<sub>2</sub>. El parámetro clave para mantener la concentración de ácido intracelular es el pH del medio extracelular. Está reportado que la producción máxima de H<sub>2</sub> se da en pH entre 4.5 y 6.0. La forma no disociada de ácido acético o butírico es mayor a pH bajo (pH <4,5), generando una inhibición sobre el crecimiento celular (Ghimire et al., 2015). Por otro lado, pH influye en la producción de propionato siendo mayor a mayor pH (Castelló et al., 2020).

La temperatura afecta las tasas de las vías metabólicas de crecimiento de microorganismos, la tasa de hidrólisis del sustrato y la tasa de producción de H<sub>2</sub>. Los reactores de fermentación pueden ser operados a temperaturas mesófilas (25-40 °C), termófilas (40-65 °C) o hipertermófilas (>80 °C). Se ha demostrado que, dentro de un rango específico de temperatura, el aumento de la temperatura acelera la producción de H<sub>2</sub>. En general, se ha reportado que los microorganismos termófilos son robustos y producen enzimas estables. Es ampliamente aceptado que se puede producir más H<sub>2</sub> en condiciones termófilas que bajo condiciones mesofílicas (Sinha et al., 2011). Sin embargo, las condiciones termófilas requieren mayor gasto energético.

### 1.7.2. Presión parcial de H<sub>2</sub>

La presión parcial de H<sub>2</sub> en la fase líquida es uno de los factores clave que afectan a la producción de H<sub>2</sub>. La hidrogenasa es la enzima clave implicada en la producción de H<sub>2</sub> que, de forma reversible, oxida y reduce ferredoxina. La oxidación de la Fd<sub>red</sub> es menos favorable cuando la concentración de H<sub>2</sub> en fase líquida aumenta y la reducción de Fd<sub>ox</sub> se llevará a cabo. En resumen, el H<sub>2</sub> en fase líquida se oxida al protón reduciendo el rendimiento de H<sub>2</sub> (Bastidas et al., 2012). Mizuno et al. mostraron que el burbujeo de N<sub>2</sub> a la fase líquida disminuye la

concentración de  $H_2$  disuelto y esto produjo un aumento del rendimiento de  $H_2$  en un 68 %. El  $H_2$  disuelto en la fase líquida también se podría reducir mediante el aumento de la velocidad de agitación (Mizuno et al., 2000).

### *1.7.3. Configuración del biorreactor*

Los biorreactores son recipientes donde se lleva a cabo una transformación química pudiendo involucrar microorganismos o sustancias biológicamente activas derivadas de organismos. Provee un ambiente óptimo para el crecimiento celular y la productividad asegurando el control de distintos parámetros tales como temperatura, pH, carga orgánica, etc. (Spier et al., 2011).

El biorreactor ideal debería mantener las células uniformemente distribuidas en el volumen de cultivo, debería mantener constante y homogénea la temperatura; minimizar los gradientes de concentración de nutrientes; maximizar el rendimiento y la producción; minimizar el gasto y los costos de producción y reducir al máximo el tiempo del proceso. En función de los flujos de entrada y salida, existen tres formas distintas de operar el reactor: batch, fed-batch y continuo (Spier et al., 2011).

En el modo batch (también denominado lote) las células se cultivan en un recipiente con una concentración inicial (tanda o lote) de cultivo o fermentación y se deja que se lleve a cabo el proceso la fermentación por el tiempo que sea necesario. El volumen permanece constante y solo las condiciones ambientales del medio (pH, temperatura, velocidad de agitación, etc.) son controladas por el operador (Cinar et al., 2003). La operación en batch se ha utilizado principalmente para evaluar parámetros cinéticos y estequiométricos, diferentes sustratos y, para realizar ensayos de inhibición (Lin et al., 2012; Castelló et al., 2020).

En el modo fed-batch la alimentación se agrega en forma continua o semi-continua sin que haya efluente en el sistema. Se alimenta para que el sistema de cultivo tenga un producto (biomasa) con máximo de crecimiento (exponencial) y aumente la productividad (Dunn, 2003).

El modo continuo (quimiostato) se agrega los nutrientes y se retiran los productos continuamente del sistema. En determinadas condiciones de cultivo se puede lograr un estado estacionario donde no hay variación del volumen del biorreactor en el tiempo. De esta manera se puede lograr condiciones óptimas para producir sustancias y para realizar estudios fisiológicos (Spier et al., 2011). El tiempo en que el líquido que entra en el recipiente y tarda en salir del mismo es lo que se denomina tiempo de retención hidráulico (TRH). La carga orgánica volumétrica (COV) está dada por la concentración de sustrato en la entrada del reactor y por el flujo de entrada. Para optimizar un sistema para la producción de  $H_2$ , el reactor debe ser operado

ya sea en una gama de las velocidades de carga orgánica que el sistema puede manejar con eficacia, o en una velocidad de carga orgánica óptima para un rendimiento máximo de H<sub>2</sub>. El TRH controla la velocidad de crecimiento microbiano, por lo que, el TRH debe ser mayor que la tasa de crecimiento máximo de los microorganismos ya que tasas de dilución más rápidas causan lavado de los microorganismos del reactor. La regulación de la COV y el ajuste del TRH es una estrategia común para operar los reactores de producción de H<sub>2</sub>. Se ha demostrado que en general TRH cortos y cargas orgánicas altas pueden aumentar la tasa de producción de H<sub>2</sub> (Sivagurunathan et al., 2016).

En bibliografía se reportan distintas configuraciones de reactores utilizadas para la producción de H<sub>2</sub> por fermentación anaerobia a partir de aguas residuales. Entre los reactores continuos, hay reactores de biomasa fija y biomasa en suspensión. En los reactores con biomasa en suspensión los microorganismos se asocian formando flóculos que se encuentran suspendidos en el líquido. Por otro lado, en los reactores con biomasa adherida los microorganismos crecen adheridos a un material inerte, ya sea sintético (como materiales plásticos, espumas, cerámicas, entre otros) o natural (principalmente rocas, carbón, basalto, entre otros). En este caso, los microorganismos forman un biofilm (Nava-Urrego et al., 2014).

Se ha observado una mayor diversidad en las comunidades de reactores con retención de biomasa en gránulos en comparación con los reactores con suspensión de biomasa.

Dentro de los en reactores con suspensión biomasa se encuentran los reactores de secuenciación por lotes (SBR) y los reactores continuos como el reactor de tanque agitado (CSTR) (Etchebehere et al., 2016).

El CSTR (fig. 6 A) es reactor de biomasa en suspensión, tipo continuo de los más utilizado en la producción de H<sub>2</sub> debido a su simplicidad en la configuración, fácil funcionamiento, agitación uniforme eficiente y mantenimiento adecuado de la temperatura y el pH (Jung et al., 2011). En estos biorreactores, la población microbiana circula por completo y se suspende con el líquido mezclado en el reactor con la ayuda de un agitador. Como resultado, los microbios están completamente suspendidos en el líquido del reactor y contienen una carga de biomasa equivalente en el efluente. En tales circunstancias se podría obtener la mejor interacción del sustrato de inóculo y la transferencia de masa. Alternativamente, el CSTR es incapaz de mantener una mayor cantidad de microorganismos en fermentación. El lavado de biomasa puede ocurrir a muy bajas TRH, lo que conduce a una menor producción de H<sub>2</sub> (Saratale et al., 2019). Se ha informado que la producción de CH<sub>4</sub> es responsable de la inestabilidad en los CSTR algunas veces en condiciones específicas como la TRH superior a 24 hs y un pH mayor a 6 (Ueno



et al., 2006). La homoacetogénesis también se observó en algunos trabajos utilizando CSTR. Esta vía metabólica es difícil de detectar ya que el acetato es un producto común en la producción de  $H_2$ . En la mayoría de los casos, la homoacetogénesis se estimó a partir de equilibrios molares y, en algunos casos, se determinaron los microorganismos responsables del proceso (Castelló et al., 2018).

También se reporta el efecto perjudicial de bacterias ácido lácticas (LAB) en la producción de  $H_2$  en reactores CSTR. Particularmente, usando suero de queso como sustrato, Palomo-Briones et al. (2017) encontraron una prevalencia de LAB en HRT de 18–24 h.

Dentro de los reactores de biomasa fija se encuentra el reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB, del inglés “Upflow Anaerobic Sludge Blanket”), reactor de lecho de lodo granular expandido (EGSB, “Expanded granular sludge bed reactor”) reactor de lecho de goteo (TBR, en inglés “Trickle-bed reactor”) (Show et al., 2011).

El reactor UASB (fig. 6B) es un reactor del tipo continuo cuya principal característica es la retención de biomasa sin necesidad de un soporte gracias a la formación de gránulos, lo que lo hace más económico y le da ventajas técnicas frente a otros tipos de reactores. Este punto es también su principal limitante ya que la selección y correcta operación del reactor UASB dependerá del grado de sedimentabilidad que logren sus aglomerados celulares, ya sea como gránulos o flóculos densos (Noyola, 1994). El reactor es alimentado por abajo y la descarga del efluente se produce en la parte superior del reactor. Posee un separador gas- líquido- sólido cuya función es separar y descargar el biogás del reactor, evitar el posible lavado de flóculos o gránulos mediante su decantación, prevenir el lavado de lodo granular flotante, y para detener expansiones excesivas del manto de lodo (Noyola, 1994).

Si et al. (2015) estudiaron el efecto de la TRH en la producción de  $H_2$  observando los efectos en la metanogénesis y la homoacetogénesis en un UASB y encontraron que un TRH de 8 h disminuyó la producción de  $CH_4$  y aumentó la producción de  $H_2$ . Estos autores propusieron la persistencia de metanógenos debido a que estos ocupan la parte interna de los gránulos o biofilms evitando su eliminación por tratamientos térmicos o químicos. En cuanto a la homoacetogénesis los autores encontraron que una disminución en la TRH de 24 a 8 h podría suprimirla ya que esto podría mejorar la disponibilidad de  $H_2$  y evitar una mayor conversión (Si et al., 2015).

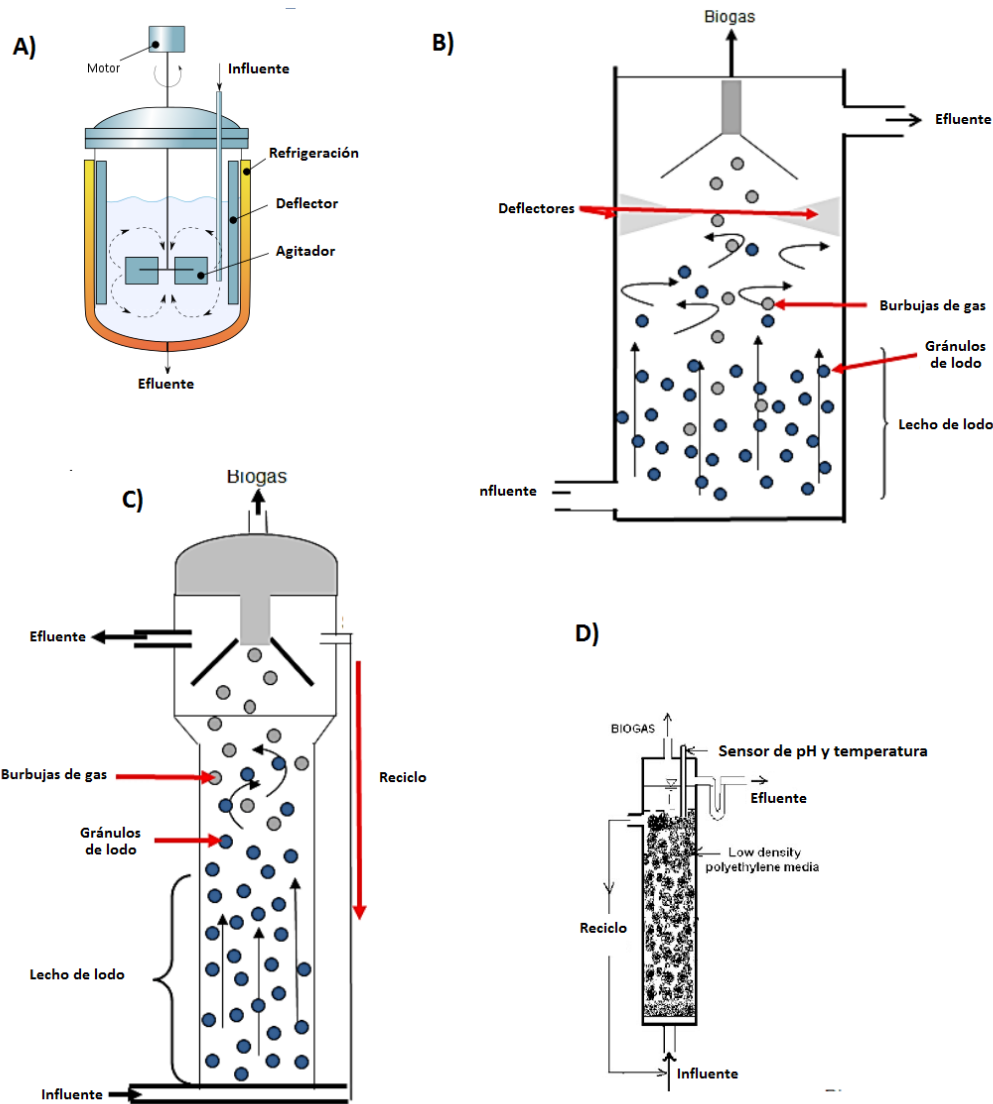


Figura 6. Diseños de tipos de reactores utilizados en la producción de H<sub>2</sub>. A) CSTR (extraído de [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/be/Agitated\\_vessel.svg/513px-Agitated\\_vessel.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/be/Agitated_vessel.svg/513px-Agitated_vessel.svg.png)). B) UASB, C) EGSB (extraído de [https://www.researchgate.net/publication/320922010 Aerobic and Anaerobic Sewage Biodegradable Processes The Gap Analysis/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/320922010_Aerobic_and_An anaerobic_Sewage_Biodegradable_Processes_The_Gap_Analysis/figures?lo=1)) D) FBR (extraído de Ganesh et al., 2010)

El reactor EGSB (fig. 6C) se caracteriza por altas velocidades de flujo ascendente que provocan la expansión de la biomasa granular. El reactor EGSB tiene menos limitaciones de transferencia de masa en comparación con UASB. En este tipo de reactor, la velocidad de flujo ascendente es controlada no solo por el flujo de entrada sino también por la recirculación del efluente. En cuanto a la estabilidad de EGSB, Cisneros-Pérez et al. operó dos reactores EGSB inoculados con biomasa granular tratada térmicamente y lavado celular. El biorreactor con biomasa tratada térmicamente mostró una menor tasa de producción volumétrica de H<sub>2</sub> (VHPR) pero más estabilidad en comparación con el biorreactor inoculado con biomasa seleccionada por lavado

celular. Aun así, las razones de la inestabilidad mostradas con ambas estrategias de inoculación no están claras (Cisneros-Pérez et al., 2015)

Los reactores anaeróbicos de lecho fijo (FBR) (fig. 6D) contienen una matriz de soporte que permite la acumulación de elevadas concentraciones de biomasa que forman películas alrededor de dicha matriz. Los FBR son ventajosos en comparación a los CSTR, principalmente por la alta capacidad de unión de biomasa (Chang et al., 2002). En estos reactores se evita el lavado de biomasa cuando se operan con HRT cortos (menos de 4 h) y además se inhibe el crecimiento de arqueas metanogénicas. Sin embargo, los principales problemas de estabilidad en FBR están relacionados con la limitación en la transferencia de masa líquido-gaseosa y el crecimiento excesivo de microorganismos, ambos problemas relacionados con la tecnología utilizada (Castelló et al., 2020).

La producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura se aplicó tanto en reactores en batch como en sistemas continuos. Los ensayos en batch son los más sencillos de operar y controlar. Esto ha dado lugar a su amplia utilización para determinar el potencial de obtención de H<sub>2</sub> a partir de sustratos orgánicos. Sin embargo, en el contexto industrial los bioprocesos continuos son recomendados para consideraciones prácticas tales como la gestión de residuos, la viabilidad económica, y el diseño práctico de ingeniería (Elsharnouby et al., 2013).

La cantidad de H<sub>2</sub> obtenido por procesos fermentativos se puede cuantificar en términos de rendimiento y tasa. El rendimiento se define como la cantidad de H<sub>2</sub> producido por cantidad de sustrato consumido y se expresa en unidades de mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/ mol de sustrato. La tasa de producción de H<sub>2</sub> se define como la cantidad de H<sub>2</sub> (mL) producido por unidad de tiempo y por unidad de volumen de reactor (tasa volumétrica, TPH) o por unidad de biomasa (tasa específica, TPEH) (Blanco et al., 2012).

Los reactores han generado producciones de H<sub>2</sub> muy variables que no son comparables en la mayoría de los casos dado que la cantidad de H<sub>2</sub> se ha cuantificado en términos de rendimiento, TPH, TPEH y en términos de biomasa no son unidades homologas entre sí. En aquellos estudios donde se realizó un análisis de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) se generaron ácidos grasos como acético, butírico y propiónico. Cuando se produce acético indica que se favoreció la ruta de producción donde se genera como subproducto acetato principalmente, siendo esta la ruta que produce más H<sub>2</sub> fermentativo. La producción de los otros ácidos no es tan favorable para la generación de H<sub>2</sub>, por tanto, su presencia es un indicativo de que el proceso no ha sido completamente controlado (Blanco et al., 2012).

#### 1.7.4. Inóculo

La selección de un inóculo para la puesta en funcionamiento de un reactor para la producción de H<sub>2</sub> es uno de los principales factores a tener en cuenta, dado que los microorganismos presentes en éste serán los principales responsables de la cadena trófica que se desarrollará en el reactor. En la literatura se pueden encontrar trabajos en los que se utilizan diferentes tipos de inóculos que se pueden dividir en 3 grandes grupos: cultivos mixtos (enriquecidos o no enriquecidos en bacterias productoras de H<sub>2</sub>), consorcios definidos y cultivos puros. En los cultivos puros los cambios metabólicos son más fáciles de detectar debido a la reducción de la diversidad de la biomasa. Los estudios en cultivos puros pueden revelar información importante acerca de las condiciones que promueven la alta producción de H<sub>2</sub>. Para cultivos puros se han utilizado mayoritariamente especies del género *Clostridium* y *Enterobacter* (Prasertsan et al., 2009).

Actualmente se han empleado inóculos de cultivos mixtos de bacterias de lodos anaerobios, lodos de plantas de tratamiento, compost y suelo. Los cultivos mixtos son potencialmente más resistentes y robustos a cambios en las condiciones ambientales en relación con los cultivos puros. Sin embargo, en estas condiciones el H<sub>2</sub> puede ser consumido por bacterias tales como las homoacetogénicas, metanogénicas, bacterias reductoras de nitratos y sulfatos. Además puede haber microorganismos competidores del sustrato (Bundhoo and Mohee, 2016).

Por esta razón, para proteger las bacterias productoras de H<sub>2</sub>, el inóculo es pretratado empleando métodos tales como: choque térmico, acidificación, alcalinidad, congelación y descongelación, aireación y adición de cloroformo, los cuales inactivan la actividad bacteriana de las bacterias consumidoras de H<sub>2</sub> para impedir que estas proliferen (Wang et al., 2008).

El tratamiento térmico del inóculo es una estrategia comúnmente utilizada para aumentar la producción de H<sub>2</sub> (Vázquez et al., 2009). Los microorganismos *Clostridium* son capaces de formar esporas en condiciones extremas de temperatura, pH y radiación, mientras que se eliminan muchos microorganismos competidores no esporulados. La desventaja es que los microorganismos productores de H<sub>2</sub> no esporulados también pueden eliminarse (Bundhoo y Mohee, 2016). Además, el tratamiento previo de choque térmico no siempre es adecuado ya que puede destruir otras bacterias no formadoras de esporas, lo que resulta en una reducción de la capacidad del sistema para consumir oxígeno. Esta incapacidad para consumir el oxígeno disminuye la producción de H<sub>2</sub> (Zhu y Béland 2006).

Además, hay bacterias que consumen  $H_2$ , que forman esporas y sobreviven a los pretratamientos del inóculo. Entre ellos, se incluyen algunos consumidores de  $H_2$  algunas especies de *Clostridium*, *Sporomusa*, *Sporolactobacillus*, reductores de sulfato como *Desulfotomaculum* (Dinamarca et al., 2011).

El co-metabolismo dentro de la comunidad microbiana desempeña un papel vital en la producción de  $H_2$  en reactores ya que las interacciones de la población podrían tener efectos positivos o negativos sobre la producción neta de  $H_2$ .

#### 1.7.4.1. Efectos de sinergia en cocultivos.

El empleo de cocultivos, en lugar de monocultivos, puede ayudar a mantener las condiciones anaeróbicas estrictas para los productores de  $H_2$ . Los cocultivos pueden también mejorar la hidrólisis de los azúcares complejos, la biomasa, y permite operar en una gama más amplia de pH para las bacterias fermentadoras  $H_2$ . En la bibliografía se encontró que existen principalmente tres tipos diferentes de cocultivo al inocular microorganismos de cultivos puros (Elsharnouby et al., 2013).

##### 1.7.4.1.1 Cocultivo de microorganismos anaerobios estrictos y facultativos

Los microorganismos anaerobios estrictos al ser extremadamente sensibles al  $O_2$ , se inhibe su capacidad de producir de  $H_2$  cuando están en contacto con el aire. Para estabilizar su producción se puede adicionar un agente reductor tal como L-cisteína. Este agente reductor se puede sustituir por anaerobios facultativos capaces de consumir  $O_2$  en un medio alcanzando así las condiciones anaeróbicas necesarias. Yokoi et al. (1998) cocultivaron, un microorganismo anaerobio estricto, *Clostridium* sp., y un microorganismo anaerobio facultativo, *Enterobacter* sp., y los resultados obtenidos indican que el empleo de cocultivos es más económico mediante la eliminación del agente reductor caro, y asimismo mejora la producción de  $H_2$  (Yokoi et al., 1998; Elsharnouby et al., 2013).

##### 1.7.4.1.2 Cocultivo de microorganismos anaerobios degradadores de sustrato complejos y microorganismos productores de $H_2$

El procedimiento de fermentación oscura más común empleada para generar  $H_2$  a partir de sustratos complejos, como la celulosa, implica realizar procesos caros de pretratamiento, tales como la deslignificación, y la hidrólisis. Liu et al. (2008) realizaron un cocultivo de una bacteria anaerobia termofílica, *Clostridium thermocellum*, JN4 con *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17 para la producción de  $H_2$  empleando celulosa como sustrato. El C.

*thermocellum* JN4 puede descomponer la celulosa, pero no puede utilizar completamente los productos generados de esta reacción como la celobiosa y la glucosa, mientras que el *T. thermosaccharolyticum* GD17 puede utilizar esos monoazúcares. Se observó en un reactor en condiciones termófilas que cuando *C. thermocellum* JN4 se cocultivó con *T. thermosaccharolyticum* GD17, la producción de H<sub>2</sub> se duplicó, en comparación con un cultivo de *C. thermocellum* JN4 puro, y el rendimiento de H<sub>2</sub> aumentó de 0,8, en cultivo puro, a 1,8 moles H<sub>2</sub>/mol glucosa, en cocultivo (Liu et al., 2008).

#### 1.7.4.1.3 *Microorganismos acidotolerantes productores de H<sub>2</sub> y bacterias productoras de H<sub>2</sub>*

Debido al impacto inhibitorio de ácidos orgánicos producidos durante la fermentación en los productores de H<sub>2</sub>, las condiciones neutras o ácidas débiles son necesarias para alcanzar altos rendimientos de H<sub>2</sub>. Sin embargo, el control del pH es antieconómico debido a la gran cantidad de productos químicos necesarios. Los microorganismos acidotolerantes pueden producir H<sub>2</sub> a pH bajos, por lo tanto, reduce o incluso elimina los requisitos de tamponamiento. Por lo tanto, el uso de una bacteria productora de H<sub>2</sub> cocultivadas con microorganismos acidotolerantes puede lograr una producción de H<sub>2</sub> estable y alta a pHs bajos (Lu et al., 2007).

El papel de los microorganismos tales como *Enterobacter aerogene*, *Klebsiella sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas sp.* y *Burkholderia cepacia* promueven producción de H<sub>2</sub> mediante el mantenimiento de un ambiente anaerobio estricto y por ruptura de sustratos complejos. Por lo tanto, la eficiencia de la producción de H<sub>2</sub> depende tanto de bacterias productoras de H<sub>2</sub> como de otras poblaciones (Elsharnouby et al., 2013).

#### 1.7.4.1.4 *Sinergia entre bacterias electroactivas y fermentadoras*

Se ha reportado la cooperación entre bacterias electroactivas (*Geobacter*) y bacterias fermentadoras (*Clostridium*). En este caso los microorganismos acoplan sus flujos de electrones mediante transferencia de electrones interespecies (IET) para llevar a cabo las reacciones que serían termodinámicamente desfavorables (Moscoviz et al., 2017).

En la publicación de Moscoviz y col. (2017) se realizó la fermentación de glicerol con un cocultivo de *Geobacter sulfurreducens* y *Clostridium pasteurianum*. Como resultado, se demostró que *Geobacter sulfurreducens* podía crecer usando *Clostridium pasteurianum* como único aceptor de electrones. *G. sulfurreducens* es un microorganismo electroactivo con capacidades metabólicas muy limitadas. Entre los metabolitos encontrados en la fermentación *G. sulfurreducens* utiliza el acetato como donante de electrones. Además, los aceptores de electrones conocidos que pueden ser utilizados por *G. sulfurreducens* también es limitado

consistiendo en algunos iones metálicos, azufre elemental, malato y fumarato o un electrodo. Sin embargo, al crecer junto con *C. pasteurianum*, *G. sulfurreducens* puede utilizarlo como aceptor de electrones a través de mecanismos de transferencias de electrones interespecie. Un comportamiento similar se informó previamente en un cocultivo de *Desulfovibrio vulgaris* y *Clostridium acetobutylicum* en el que *D. vulgaris* pudo crecer en presencia de *C. acetobutylicum* y sin aceptor de electrones externo. Consistentemente, el patrón metabólico de *C. acetobutylicum* se modificó hacia una mayor disipación de electrones a través de la producción de H<sub>2</sub> (Moscoviz et al., 2017).

#### 1.7.5. Sustratos utilizados para la producción de H<sub>2</sub>

Los sustratos más empleados para la producción de H<sub>2</sub> han sido la glucosa, sacarosa y el almidón. También se han empleado residuos orgánicos aunque pueden presentar estructuras moleculares complejas difíciles de asimilar por los microorganismos pudiendo requerir un tratamiento previo (Hawkes et al., 2002).

Sin embargo, para que esto sea un proceso sustentable ambientalmente y darle un valor real a la sociedad, el H<sub>2</sub> debería producirse a partir de materias primas renovables (residuos reales). Estas pueden ser biomasa, productos biológicos de residuos agrícolas, productos lignocelulósicos (madera y residuos de madera), residuos de procesamiento de alimentos, plantas acuáticas, algas, agrícolas y excrementos animales (Elsharnouby et al., 2013).

Los rendimientos reportados de H<sub>2</sub> a partir de biomasa utilizados como sustratos varían mucho de aproximadamente 20 % a más del 90 % de los 4 moles teóricos de H<sub>2</sub> por mol de hexosa. La diversidad de los materiales y los métodos de pretratamiento difícilmente permite una comparación de la eficiencia de la producción de H<sub>2</sub> (Elsharnouby et al., 2013).

Los cultivos que contienen azúcar (por ejemplo, el sorgo dulce y remolacha azucarera), cultivos de maíz y trigo, lignocelulósicos (por ejemplo, la hierba de forraje) a base de almidón, y subproductos de la industria alimentaria son todos los tipos de biomasa utilizados como sustratos que se reporta en la literatura. Sin embargo, la reacción del público es cada vez más negativa al uso de alimentos para producir biocombustibles (Elsharnouby et al., 2013).

Los subproductos industriales son considerados prometedores enfoques para la producción de H<sub>2</sub> sostenible pero los rendimientos informados de la utilización de estas aguas residuales siguen siendo bajos en comparación con los materiales de alimentación tradicionales sostenibles. Se requiere investigación adicional en la utilización de estos sustratos a través de la fermentación oscura, y en los métodos de tratamientos previos adecuados (Balachandar et al., 2013).

#### 1.7.5.1. *Agregado de nutrientes*

Para el crecimiento celular y para la producción de H<sub>2</sub> en los procesos fermentativos se requiere de nitrógeno, fosfatos y algunos iones metálicos. El nitrógeno forma parte de los ácidos nucleicos, proteínas y enzimas. Los fosfatos presentan valor nutricional y capacidad de tamponamiento siendo también necesarios para la producción de H<sub>2</sub> (Balachandar et al., 2013).

Los iones de magnesio, sodio, zinc y hierro son importantes para la producción de H<sub>2</sub> siendo necesarios para los cofactores enzimáticos, procesos de transporte y las enzimas deshidrogenasas. Por otro lado, los metales pesados como el Cu, Ni-Zn, Cr, Cd, Pb han sido reportados como tóxicos para la producción de H<sub>2</sub> (Balachandar et al., 2013).

El hierro es también un elemento esencial que forma Fd y se requiere para la hidrogenasa. Zhang y Shen (2006) sugirieron que cuando la temperatura ambiente es relativamente baja, las bacterias necesitan más iones ferrosos para activar la hidrogenasa de modo que podría oxidar Fd<sub>red</sub> para producir más H<sub>2</sub> molecular.

#### 1.7.5.2. *Utilización de residuos y aguas residuales para la producción de H<sub>2</sub>*

Los efluentes industriales representan productos residuales que generan grandes problemas ambientales. Es importante conocer el origen del vertido (industrial, doméstico, comercial, etc.) para determinar la cantidad de contaminantes e incidencia en el medio. Las aguas residuales pueden contener contaminantes como: grasas, aceites, metales pesados, residuos de materia fecal entre otros (Chong et al., 2009). Para evaluar la calidad del agua se consideran tres parámetros: demanda bioquímica de oxígeno (DBO), demanda química de oxígeno (DQO) y sólidos suspendidos totales (SST). La DBO y la DQO se utilizan para determinar la cantidad de materia orgánica presente en el efluente. La DBO determina la cantidad de materia orgánica biodegradable, la DQO mide la cantidad total de materia orgánica. Los SST hacen referencia al material sólido que se mantiene en suspensión en el efluente (Heponiemi y Lassi, 2012). En la tabla 4 se indican algunos efluentes industriales estudiados en la producción de hidrógeno.

La producción de H<sub>2</sub> a partir de residuos industriales es muy ventajosa ya que permite valorizar estos subproductos. En Uruguay existe una gran variedad de sustratos aún no estudiados. Como la producción de H<sub>2</sub> depende de la composición química del sustrato es importante investigar el potencial de estos sustratos y las limitaciones de éstos.



Tabla 4. Producción de H<sub>2</sub> obtenida en distintos efluentes industriales (datos extraídos de Castelló et al., 2020; Lin et al., 2012; y Show et al., 2011).

Tipo de residuo	Microorganismo	Modo de operación	Máximo rendimiento de H <sub>2</sub>
Aguas residuales de la bodega de arroz	cultivo mixto	continuo	2.14 mol/mol hexosa
Desechos alimentarios	cultivo mixto termofílico	batch	1.8 mol/mol hexosa
Lodos de depuradora de residuos alime	cultivo mixto mesofílico	batch	122.9 ml/g COD carbohidrato
Aguas residuales de lácteos	cultivo mixto mesofílico	continuo	-
Melaza	cultivo mixto mesofílico	continuo	-
Suero de queso	cultivo mixto mesofílico	batch	5.9 mol/mol lactosa
Aguas residuales de lácteos	cultivo mixto mesofílico	batch	17.2 mmol/g COD
Pulpa de aceituna	cultivo mixto mesofílico	continuo	0.19 mol/kg sólidos totales
Aguas residuales de aceite de oliva	cultivo mixto mesofílico	continuo	196.2 ml/g hexosa
Fabricación de bebidas de café	cultivo mixto termofílico	continuo	2.57 mol H <sub>2</sub> /mol hexosa
Aguas residuales de la fábrica de azúcar	cultivo mixto mesofílico	continuo	-
Aguas residuales de almidón	cultivo mixto mesofílico	batch en secuencia	5.79±0.41 mmol H <sub>2</sub> /gCOD agregado
Aguas residuales textiles	cultivo mixto mesofílico	Reactor de tanque agitado de flujo intermitente	0.97 mol H <sub>2</sub> /mol hexosa
Residuos de alimentos hidrolizados enz	cultivo mixto mesofílico	Reactor de lodo inmovilizado mixto continuo	-
Vinaza de caña de azúcar cruda	cultivo mixto mesofílico	continuo	3.3 mol/mol sustrato
Glicerol	cuto mixto termofílico	batch	6.03 mmol/g COD

#### 1.7.5.2.1 Residuos urbanos e industriales

Estos contienen altos niveles de carbohidratos y proteínas. En la actualidad, los desechos de alimentos de la industria se tratan en su mayoría en condiciones anaerobias. Por estar constituido principalmente por carbohidratos podría ser un sustrato potencial para la producción de H<sub>2</sub> anaeróbico (Chong et al., 2009; Kim et al., 2004).

#### 1.7.5.2.2 Materiales lignocelulósicos

Estos se componen de celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos son productos de la fotosíntesis y componentes estructurales de la pared celular vegetal. Sin embargo, la limitación es el proceso de pretratamiento requerido para degradar la celulosa en azúcares simples. La utilización de bacterias celulolíticas sería una forma alternativa de degradar la celulosa (Urbaniek y Bakker, 2015). En un estudio se reportó una cepa de *Clostridium* sp. aislado de termitas que produjo con éxito H<sub>2</sub> a partir de xilano de avena con un rendimiento de 18,6 mmol por gramo de sustrato. Posteriormente utilizaron celulosa hidrolizada para la producción de H<sub>2</sub> utilizando la misma bacteria. Durante 81 h de cultivo estacionario, la bacteria consumió 0,92 mmol de glucosa/h y produjo 4,1 mmol de H<sub>2</sub>/h (de Taguchi et al., 1996).

#### 1.7.5.2.3 Glicerol

El glicerol es un residuo generado de la producción de biodiesel. Con cada 50 Kg libras de biodiesel producidos por transesterificación de aceites vegetales o grasas animales se generan 5 Kg de glicerol en bruto. El glicerol se aplica actualmente como un ingrediente de los cosméticos, pero un mayor aumento en la producción de combustibles biodiesel plantearía el

problema de tratar de manera eficiente los residuos que contiene glicerol a partir de esta industria (Sakai et al., 2007).

#### *1.7.5.2.4 Residuos de la industria láctea*

El suero de queso es un ejemplo y contiene alrededor de 5 % de lactosa, que puede ser un sustrato para los propósitos de fermentación. Para la producción de 1 kg de queso se necesitan 10 kg de leche, originándose 9 kg de suero de queso (Prazerers et al., 2012). A nivel mundial, la producción mundial de suero de leche supera los 160 millones de toneladas por año con una tasa de crecimiento anual del 1 al 2 % (Okamoto et al., 2019). La Unión Europea aporta el 31 % de la producción, siguiendo de Estados Unidos con casi 83 millones de toneladas, constituyendo el 19 % del total. En Asia se destaca China con un incremento del 19 % en producción, teniendo una participación creciente en el mundo junto con India. Brasil es el mayor productor en América del Sur con casi 25 millones de toneladas (Chong et al., 2009; Prazeres et al., 2012).

A pesar del valor nutritivo del suero de queso, el 47 % de lactosuero es descargado al drenaje llegando a ríos y suelos, causando problemas serios de contaminación. La descarga continua de este efluente a los ecosistemas altera sus propiedades fisicoquímicas. En los suelos, se disminuye el rendimiento de las cosechas y además provoca lixiviación. Esto se debe a que el lactosuero presenta nitrógeno soluble en agua, el cual es arrastrado a través de diversas capas llegando hasta los mantos freáticos y convirtiéndose en un peligro para la salud de los animales y humanos. Por estas razones este efluente debe ser tratado (Saddoud et al., 2007).

## *2. Objetivos de este capítulo*

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos para cumplir los siguientes objetivos:

1. Aislar y caracterizarlas bacterias productoras de H<sub>2</sub> y competidoras de importancia en reactores hidrogenogénicos.
2. Determinar el máximo rendimiento en H<sub>2</sub> que pueden obtener las bacterias productoras de H<sub>2</sub>.
3. Determinar el efecto de sinergia y de competencia con otros microorganismos aislados del reactor.
4. Conocer la relevancia de la homoacetogénesis como causante del bajo rendimiento y la inestabilidad en la producción de H<sub>2</sub>.

## REFERENCIAS

- Adams, M. W., & Mortenson, L. E. (1984). The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. A comparison with hydrogenase I. *Journal of Biological Chemistry*, 259(11), 7045-7055.
- Alalayah, W. M., Kalil, M. S., Kadhum, A. A., Jahim, J. M., & Alauj, N. M. (2009). Effect of environmental parameters on hydrogen production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *American Journal of Environmental Sciences*, 5(1), 80.
- Alshiyab, H., Kalil, M. S., Hamid, A. A., & Wan, W. Y. (2008). Effect of salts addition on hydrogen production by *C. acetobutylicum*. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 11(18), 2193-2200.
- Balachandar, G., Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen production from organic wastes by dark fermentation. In *Biohydrogen* (pp. 103-144). Elsevier.
- Bastidas-Oyanedel, J. R., Mohd-Zaki, Z., Zeng, R. J., Bernet, N., Pratt, S., Steyer, J. P., & Batstone, D. J. (2012). Gas controlled hydrogen fermentation. *Bioresource technology*, 110, 503-509.
- Benemann JR (1996). Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nature Biotechnology*, 14:1101–1103.
- Blanco Londoño, S. A., & Rodríguez Chaparro, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 20(3), 398-411.
- Boga, H. I., Ludwig, W., & Brune, A. (2003). *Sporomusa aerivorans* sp. nov., an oxygen-reducing homoacetogenic bacterium from the gut of a soil-feeding termite. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), 1397-1404.
- Bruno, M. E., & Montville, T. J. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 3003-3010.
- Bundhoo, M. Z., Mohee, R., & Hassan, M. A. (2015). Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: a review. *Journal of environmental management*, 157, 20-48.
- Bundhoo, M. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16), 6713-6733.
- Cabezas, A., de Araujo, J. C., Callejas, C., Galès, A., Hamelin, J., Marone, A., ... & Etchebehere, C. (2015). How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(4), 555-593.

- 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.
- Cai, Y. (1999). Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2466-2471.
- Cammack, R. (1999). Hydrogenase sophistication. *Nature*, 397(6716), 214-215.
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L. B., Alatraste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2012). Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(7), 5591-5601.
- 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. *Int J Hydrogen Energy* 34: 5674–5682.
- Castelló, E., Perna, V., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2011). Microbial community composition and reactor performance during hydrogen production in a UASB reactor fed with raw cheese whey inoculated with compost. *Water Science and Technology*, 64(11), 2265-2273.
- Castelló, E., Braga, L., Fuentes, L., & Etchebehere, C. (2018). Possible causes for the instability in the H<sub>2</sub> production from cheese whey in a CSTR. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(5), 2654-2665.
- Castelló, E., Ferraz-Junior, A. D. N., Andreani, C., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., ... & Palomo-Briones, R. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109602.
- Chaganti, S. R., Lalman, J. A., & Heath, D. D. (2012). 16S rRNA gene based analysis of the microbial diversity and hydrogen production in three mixed anaerobic cultures. *International journal of hydrogen energy*, 37(11), 9002-9017.
- Chandrasekhar, N., & Sholl, D. S. (2015). Large-scale computational screening of binary intermetallics for membrane-based hydrogen separation. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(47), 26319-26326.
- Chang, J. S., Lee, K. S., & Lin, P. J. (2002). Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1167-1174.
- Chang, Y. H., Jung, M. Y., Park, I. S., & Oh, H. M. (2008). *Sporolactobacillus vineae* sp. nov., a spore-forming lactic acid bacterium isolated from vineyard soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(10), 2316-2320.
- Cheng, X. Y., & Liu, C. Z. (2011). Hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk by *Clostridium thermocellum*. *Energy & Fuels*, 25(4), 1714-1720.

Chong, M. L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2009). Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International journal of hydrogen energy*, 34(8), 3277-3287.

Chong M, Rahim RA, Shirai Y, Hassan MA. Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *Int J Hydrog Energy* 2009;34:764e71

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

Cinar, A; Birol, G; Parulekar, SJ, Undey, C. *Batch Fermentation: Modeling Monitoring and Control*, CRC Press, 2003, 648 p.

Ciranna, A., Ferrari, R., Santala, V., & Karp, M. (2014). Inhibitory effects of substrate and soluble end products on biohydrogen production of the alkalithermophile *Caloramator celer*: kinetic, metabolic and transcription analyses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(12), 6391-6401.

Cobos, M. A., de Coss, A. L., Ramirez, N. D., Gonzalez, S. S., & Cerrato, R. F. (2011). *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Research in veterinary science*, 90(1), 26-30.

Collet, C., Adler, N., Schwitzguébel, J. P., & Péringer, P. (2004). Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(14), 1479-1485.

Dalsgaard, T., & Bak, F. (1994). Nitrate reduction in a sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio desulfuricans*, isolated from rice paddy soil: sulfide inhibition, kinetics, and regulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 291-297.

De Vrije, T., Budde, M. A., Lips, S. J., Bakker, R. R., Mars, A. E., & Claassen, P. A. (2010). Hydrogen production from carrot pulp by the extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *International journal of hydrogen energy*, 35(24), 13206-13213.

Dhar, B. R., Elbeshbishy, E., & Nakhla, G. (2012). Influence of iron on sulfide inhibition in dark biohydrogen fermentation. *Bioresource technology*, 126, 123-130.

Diekert, G., & Wohlfarth, G. (1994). Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66(1-3), 209-221.

Dincer, I., & Acar, C. (2015). Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *International journal of hydrogen energy*, 40(34), 11094-11111.

Dinamarca, C., & Bakke, R. (2011). Process parameters affecting the sustainability of fermentative hydrogen production: A short review.

Dunn, J. Biological reaction engineering: Dynamic modelling fundamentals with simulation examples. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2003, 508 p.

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

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

Fabiano, B., & Perego, P. (2002). Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(2), 149-156.

Fast, A. G., Schmidt, E. D., Jones, S. W., & Tracy, B. P. (2015). Acetogenic mixotrophy: novel options for yield improvement in biofuels and biochemicals production. *Current opinion in biotechnology*, 33, 60-72.

Fuentes, L., Braga, L., Castelló, E., & Etchebehere, C. (2018). Work scheme to isolate the different microorganisms found in hydrogen-producing reactors: a study of effectiveness by pyrosequencing analysis. *Journal of applied microbiology*, 125(1), 96-110.

Ganesh, R., Rajinikanth, R., Thanikal, J. V., Ramanujam, R. A., & Torrijos, M. (2010). Anaerobic treatment of winery wastewater in fixed bed reactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33(5), 619-628.

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

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

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

Graetz, J., Wolstenholme, D., Pez, G., Klebanoff, L., McGrady, S., & Cooper, A. (2013). Development of off-board reversible hydrogen storage materials. *Hydrogen Storage Technologies/Materials and Applications*.

Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., & Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International journal of hydrogen energy*, 27(11-12), 1339-1347.

He, Y., Li, M., Perumal, V., Feng, X., Fang, J., Xie, J., ... & Wang, F. (2016). Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments. *Nature microbiology*, 1(6), 1-9.

- Heponiemi, A., & Lassi, U. (2012). Advanced oxidation processes in food industry wastewater treatment—A review. *Food Industrial Processes-Methods and Equipment*, (B. Valdez Ed.), InTech. <http://www.intechopen.com/books/food-industrial-processes-methods-and-equipment/advanced-oxidationprocesses-in-food-industry-wastewater-treatment-a-review>, consultado.
- Himmi, E. H., Bories, A., Boussaid, A., & Hassani, L. (2000). Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(4), 435-440.
- Hung, C. H., Cheng, C. H., Cheng, L. H., Liang, C. M., & Lin, C. Y. (2008). Application of Clostridium-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1586-1592.
- 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.
- Iyer, R., Tomar, S. K., Maheswari, T. U., & Singh, R. (2010). *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20(3), 133-141.
- Ivanova, G., Rákhely, G., & Kovács, K. L. (2009). Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(9), 3659-3670.
- Jayasinghearachchi, H. S., Sarma, P. M., & Lal, B. (2012). Biological hydrogen production by extremely thermophilic novel bacterium *Thermoanaerobacter mathranii* A3N isolated from oil producing well. *international journal of hydrogen energy*, 37(7), 5569-5578.
- Jo, J. H., Jeon, C. O., Lee, D. S., & Park, J. M. (2007). Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *Journal of biotechnology*, 131(3), 300-308.
- Jung, K. W., Kim, D. H., Kim, S. H., & Shin, H. S. (2011). Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production. *Bioresource technology*, 102(18), 8612-8620.
- Kim, S. H., Han, S. K., & Shin, H. S. (2006). Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry*, 41(1), 199-207.
- Kim, S. H., Han, S. K., & Shin, H. S. (2004). Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(15), 1607-1616.

- Kotay, S. M., & Das, D. (2008). Biohydrogen as a renewable energy resource—prospects and potentials. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1), 258-263.
- Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem* 2000;35:589e93.
- Latifi, A., Avilan, L., & Brugna, M. (2019). Clostridial whole cell and enzyme systems for hydrogen production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(2), 567-575.
- Leaphart, A. B., & Lovell, C. R. (2001). Recovery and analysis of formyltetrahydrofolate synthetase gene sequences from natural populations of acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(3), 1392-1395.
- Lee, D. J., Show, K. Y., & Su, A. (2011). Dark fermentation on biohydrogen production: pure culture. *Bioresource technology*, 102(18), 8393-8402.
- Levin DB, Pitt L, Love M. (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy* 2004;29:173e85. [http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6).
- Lin, P. Y., Whang, L. M., Wu, Y. R., Ren, W. J., Hsiao, C. J., Li, S. L., & Chang, J. S. (2007). Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(12), 1728-1735.
- 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(20), 15632-15642.
- 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.
- Liu, S. N., Han, Y., & Zhou, Z. J. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44(3), 643-651.
- Lu, W., Wen, J., Chen, Y., Sun, B., Jia, X., Liu, M., & Caiyin, Q. (2007). Synergistic effect of *Candida maltosa* HY-35 and *Enterobacter aerogenes* W-23 on hydrogen production. *International journal of hydrogen energy*, 32(8), 1059-1066.
- McIlroy, S. J., Kirkegaard, R. H., Dueholm, M. S., Fernando, E., Karst, S. M., Albertsen, M., & Nielsen, P. H. (2017). Culture-independent analyses reveal novel anaerolineaceae as abundant primary fermenters in anaerobic digesters treating waste activated sludge. *Frontiers in microbiology*, 8, 1134
- Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., & Noike, T. (2000). Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. *Bioresource technology*, 73(1), 59-65.



Moscoviz, R., De Fouchécour, F., Santa-Catalina, G., Bernet, N., & Trabaly, E. (2017). Cooperative growth of *Geobacter sulfurreducens* and *Clostridium pasteurianum* with subsequent metabolic shift in glycerol fermentation. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.

Nava Urrego, L. M., Gasperín Sánchez, R., & Durán Moreno, A. (2014). Comparación de un reactor de biomasa suspendida y un reactor de biomasa adherida para la biodegradación de compuestos tóxicos presentes en aguas residuales de refinerías de petróleo. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30(1), 101-112.

Noyola, A., & Moreno, G. (1994). Granule production from raw waste activated sludge. *Water Science and Technology*, 30(12), 339.

Okamoto, K., Nakagawa, S., Kanawaku, R., & Kawamura, S. (2019). Ethanol production from cheese whey and expired milk by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*. *Fermentation*, 5(2), 49.

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

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

Parameswaran, P., Torres, C. I., Lee, H. S., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2011). Hydrogen consumption in microbial electrochemical systems (MXCs): the role of homo-acetogenic bacteria. *Bioresource technology*, 102(1), 263-271.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Fontes Lima, D., Borzacconi, L., Varesche, B., Zaiat, M., Etchebere, C. (2013) Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *International Journal of Hydrogen Energy* Volume 38, Issue 1, 11 January 2013, Pages 54-62.

Prakasham, R. S., Sathish, T., & Brahmaiah, P. (2010). Biohydrogen production process optimization using anaerobic mixed consortia: a prelude study for use of agro-industrial material hydrolysate as substrate. *Bioresource technology*, 101(14), 5708-5711.

Prasertsan, P., O-Thong, S., and Birkeland, N. K. (2009). "Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process." *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 34, No. 17, pp. 7448-7459.

Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.

- Prins, R. A. (1971). Isolation, culture, and fermentation characteristics of *Selenomonas ruminantium* var. *bryanti* var. n. from the rumen of sheep. *Journal of bacteriology*, 105(3), 820-825.
- Ramírez-Morales, J. E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Science and Technology*, 71(9), 1271-1285)
- Ren, N., Cao, G., Wang, A., Lee, D. J., Guo, W., & Zhu, Y. (2008). Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6124-6132.
- Rittmann, B. E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and bioengineering*, 100(2), 203-212.
- Saad, N. M. C. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(30), 13172-13191.
- Saddoud, A., Hassaïri, I., & Sayadi, S. (2007). Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresource technology*, 98(11), 2102-2108.
- Sakai, S., & Yagishita, T. (2007). Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol-containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine. *Biotechnology and bioengineering*, 98(2), 340-348.
- Saratale, G. D., Saratale, R. G., Banu, J. R., & Chang, J. S. (2019). Biohydrogen production from renewable biomass resources. In *Biohydrogen* (pp. 247-277). Elsevier.
- Schiel-Bengelsdorf, B., & Dürre, P. (2012). Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS letters*, 586(15), 2191-2198.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61(2), 262-280.
- SCHLEIFER, K. H., LEUTERITZ, M., WEISS, N., LUDWIG, W., KIRCHHOF, G., & SEIDEL-RÜFER, H. E. L. G. A. (1990). Taxonomic study of anaerobic, Gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactificex* sp. nov., *Zymophilus raffinosivorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(1), 19-27.
- Seppälä, J. J., Puhakka, J. A., Yli-Harja, O., Karp, M. T., & Santala, V. (2011). Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and co-cultures. *international journal of hydrogen energy*, 36(17), 10701-10708.

Shida, G. M., Sader, L. T., de Amorim, E. L. C., Sakamoto, I. K., Maintinguer, S. I., Saavedra, N. K., ... & Silva, E. L. (2012). Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: effects of organic loading rate and alkalinity. *International journal of hydrogen energy*, 37(22), 16925-16934.

Show, K. Y., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource technology*, 102(18), 8524-8533.

Singh, S., Jain, S., Venkateswaran, P. S., Tiwari, A. K., Nouni, M. R., Pandey, J. K., & Goel, S. (2015). Hydrogen: A sustainable fuel for future of the transport sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 623-633.

Sinha P, Pandey A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *Int J Hydrog Energy* 2011;36:7460e78

Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S. H., Kobayashi, T., Xu, K. Q., ... & Bélafi-Bakó, K. (2016). A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *international journal of hydrogen energy*, 41(6), 3820-3836.

Spier, M. R., Vandenberghe, L. P. S., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2011). Application of different types of bioreactors in bioprocesses. *Bioreactors: design, properties and applications*. Nova Science Publishers Inc: New York, 55-90.

Taguchi, F., Yamada, K., Hasegawa, K., Taki-Saito, T., & Hara, K. (1996). Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. strain no. 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(1), 80-83.

Tanisho, S., Kuromoto, M., & Kadokura, N. (1998). Effect of CO<sub>2</sub> removal on hydrogen production by fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23(7), 559-563.

Teo, A. Y. L., & Tan, H. M. (2005). Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4185-4190.

Ueki, A., Watanabe, M., Ohtaki, Y., Kaku, N., & Ueki, K. (2014). Description of *Propionispira arcuata* sp. nov., isolated from a methanogenic reactor of cattle waste, reclassification of *Zymophilus raffinosivorans* and *Zymophilus paucivorans* as *Propionispiraraffinosivorans* comb. nov. and *Propionispira paucivorans* comb. nov. and emended description of the genus *Propionispira*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(10), 3571-3577.

Ueki, A., Goto, K., Ohtaki, Y., Kaku, N., & Ueki, K. (2017). Description of *Anaerotignum aminivorans* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, amino-acid-decomposing bacterium isolated from a methanogenic reactor, and reclassification of *Clostridium propionicum*, *Clostridium neopropionicum* and *Clostridium*

lactatifermentans as species of the genus *Anaerotignum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(10), 4146-4153.

Ueno, Y., Otsuka, S., & Morimoto, M. (1996). Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture. *Journal of fermentation and bioengineering*, 82(2), 194-197.

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.

Ueno, Y., Yamada, K., Yoshida, N., Maruyama, S., & Isozaki, Y. (2006). Evidence from fluid inclusions for microbial methanogenesis in the early Archaean era. *Nature*, 440(7083), 516-519

Van Gylswyk, N. O., Hippe, H., & Rainey, F. A. (1997). *Schwartzia succinivorans* gen. nov., sp. nov., another ruminal bacterium utilizing succinate as the sole energy source. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(1), 155-159.

Voordouw, G. (1992). Evolution of hydrogenase genes. *Adv. Inorg. Chem*, 38, 397-422.

Wang, J., & Wan, W. (2008). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International journal of hydrogen energy*, 33(12), 2934-2941.

Wang, X., & Zhao, Y. C. (2009). A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(1), 245-254.

Whitman, W. B. (1992). The methanogenic bacteria. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.*, 719-767.

Wong, Y. M., Wu, T. Y., & Juan, J. C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 471-482.

Xing, D., Ren, N., Wang, A., Li, Q., Feng, Y., & Ma, F. (2008). Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), 1489-1495.

Xu, K., Liu, H., Du, G., & Chen, J. (2009). Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments. *Anaerobe*, 15(5), 204-213.

Yokoi H, Tokushige T, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y (1998). H<sub>2</sub> production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Lett* 1998;20: 143e7.

Zhang, Y., & Shen, J. (2006). Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4), 441-446.

Zhu, H., & Béland, M. (2006). Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(14), 1980-1988.

Zhu, D., Wang, G., Qiao, H., & Cai, J. (2008). Fermentative hydrogen production by the new marine *Pantoea agglomerans* isolated from the mangrove sludge. *international journal of hydrogen energy*, 33(21), 6116-6123

## **Trabajo 1. Work scheme to isolate the different microorganisms found in hydrogen-producing reactors: a study of effectiveness by pyrosequencing analysis**

### **Objetivos específicos abarcados en este trabajo**

Los objetivos 1, 2 y 3 se presentan en el trabajo “Work scheme to isolate the different microorganisms found in hydrogen-producing reactors: a study of effectiveness by pyrosequencing analysis”. En el mismo se detallan las técnicas de aislamientos utilizadas para el estudio de los microorganismos presentes en un reactor de producción de H<sub>2</sub> a escala de laboratorio a partir de suero de queso. Se obtuvieron varios aislamientos correspondientes a microorganismos productores y no productores de H<sub>2</sub>. En los microorganismos productores se estudian los rendimientos de H<sub>2</sub>. Posteriormente se realizaron ensayos de cocultivo para estudiar los efectos de la sinergia y competencia entre los microorganismos productores y no productores de H<sub>2</sub>.

### **Contribución del autor de la tesis**

La contribución del autor en este trabajo fue el diseño y la realización de los experimentos de aislamiento, caracterización, estudios de producción de H<sub>2</sub> de los aislamientos y la caracterización de la comunidad microbiana por pirosecuenciación. La Dra. Elena Castelló y la Mag. Lucía Braga contribuyeron con la operación del reactor del cual se tomaron las muestras. El trabajo fue dirigido por la Dra. Etchebehere. El manuscrito fue escrito por el autor en el marco de esta Tesis bajo la supervisión de la Dra. Etchebehere.

**Work scheme to isolate the different microorganisms found in hydrogen-producing reactors: a study of effectiveness by pyrosequencing analysis**

Laura Fuentes<sup>a</sup>, Lucía Braga<sup>a,b</sup>, Elena Castelló<sup>b</sup>, Claudia Etchebehere<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Microbial Ecology Laboratory, Microbial Biochemistry and Genomics Department, Biological Research Institute “Clemente Estable”, Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup>BioProA Laboratory, Faculty of Engineering, University of the Republic, Herrera y Reissig 565, Montevideo, Uruguay.

Trabajo publicado en **Journal of Applied Microbiology** doi:10.1111/jam.13763

Correspondence to: Claudia Etchebehere, Microbial Ecology Laboratory, Microbial Biochemistry and Genomics Department, Biological Research Institute “Clemente Estable”, Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay; phone: +59824871616 int. 146; E-mail: cetcbehere@iibce.edu.uy; Webpage: <http://www.iibce.edu.uy>

## Abstract

**Aim.** The aim of this research was to create a work scheme for the isolation of the different microorganisms commonly found in hydrogen-producing reactors and to test its effectiveness.

**Methods and results.** Methods were selected to isolate anaerobic spore-forming fermenters, anaerobic fermenters that do not form spores, facultative aerobic fermenters, and lactic acid bacteria. The methods were tested in two samples taken from a hydrogen-producing reactor fed with cheese whey. 16S rRNA gene sequences from isolates were compared with pyrosequencing analysis from the same samples. The isolates represented more than 88 % of the abundance detected by pyrosequencing. Organisms from the genera *Clostridium*, *Rahnella*, *Megasphaera*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Chryseobacterium*, and *Acetobacter* were isolated. Hydrogen-producing capacity was confirmed for the *Clostridium*, *Rahnella*, and *Megasphaera* isolates. Co-culture experiments indicate that *Megasphaera* prevented the total inhibition of *Clostridium* by *Lactobacillus*.

**Conclusion.** The work scheme proposed was effective to isolate most of the microorganisms detected by pyrosequencing analysis. Physiological studies suggested a key role of *Megasphaera*.

**Significance and Impact of Study.** We showed the high culturability of the microbial communities from hydrogen-producing bioreactors. The isolates can be used to perform physiological studies to understand the H<sub>2</sub> producing process.

Key words: bio-hydrogen, hydrogen-producing reactors, pyrosequencing, isolation, *Clostridium*, *Megasphaera*, *Rahnella*, *Lactobacillus*

## Abbreviations

COD, chemical oxygen demand

HRT, hydrogen retention time

HY, hydrogen yield

H<sub>2</sub>, hydrogen

RT, roll tube

CSTR, continuous stirred tank reactor

OTUs, operational taxonomic units

OLR, organic loading rate



## 1. Introduction

Cheese whey is a by-product that is generated from cheese manufacturing at high volumes in Uruguay ( $155.986 \text{ m}^3 \text{ year}^{-1}$ , (Benzano et al., 2016)). It contains high levels of carbohydrate (70–80% lactose), protein (9%), and mineral salts (8–20%) (Carvalho et al., 2013). Because of the high organic content of this by-product, it is necessary to find treatment alternatives before its disposal. One treatment alternative is the production of hydrogen by dark fermentation. However, the main problems identified with dark fermentation are the persistence of microorganisms that compete for the substrate or consume the hydrogen produced (Carrillo-Reyes et al., 2014). Thus, it is necessary to understand the role of the microorganisms involved in the process to avoid competition and increase hydrogen production.

The microbes from hydrogen-producing reactors are mainly composed of hydrogenic microorganisms, such as *Clostridium* and members of the Enterobacteriaceae family, and other microorganisms with metabolic pathways that are not associated with hydrogen production (Hung et al., 2011, Cabrol et al., 2017). The role of the non-hydrogen-producing microorganisms is not clear, they have been associated with negative aspects such as competition for substrate or production of inhibitors (such as bacteriocines), but they may also be involved in consumption of dissolved oxygen, which generates a favorable atmosphere for strict anaerobes (Hung et al., 2011).

To understand the behavior of hydrogen-producing reactors, it is necessary to know the microbial communities that are selected during hydrogen production. To do this, molecular tools based on DNA are frequently used because they are fast and several samples can be analyzed at the same time. For hydrogen-producing reactors DGGE (Hung et al., 2007), T-RFLP (Castelló et al., 2009), SSCP (Quéméneur et al., 2010), FISH (Hung et al., 2007), cloning, and Sanger sequencing (Castelló et al., 2009) were used to reveal the microbial communities involved. More recently, high through-put sequencing was used to identify the taxonomic composition of several reactor samples (Chojnacka et al., 2011; Etchebehere et al., 2016). With these methods, both cultured and non-cultured microorganisms could be detected. This is an important advantage because most microorganisms from nature remain uncultured. However, different ecosystems present different culturability (Amann et al., 1995). The culturability of the microorganisms selected in hydrogen-producing reactors has not yet been evaluated.

Culture-dependent methods permit the isolation and characterization of bacteria that can be critical for reactor performance, and subsequently, the physiological capacity of the microorganisms can be studied in pure culture. For hydrogen production systems, this is crucial

because different fermentation pathways have different hydrogen yields. The role of some frequently reported microorganisms in hydrogen reactors is not completely clear, such as for members of the Veillonelaceae family or the *Lactobacillus* genus (Etchebehere et al., 2016). The isolates could also be used for hydrogen production in pure cultures or constructed consortiums to inoculate the hydrogen-producing reactors or in bioaugmentation strategies (Wang et al., 2007). There are few studies that focus on isolation of microorganisms from hydrogen-producing reactors (Ueno et al., 2001; Porwal et al., 2008; Castelló et al., 2011; Perna et al., 2013; Gomes et al., 2015; Poleto et al., 2016), and most of these studies focus only on one particular group of microorganisms and not on the complete community.

Anaerobes that are frequent in nature and anthropogenic ecosystems are generally key players in these environments. The versatility of these microorganisms could be used in several industrial processes such as bioremediation, fermented foods, biosynthesis, biocatalysis, anaerobic treatment of waste, and bio-fuel production. The study of these microorganisms requires the development of specialized techniques for culture and manipulation of these microbes. Development of these methods is important for several technical applications and for studying different natural ecosystems including the human gut microbiota (Strobel, 2009). Thus, further research is necessary to develop these techniques and use them to study different anaerobic environments.

Based on our previous experience (Castelló et al., 2009; Perna et al., 2013; Etchebehere et al., 2016) and the work of other researchers (Hung et al., 2011; Elsharnouby et al., 2013; Cabrol et al., 2017), it is possible to conclude that microbial communities in hydrogen-producing reactors are composed of four different physiological groups of microorganisms: anaerobic spore-forming fermenters (such as *Clostridium*), anaerobic fermenters that do not form spores (such as members of the Veillonelaceae family), facultative aerobic fermenters (such as members of Enterobacteriaceae and other Proteobacteria), and lactic acid bacteria (such as *Lactobacillus*). Based on the physiological characteristics of these four groups of microorganisms described by Bergey et al. (2009), it is possible to select specific methods to isolate them from hydrogen-producing reactor samples.

The aim of this research was to create a work scheme for the isolation of the different microorganisms commonly found in hydrogen-producing reactors and to test its effectiveness. The isolation procedures were tested in two samples taken from a biohydrogen-producing reactors fed with raw cheese whey. To determine the overall effectiveness of our isolation methods, we analyzed the samples used for isolation using 16S rRNA gene pyrosequencing.

Phylogenetic trees were constructed to compare the sequences obtained in the pyrosequencing analysis and the 16S rRNA genes sequences from the isolates. Hydrogen yield was also determined in the pure cultures and their possible role in hydrogen-producing reactors was postulated. The interaction of representative isolates with different physiological characteristics was tested using co-cultures.

## *2. Material and methods*

### *2.1 Samples*

Samples were taken from a continuous stirred tank reactor (CSTR) used for hydrogen production from raw cheese whey (Braga et al., 2015). The temperature of the reactor was maintained at 30°C using an electric jacket. The reactor was inoculated with kitchen waste compost without heat treatment (Castelló et al., 2018). Samples (50 mL) from the liquid mixture of the reactors were taken during two operation conditions and stored at 4 °C for the culturing approach (within the 24 h of sampling), or were stored at -20 °C for further DNA extraction. The reactors were fed with diluted raw cheese whey. The chemical oxygen demand (COD) concentration of raw cheese whey was  $60 \pm 5 \text{ g L}^{-1}$  (10 samples of different production days in a period of 30 days were analysed). An organic loading rate of  $30 \text{ gCOD Ld}^{-1}$  was used, the hydraulic retention time (HRT) was 24 h, and the pH was set to 5.5. Two samples were chosen in order to cover a period of low production of hydrogen (sample 1) and a period of high production of hydrogen (sample 2). Sample 1 was taken during a first operation when the hydrogen production was null on the sampling day. Sample 2 was taken during a second operation, on day 22, when the reactor performance was better (hydrogen yield was  $2.09 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{lactose}}^{-1}$  and volumetric hydrogen production rate was  $0.3 \text{ L}_{\text{H}_2} (\text{Ld})^{-1}$  on the sampling day).

### *2.2 Microbial community isolation methods*

Four different microbial communities were isolated: 1) anaerobic spore-forming microorganisms; 2) anaerobic non-spore-forming fermentative microorganisms; 3) facultative fermenters and aerobic microorganisms; and 4) lactic acid bacteria (Table 1).

Table 1. Method used for isolation

Method for isolation	Target group	Pre-treatment of the sample	Medium	Atmosphere	Isolation technique*
1	Spore-forming anaerobes	Heat treatment	PYG	N <sub>2</sub>	Dilution to extinction/ roll tubes
2a					Direct isolation on the plate
2b	Non-spore-forming anaerobes	No	PYG	N <sub>2</sub>	Dilution/spread into plate
2c					Dilution to extinction/ roll tubes
3a	Aerobic and facultative fermenters	No	TSA	Air	Direct isolation on plate
3b					Dilution/spread into plate
4	Lactic acid bacteria	No	MRS	Air enriched in CO <sub>2</sub>	Dilution/spread into plate

\*The culture media, the atmosphere of incubation and the isolation technique are shown for each method. All the incubations were performed at 30 °C.

#### *Community 1. Isolation of anaerobic spore-forming microorganisms*

To eliminate the vegetative cells and select spores-forming microorganisms, heat treatment (95 °C, 15 min) was applied to a biomass subsample (10 mL). For the isolation, serial dilutions (1:10) were performed ten successive times using treated samples. For the dilutions, 1 mL of the samples was used to inoculate 25 mL vials with 9 mL of anaerobic PYG media. The PYG media contained 10 g L<sup>-1</sup> glucose (Sigma-Aldrich, MO, USA), 5 g L<sup>-1</sup> yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 5 g L<sup>-1</sup> peptone (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), and 5 g L<sup>-1</sup> meat extract (Frigonal, Uruguay) at pH 6.8 and sparged under a nitrogen atmosphere (The Linde Group, Montevideo, Uruguay) (Perna et al., 2013). The cultures were incubated for one week until macroscopic evidence of growth was observed. Then, the dilution method for isolation was repeated in order to select a single microorganism. For colony isolation, a sample was taken from the culture presenting macroscopic evidence of growth inoculated with the highest dilution, and the roll tubes (RT) technique was used to obtain single colonies under anaerobic

conditions (Hungate and Macy 1973). The same PYG medium was used and supplemented with agar in RT (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA, 13%). RT were then incubated until the presence of colonies was detected. Colonies were removed using a syringe and transferred to a new vial with PYG liquid anaerobic media.

#### *Community 2. Isolation of anaerobic non-spore-forming fermentative microorganisms*

The same procedure explained above was used for the isolation of non-spore-forming fermentative microorganism, but without heat treatment of the samples. In addition to RT (method 2c), two other isolation techniques were used. The sample was tenfold diluted in vials with anaerobic PYG medium as was previously explained. Then, 0.1 mL from the dilutions 8 to 12 were transferred to petri dishes with PYG medium (P) supplemented with agar (13%, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). The plates were incubated in anaerobic bags (Anaerocult® A mini, Merck, Germany) (method 2b). Direct isolation (DI, method 2a) of the samples was performed streaking the samples with a loop in plates with PYG medium supplemented with 13% agar. These plates were incubated in anaerobic conditions using anaerobic bags (Table 1).

#### *Community 3. Isolation of facultative fermenters and aerobic microorganisms*

The sample was tenfold diluted in tubes with sterile physiological saline solution (NaCl, 9 g L<sup>-1</sup>). For that, 1 mL of the first dilution was transferred to a second tube containing 9 mL of the saline solution. This procedure was performed twelve successive times. Then, 0.1 mL from the dilutions 8 to 12 were transferred to petri dishes with TSB medium (Oxoid, Hampshire, UK) supplemented with 13% agar (method 3b).

The cultures were incubated aerobically to isolate facultative fermenters and other aerobic microorganisms (Table 1). Direct isolation of the samples was also performed by directly streaking the sample with a loop in plates with the same media (method 3a).

#### *Community 4. Isolation of lactic acid bacteria*

The sample was ten fold diluted in tubes with sterile physiological saline solution (NaCl, 9 g L<sup>-1</sup>), as was previously explained. Then, 0.1 mL from the dilutions 6 to 11 were transferred to petri dishes with MRS-agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). The plates were then incubated in a CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere (Perna et al., 2013) using a steel cylinder container with a lit candle at the top (Bhatia et al., 1989) (Table 1).

All media were sterilized using a standard-cycle autoclave (15 min, 121°C) before use. For the four methods used, the incubations were carried out at 30°C until growth was detected. The

colonies presenting different morphologies were purified by re-streaking a single colony in plates with the same medium used for the isolation incubated under the same atmosphere conditions mentioned before. To confirm the purity of the isolates, liquid cultures obtained from a single colony were observed under the microscopy using GRAM stain (Doetsch, 1981).

### *2.3 Characterization of the isolates using 16S rRNA gene sequence analysis*

Approximately 6 mL of culture were centrifuged at 3,000 g and the DNA was extracted from 100 mg of wet biomass using the kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, CA, USA). 16S rRNA gene amplification was performed using 27F and 1492R bacterial primers, as previously described (Castelló et al., 2011). The PCR products were purified and sequenced using the 27F primer at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). 16S rRNA sequences obtained from individual isolates were compared to other sequences deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) database using a nucleotide-BLAST search (Edgar et al., 2010).

### *2.4 Production of hydrogen by the isolates*

Hydrogen production was tested for all isolated strains. Liquid cultures were performed in 25 mL vials with 10 mL of PYG medium. The hydrogen production was determined by analyzing the composition of the biogas in samples taken from the headspace at the end of the incubation. Three hydrogen-producing strains from different genera were selected and their hydrogen yield was determined using two different media (PYG and cheese whey diluted 1:1). These cultures were performed in triplicate. The volume of the gas produced by the cultures was determined by water displacement and the hydrogen concentration was determined by gas chromatography as described below. Sugars were determined by the technique of Miller (DNS) in the liquid samples at the beginning and at the end of the experiments (Miller et al., 1960). A standard curve was performed using a solution of lactose. The hydrogen yield was determined as  $\text{mol}_{\text{H}_2} \cdot \text{mol}_{\text{sugar reduced}}^{-1}$  that was consumed in each experiment. All the media were prepared under anaerobic conditions, as previously described (Castelló et al., 2011), and sterilized using a standard-cycle autoclave (15 min, 121 °C). All the incubations were performed at 30 °C without agitation. Statistical analysis was made to determinate the significant differences among HY values obtained for the cultures performed in the two media tested. ANOVA test was performed using ANOVA One-way Analysis function of MS Excel.

### *2.5 Co-cultures with the different isolates*

The co-culture studies were focused in evaluating the effect of *Lactobacillus* on the production

of hydrogen by *Megasphaera* and by *Clostridium*. The interaction between the three strains and the interaction between the two hydrogen-producing bacteria were also evaluated. The co-cultures were performed in the following combinations: 1) *Megasphaera* sp. (PR2AD2) with *Lactobacillus* sp. (M15), 2) *Clostridium* sp. (RT3) with *Lactobacillus* sp. (M15); 3) *Lactobacillus* sp. (M15) with *Clostridium* sp. (RT3) and *Megasphaera* sp. (PR2AD2) and 4) *Clostridium* sp. (RT3) with *Megasphaera* sp. (PR2AD2). The strains were initially grown in PYG liquid medium until the exponential phase was reached. An aliquot of each culture was then taken and diluted to the same optical density (OD). 0.3 mL of each culture with the same OD (0.1) was used for co-inoculation. The OD was determined using a spectrophotometer (Erma Inc. Model AE-22). The biogas volume was determined by water displacement and the composition of the gas was determined by gas chromatography in samples taken from the head space. Sugars were determined by the technique of Miller (DNS) in samples taken from the liquid medium at the beginning and the end of the experiments (Miller et al., 1960). The hydrogen yield was determined as previously described. All media were prepared under anaerobic conditions, as was previously described (Castelló et al., 2011) and sterilized using a standard-cycle autoclave (15 min, 121°C). All the incubations were performed at 30°C. A statistical analysis was performed to determine the significant differences among HY values. One way ANOVA, Tukey's pairwise analysis was performed using PAST software (Hammer et al., 2001)

## 2.6 Chemical analysis

Hydrogen was determined in the biogas samples using gas chromatography (Chromatograph SRI 310C) equipped with a 6' Hayesep-D column (SRI Instruments, CA, USA) and a TCD detector. The column temperature was set to 35°C.

## 2.7 DNA extraction and 16S rRNA gene pyrosequencing analysis

The same samples taken from the reactors and used for bacterial isolation were stored at -20°C for molecular analysis. The biomass was separated by centrifugation at 12,000 g for 3 min and DNA extraction was performed using the PowerSoil DNA Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), as described by the supplier. DNA purity was verified using 0.8 % agarose gels stained with Goodview (SBS Genetech, Beijing, China). DNA was then dehydrated using ethanol and sent to the Institute for Agrobiología Rosario (INDEAR, Rosario, Argentina), where a pyrosequencing analysis was performed using a Roche Genome Sequencer FLX Titanium system. The 16S rRNA genes were amplified using the primer sets V3-357F and V5-923R (Sim et al., 2012) and sequenced using a Roche Genome Sequencer FLX Titanium system. The raw sequences were analyzed using the QIIME software (Caporaso et al., 2010). De novo chimera detection was

performed with Usearch 6.1 software (Edgar, 2010). Denovo operational taxonomic units (OTUs) were chosen and its taxonomy was assigned using the UClust tool on the basis of 97 % sequence identity with Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) reference sequences dataset. Sequence alignments were performed with PyNAST. The sequences were submitted to the NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) under accession BioProject ID PRJNA347863.

### 2.8 Phylogenetic analysis

The 16S rRNA gene sequences from the isolates and the sequences from closely related organisms, resulting from BLAST search comparison, were compiled and used to generate a phylogenetic tree using MEGA version 5.1 (Tamura et al., 2011). Sequences from predominant OTUs obtained in the pyrosequencing analysis were also included. Alignment files were generated using ClustalW, a function within MEGA 5.1 (Tamura et al., 2011). A phylogenetic tree was performed using the Neighborhood Joining test with 1,000 bootstrap replicates. Sequences from the isolates were deposited to the NCBI database under accession numbers from KX131181 to KX131230.

## 3. Results

### 3.1 Strains isolated using the four methods

Fifty strains were isolated from the two reactor samples. 16S rRNA gene analysis showed that most of their sequences had a high degree of homology with sequences from previously described microorganisms (Table 2). In most of the cases, the sequences belonged to microorganisms from genera with fermentative metabolism (*Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Propionibacterium*, and *Rahnella*), indicating that fermentative metabolism predominates in the reactors (Table 2).

The methods used successfully isolated the target group of microorganism. Strains classified within the *Clostridium* genus were isolated using previous heat treatment of the sample (method 1) and direct plating (method 2a) without heat treatment that were incubated under anaerobic conditions. Non-spore-forming anaerobic microorganisms were not found using method 1, indicating that the treatment successfully eliminated vegetative cells (Table 3).

With method 2 (PYG plates incubated under anaerobic conditions), a wide variety of microorganisms were isolated and classified into six different genera. In particular, when using dilution to extinction and subsequent isolation on plates, strains classified into *Lactobacillus*



were frequently isolated. This indicates that *Lactobacillus* was favored under these conditions. One strain (PR2AD2) classified within the *Megasphaera* genus was isolated only by direct isolation on plates incubated under anaerobic conditions (method 2a) (Table 3).

Table 2. Identification of the isolates according to 16S rRNA gene analysis. The length of the sequences were between 800 and 1000 bp. The closest relative according to BLAST search tool and the % of sequence similarities are shown. The metabolisms of the species detected according to bibliography (Bergey's et al., 2009) are indicated. The numbers in brackets are the accession number of the sequences from the closest relative according to BLAST in the NCBI database.

Strains	Sample	Closest relative according to BLAST % sequence similarity	Metabolism
M1	1	<i>Acetobacter indonesiensis</i> 99% (NR_028616.1)	A
PR4, PR8	2	<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> 99% (NR_029065.1)	F
M8	1	<i>Chryseobacterium bovis</i> 98% (NR_044166.1)	A
P14, RT1, RT2, RT3, RT4, RTT1, RTT2, RTT4, RTT5	1 and 2	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> 99% (NR_044718.2)	F
P10, M2, M4, M9, M10, M15, RST3, RST2, MR1, P16	1 and 2	<i>Lactobacillus casei</i> 98–100% (NR_075032.1)	F
M13	1	<i>Lactobacillus fermentum</i> 99% (NR_104927.1)	F
PR2, PR5, MR6, MR8	2	<i>Lactobacillus harbinensis</i> 99% (NR_113969.1)	F
P12	2	<i>Lactobacillus hilgardii</i> 98% (NR_044708.2)	F
P3, P8, P9	2	<i>Lactobacillus kefirifaciens</i> 98–99% (NR_042441.1)	F
PR1AD	2	<i>Lactobacillus kefirii</i> 99% (NR_113336.1)	F
P2	2	<i>Lactobacillus otakiensis</i> 99% (NR_041657.1)	F
M17	1	<i>Lactobacillus parabucheri</i> 99% (NR_041294.1)	F
P7, M11	2	<i>Lactobacillus parafarraginis</i> 99% (NR_041468.1)	F
MR4, MR7	2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> 99–100% (NR_043183.1, NR_113387.1)	F
PR2AD2	2	<i>Megasphaera cerevisiae</i> 99% (NR_044650.1)	F
M3, M7	1	<i>Micrococcus yunnanensis</i> 99% (NR_116578.1)	A
R3, R8	2	<i>Pseudoclavibacter soli</i> 96% (NR_041614.1)	A
P4, P6	2	<i>Propionibacterium acnes</i> 99% (NR_074675.1)	F
R2, R4, R5, R7	2	<i>Rahnella aquatilis</i> 99% (NR_074921.1)	F

A, aerobic respiration; F, fermenter.

As expected, strains classified into genera from strict aerobic microorganisms, such as *Acetobacter*, *Micrococcus*, and *Chryseobacterium* were only isolated using plates incubated under aerobic conditions (method 3). A strain classified as belonging to the *Pseudoclavibacter* genus was also isolated only by direct isolation and incubated under aerobic conditions (method

3a). Additionally, one strain (R4) classified within the *Rahnella* genus from the Enterobacteriaceae family could only be isolated using the aerobic plate approach (Table 3).

Using the strategy designed for lactic acid bacteria (method 4), it was possible to isolate strains classified within nine different species of *Lactobacillus*. Strains affiliated with the species *L. delbrueckii*, *L. fermentun*, and *L. parabucheri* were only isolated using method 4 and not using other methods (data not shown).

Table 3. Genera of the isolates retrieved by the different methods applied for culture. Community 1: spore-forming anaerobes; Community 2: non-spore-forming anaerobes; Community 3: aerobic and facultative fermenters; Community 4: lactic acid bacteria. The method of isolation was also indicated (DI, direct isolation; DE/RT, dilution to extinction and Roll Tube; P, spread on plates).

Genus	Isolation methods						
	1	2			3	4	
	DE-RT	(a) DI	(b) P	(c) DE-RT	(a) DI	(b) P	P
<i>Acetobacter</i>						X	
<i>Bifidobacterium</i>			X				
<i>Chryseobacterium</i>					X	X	
<i>Clostridium</i>	X	X					
<i>Lactobacillus</i>		X	X	X		X	X
<i>Megasphaera</i>		X					
<i>Micrococcus</i>						X	
<i>Pseudoclavibacter</i>					X		
<i>Propionibacterium</i>		X					
<i>Rahnella</i>					X	X	

### 3.2 Community analysis by 16S rRNA gene pyrosequencing

To determine if the isolates were representative members of the community that developed in the reactor samples, the same samples used for isolation were analyzed using 16S rRNA gene pyrosequencing. From the two samples analyzed, a total of 24,229 high quality reads were obtained: 7,738 in sample 1 and 16,491 in sample 2. The reads were subsequently grouped into operational taxonomic units (OTUs) based on 97% sequence similarity, obtaining a total of 224 OTUs. The classification at the genus level showed a prevalence of fermentative microorganisms in both samples, with a high abundance of lactic acid bacteria, particularly in sample 1 (Table 4). Sample 2 was more diverse than sample 1 and showed three genera from potential hydrogen-

producer bacteria (*Clostridium*, *Megasphaera*, and *Rahnella*). An important abundance of the *Clostridium* genus was detected in sample 2 (20.9%), while in sample 1, organisms from the *Lactobacillus* genus were dominant (89.1%) (Table 4). Strains from most of the genera detected in both samples were isolated using the methods applied, indicating a high coverage of the community using the culture approach. The coverage of the culture methods was determined using the sum of the relative abundance of the genera detected by both methods; these results showed that for sample 1, 98.8% of the abundance was detected using both methods, while for sample 2, 88.1% of the abundance was detected by culturing and molecular methods.

When the analysis was performed at the OTU level, a strong correlation between the classification of the sequences from the most abundant OTUs and the sequences from the isolates was also found (Table S1).

Table 4. Classification of the reads obtained by 16S rRNA gene pyrosequencing of the two reactor samples. Only results from the reads with more than 0.1% relative abundance are shown, reads with lower abundance are only shown in the cases of reads classified in genera observed by the culture approach. The total coverage of isolation was determined as the sum of the relative abundance of genera detected by both methods (isolation and pyrosequencing).

Phylum	Family	Genera	Relative abundance (%)	
			Sample 1	Sample 2
Actinobacteria	Bifidobacteriaceae	Other	1.3	2.6
Actinobacteria	Propionibacteriaceae	<i>Propionibacterium</i>	–	0.03
Actinobacteria	Propionibacteriaceae	Other	–	0.05
Bacteroidetes	Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	–	0.2
Firmicutes	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	0.3	20.9
Firmicutes	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	89.1	20.8
Firmicutes	Lactobacillaceae	Other	0.7	19.8
Firmicutes	Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> *	0.7	3.4
Firmicutes	Veillonellaceae	<i>Megasphaera</i>	0.006	0.3
Firmicutes	Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i> *	5.4	3.2
Proteobacteria	Acetobacteriaceae	<i>Acetobacter</i>	1.3	10.4
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	Other	–	6.3
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Rahnella</i>	0.03	0.1
Total abundance detected by both methods			98.8	88.1

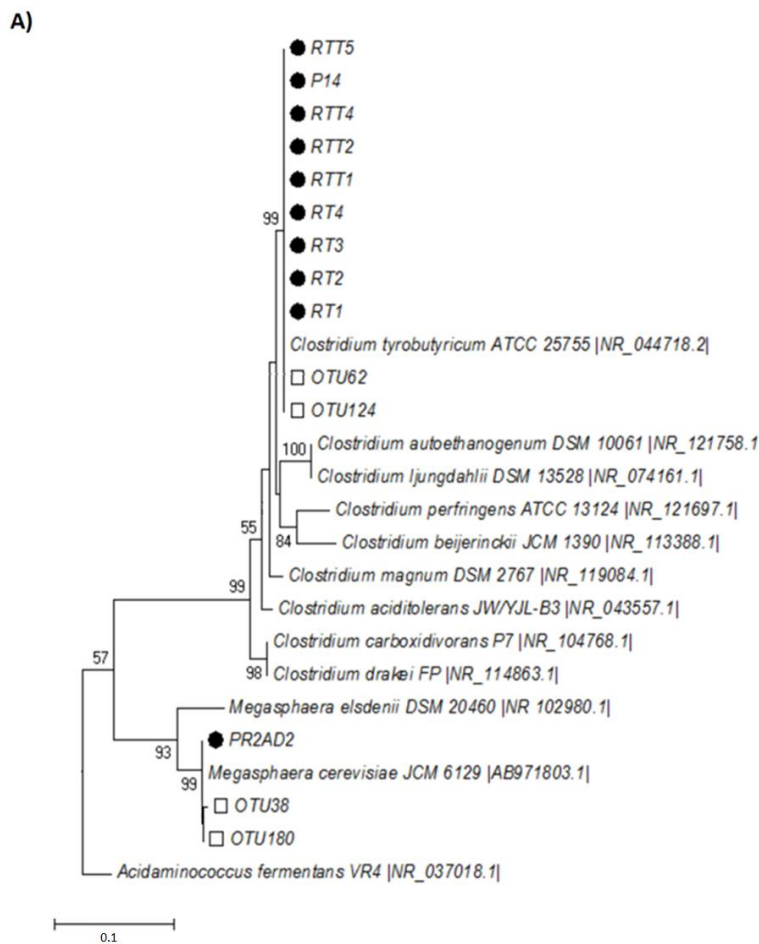
\*The genera *Lactococcus* and *Streptococcus* were not observed in the strains isolated.

### 3.3 Phylogenetic studies

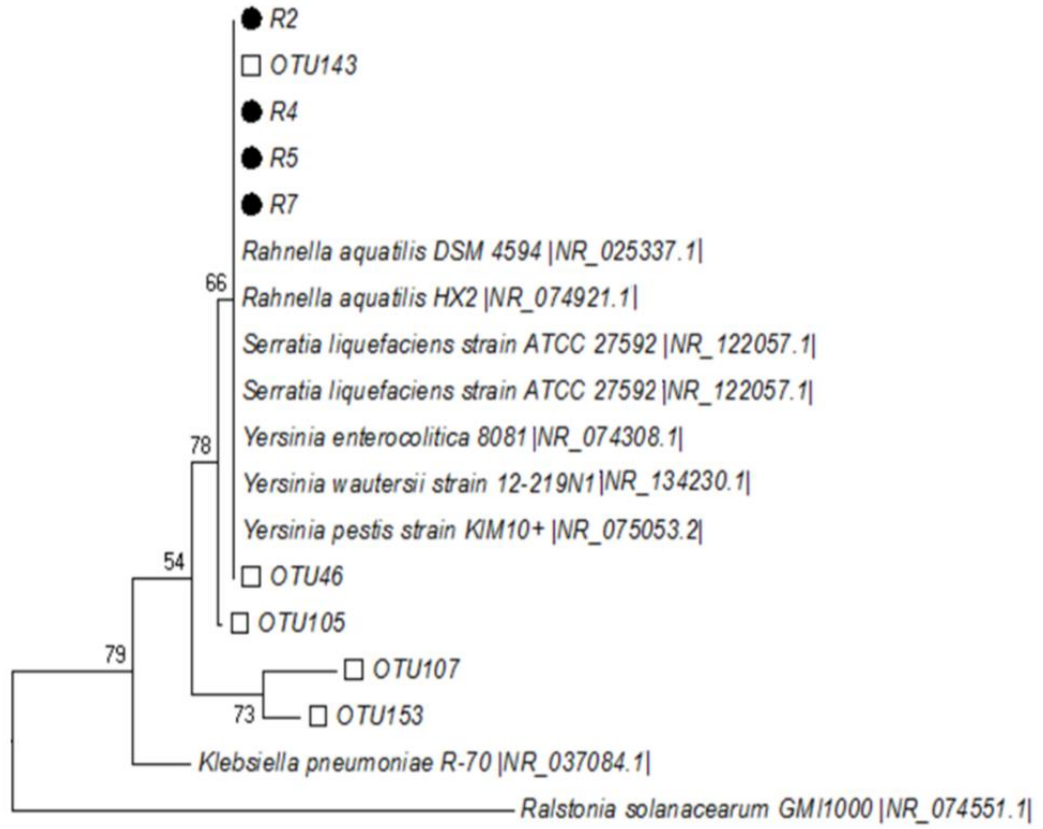
For an in-depth comparison of the sequences retrieved from the pyrosequencing analysis and the sequences from the isolates, four phylogenetic trees were constructed, which included sequences from representative organisms deposited into the database (NCBI). The phylogenetic trees showed that sequences from OTUs and from isolates cluster together and presented very low phylogenetic distance between them (Fig. 1).

According to the phylogenetic analysis, isolates with the capacity to produce hydrogen

presented sequences with high phylogenetic relationships to sequences from *Clostridium tyrobutyricum*, *Rahnella aquatilis*, and *Megasphaera cerevisiae*. With respect to non-hydrogen-producer bacteria, the sequences were related to the sequences from *Acetobacter indonesiensis*, *Bifidobacterium psychraerophilum*, *Chryseobacterium bovis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Propionibacterium acnes*, and *Pseudoclavibacter soli*. The lactic acid bacteria showed sequences closely positioned with sequences from *Lactobacillus casei*, *L. fermentum*, *L. harbinensis*, *L. hilgardii*, *L. kefiranofaciens*, *L. kefiri*, *L. otakiensis*, *L. parabucheri*, and *L. parafarraginis* (Fig. 1).

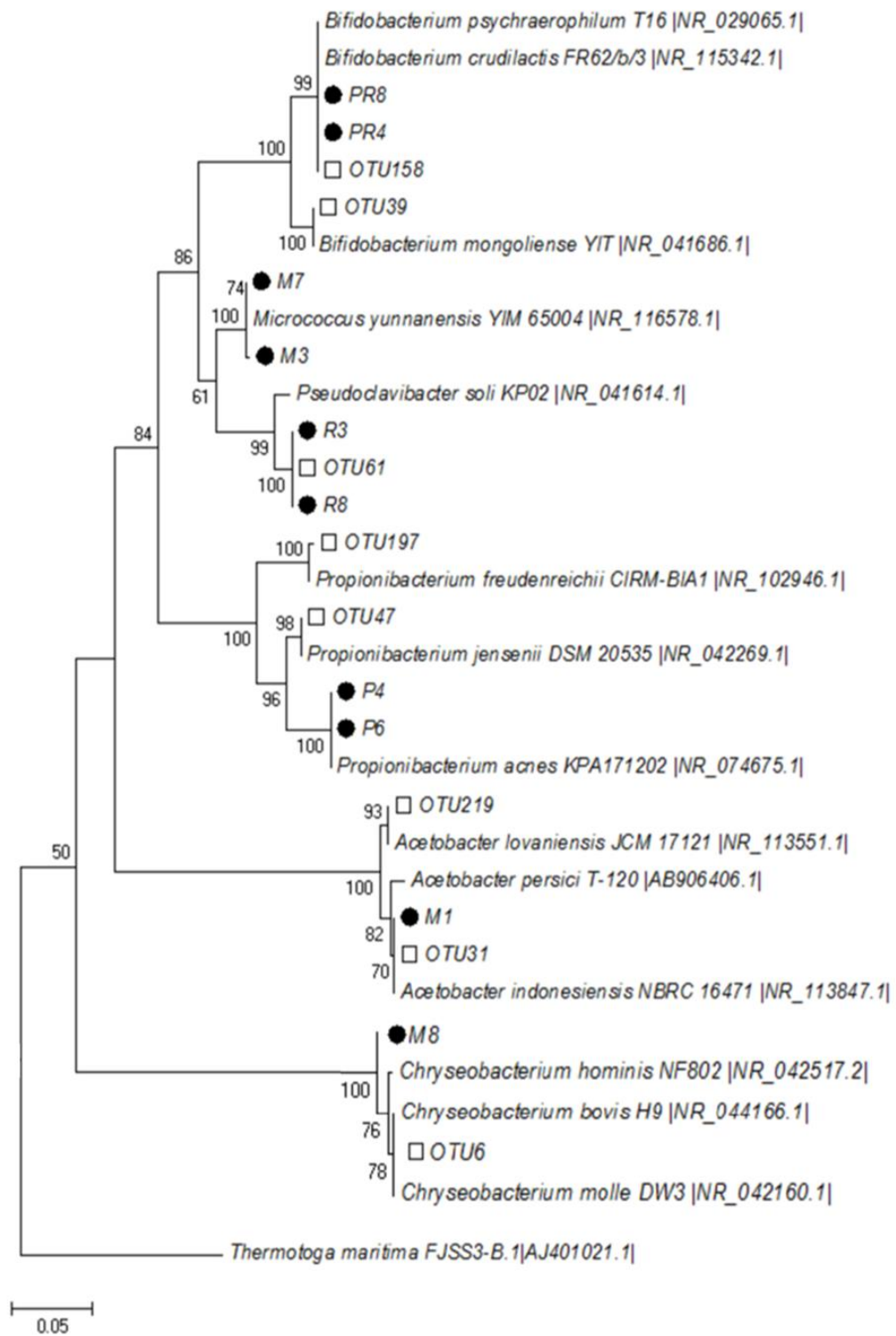


B)

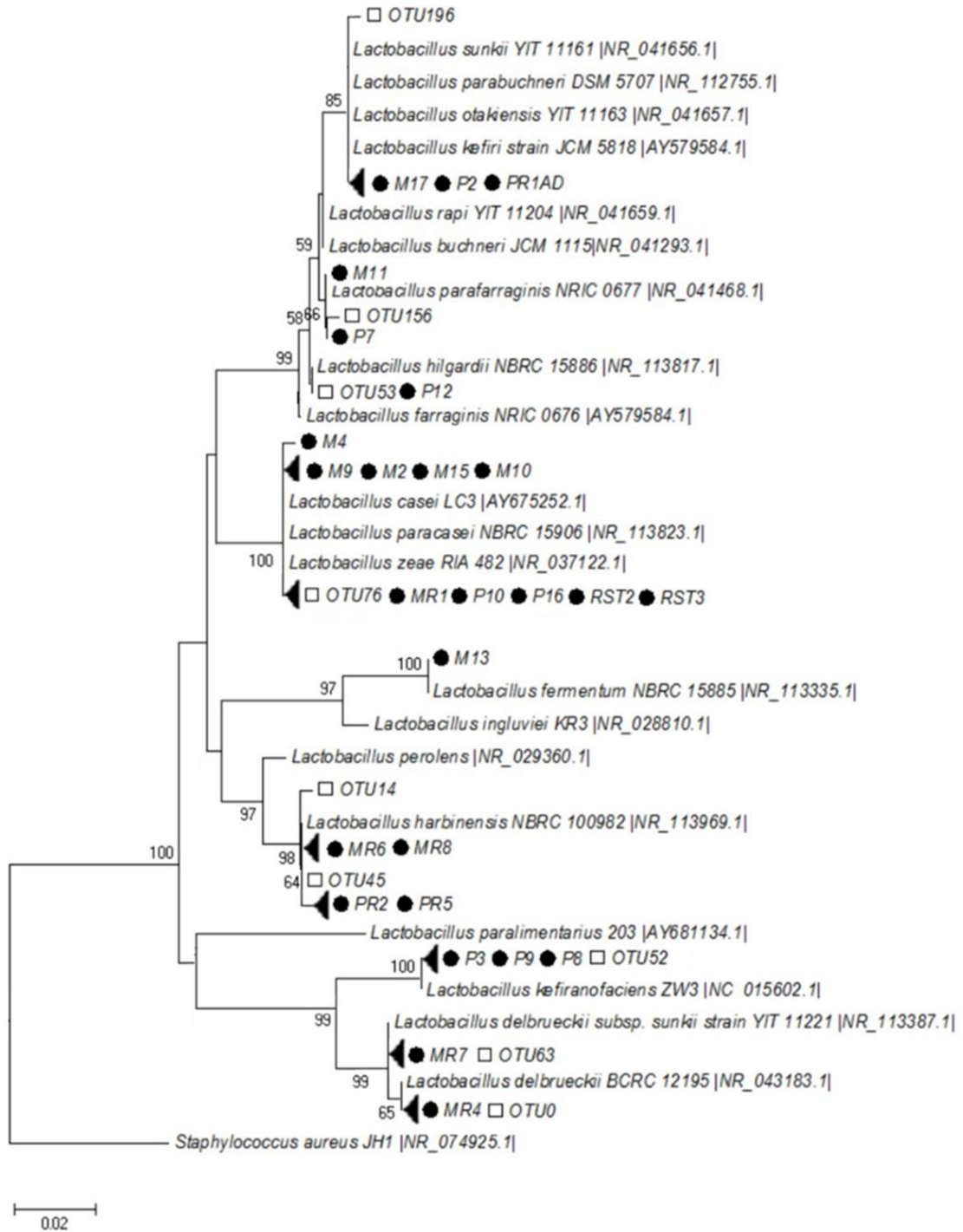


0.02

c)



D)



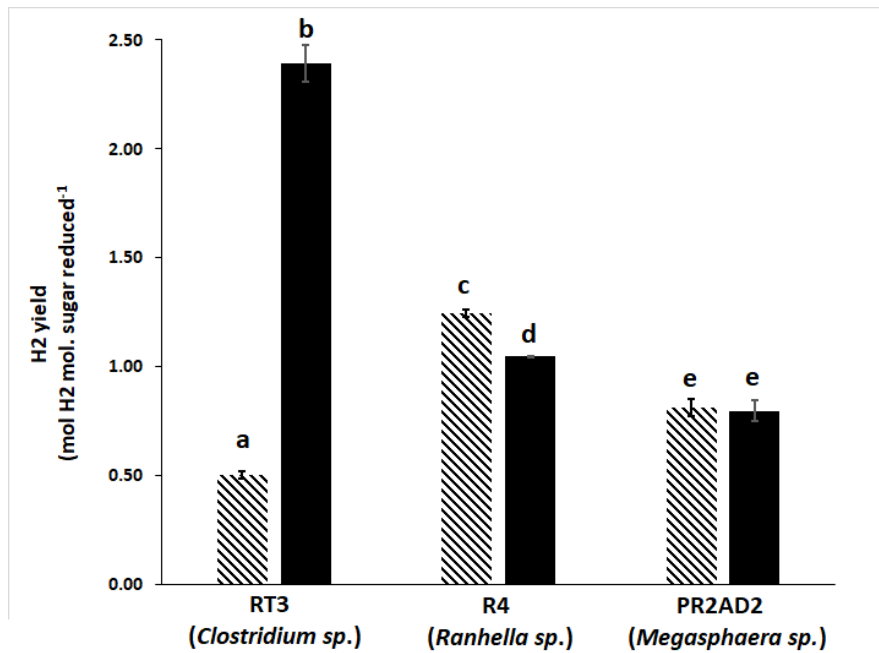
**Figure 1.** Phylogenetic tree illustrating the evolutionary position of the 16S rRNA gene sequence from the isolates (black circle) and OTU sequences retrieved from pyrosequencing (white square). Bootstrap values (1000 replicates) above 50 % are shown at the nodes. The Neighbor-Joining tree was constructed using 500-bp length sequences. Sequences retrieved from the NCBI database were included (the accession numbers are included). The scale bar represents five nucleotide substitutions per 100 nucleotides. A) Phylogenetic tree illustrating the evolutionary position of the 16S rRNA gene sequence from the isolates

with capacity to produce hydrogen from Firmicutes phylum and OTUs sequences retrieve from pyrosequencing. *Acidaminococcus fermentans* VR4 (NR\_037018.1) was used as the out-group. B) Phylogenetic tree illustrating the evolutionary position of the 16S rRNA gene sequences from strains with hydrogen-producing capacity from Enterobacteriaceae family and OTUs sequences retrieved from pyrosequencing. *Ralstonia solanacearum* GMI1000 (NR\_07455.1) was used as an out-group. C) Phylogenetic tree illustrating the evolutionary position of the 16S rRNA gene sequences from strains with no capacity to produce hydrogen and OTUs sequences retrieved from pyrosequencing. *Thermotoga maritima* FJSS3-B.7 (AJ401021.1) was used as an out-group. D) Phylogenetic tree illustrating the evolutionary position of different isolated *Lactobacillus* based on 16S rRNA sequencing and OTUs sequences retrieved from pyrosequencing. *Staphylococcus aureus* JH1 (NR\_074925.1) was used as an out-group.

### 3.4 Hydrogen production by the isolates

Fourteen strains classified as *Clostridium*, *Megasphaera*, and *RanHELLa* produce hydrogen during fermentation. One representative strain from each genus with the capacity to produce hydrogen was selected and the hydrogen yield was determined in a rich medium (PYG) and in diluted cheese whey (Fig. 2). According to statistical analysis, the hydrogen yields obtained in the two different media were different for the *Clostridium* sp. and *Rahnella* sp. strains. Strain RT3 characterized as *Clostridium* sp. showed a higher hydrogen yield ( $\text{HY}=2.4 \text{ moles}_{\text{H}_2} \text{ mole}^{-1}_{\text{sugar reduced}}$ ) in PYG medium compared to the yield obtained using cheese whey ( $\text{HY}=0.5 \text{ moles}_{\text{H}_2} \text{ mole}^{-1}_{\text{sugar reduced}}$ ). However, the strain R4 characterized as *RanHELLa* sp. presented a higher yield when the cheese whey was used as a substrate ( $\text{HY}= 1.2 \text{ moles}_{\text{H}_2} \text{ mole}^{-1}_{\text{sugar reduced}}$ ) compared with PYG ( $\text{HY}= 1.0 \text{ moles}_{\text{H}_2} \text{ mole}^{-1}_{\text{sugar reduced}}$ ) (Fig. 2). However, strain PR2AD2 that was classified as *Megasphaera* sp. showed a similar performance using both substrates.



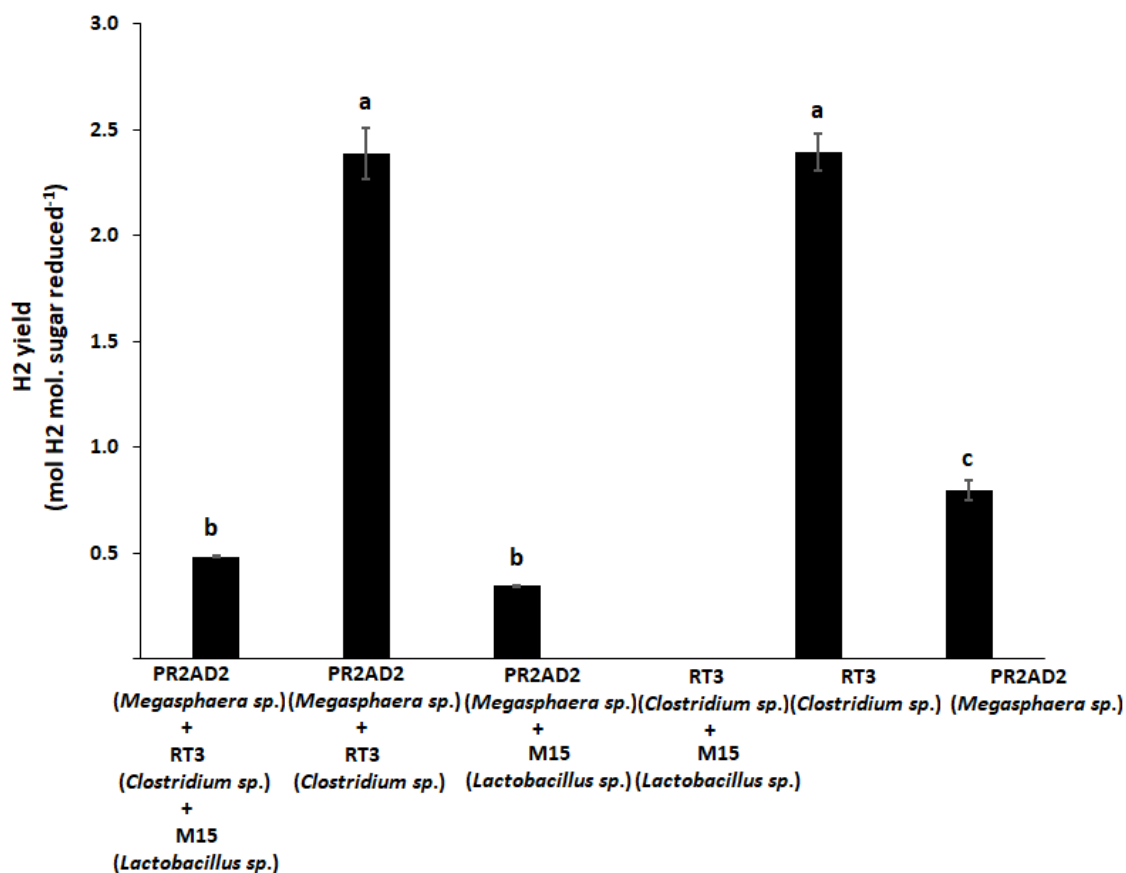


**Figure 2.** Hydrogen yield obtained in pure culture from hydrogen-producing strains classified as *Clostridium* sp. (strain RT3), *Megaphaera* sp. (strain PR2AD2), and *Ranhello* sp. (strain R4). The trials were performed in PYG (black) and a medium composed by cheese whey diluted 1:1 (stripes). The experiments were performed in triplicates, the average value is shown, and the standard deviation for the triplicate experiments is indicated by bars. Initial concentration of the reducing sugars was 19.2 g L<sup>-1</sup> in cheese whey and 10 g L<sup>-1</sup> in PYG. Values marked with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ) according to ANOVA statistical analysis.

### 3.5 Interaction between the different strains studied using co-culture experiments

Organisms from the *Lactobacillus* and *Clostridium* genera dominate the microbial community in sample 2. To test the interaction between these two microorganisms, co-culture experiments were performed. The *Lactobacillus* sp. strain M15 completely inhibited hydrogen production by the *Clostridium* sp. strain RT3 (Fig. 3). However, when the *Megasphaera* sp. strain PR2AD2 was incorporated into the co-culture, inhibition was not complete and hydrogen production was observed. Statistically significant differences were observed between the yields obtained in the co-culture experiments compared to the monoculture experiments, except for the co-culture performed with the two hydrogen-producing strains (*Clostridium* sp. strain RT3 and *Megasphaera* sp. strain PR2AD2). The yield obtained for the co-culture of the three strains ( $\text{HY} = 0.48 \text{ mol}_{\text{H}_2} \text{ mol}_{\text{reducing sugars}}^{-1}$ ) was 79% lower than the mean yield obtained for the *Clostridium* strain monoculture, and it was 35% lower than the yield obtained for the *Megasphaera* strain. The inhibition effect of the *Lactobacillus* sp. strain M15 was not complete for hydrogen

production by the *Megasphaera* sp. strain PR2AD2. A reduction of 46 % was observed compared to the monoculture.



**Figure 3.** Hydrogen yield obtained from co-culture experiments using different combinations of hydrogen-producer strains belonging to *Clostridium* sp. (RT3), *Megasphaera* sp. (PR2AD2), and the non-hydrogen-producer strain *Lactobacillus* sp. (M15). The trial was performed in PYG medium. The experiments were performed in triplicate, the average value is shown by the bars, and the standard deviation for the triplicate experiments is indicated. Initial concentration of glucose was 10 g L<sup>-1</sup> in PYG. Values marked with the same letter do not differ significantly according to Turkey's pairwise comparison.

#### 4. Discussion

##### 4.1 Coverage of the culture methods

Microorganisms present in low and high abundance according to pyrosequencing analysis were isolated, indicating a wide range of coverage using the isolation techniques. Although it has been frequently reported that most microorganisms from nature remain uncultured (Ward et al., 1990), we showed here that in the samples tested from the hydrogen-producing reactor, most microorganisms present could be isolated. This is probably because of the special characteristics of this kind of ecosystem. The high restrictions imposed on these reactors (low pH, high organic

loading rate (OLR), low HRT) select microbial communities with a low diversity and a high abundance of a particular genus (Etchebehere et al., 2016). Moreover, the microorganisms present in these ecosystems are mainly fermenters, which are easily cultured in the lab if the appropriate conditions are applied. A similar result was obtained by Liu et al. (2016), who analyzed samples from Chinese traditional sourdough. The authors studied the microbial composition of different sourdough samples and found a high predominance of some *Lactobacillus* species in the samples, using both culturing and pyrosequencing methods. This ecosystem is also an example of a high acidic environment with a predominance of fermentative microorganisms. A high correlation was also obtained by Delgado et al. (2013) who studied the microbial composition of different raw milk samples. The samples were also dominated by lactic bacteria and most of them were cultured in the laboratory. Thus, it can be concluded that the microbial composition of communities dominated by fermentative microorganisms can be covered by traditional culturing methods. However, the role of microorganisms that were not retrieved by the isolation methods remains unknown.

The four methods applied in this research were successful in retrieving the target microorganisms. Three different isolation methods were used (dilution to extinction and isolation in RT, dilutions and plating, and direct isolation by directly streaking the sample in a plate). Among these, the method of isolation by direct streaking of the sample onto plates and incubating them under anaerobic and aerobic conditions showed higher coverage compared with the other isolation methods. This result is convenient because these are simple and rapid isolation methods that can be performed in any microbiology laboratory with no special anaerobic requirements; commercial anaerobic bags can be used for the anaerobic incubation.

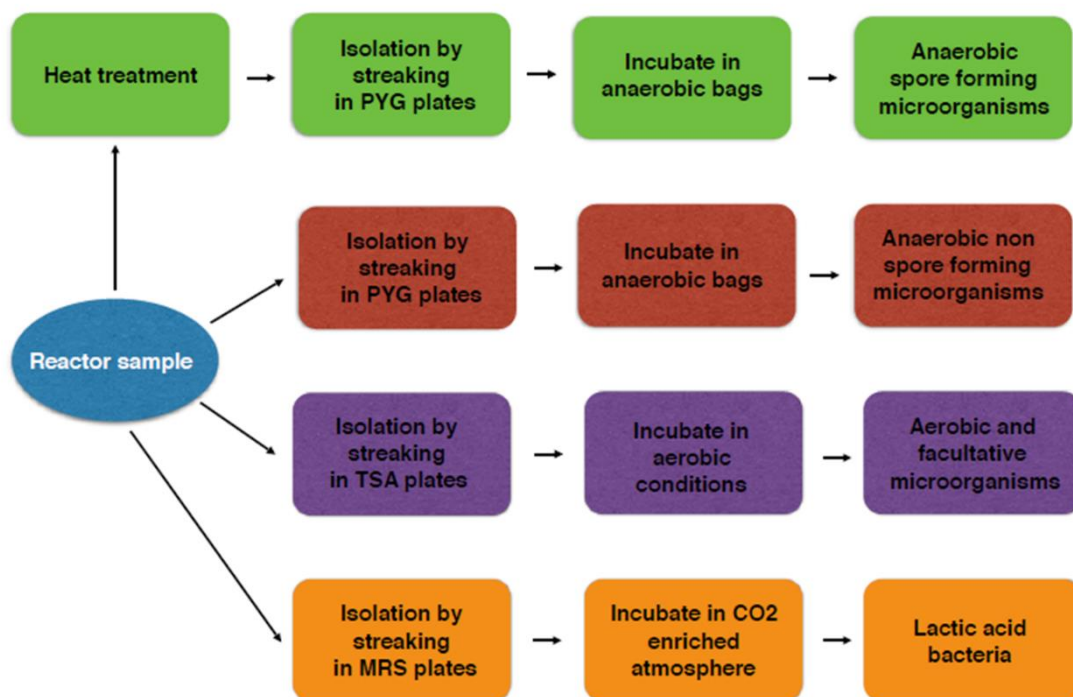
Strains classified within the genus *Clostridium* were isolated using a previous heat treatment of the sample or by direct isolation on anaerobic plates. This confirms the effect of the heat treatment favoring the growth of spore-forming microorganisms that eliminate other competing microorganisms.

Only one isolate was classified within the genus *Megasphaera* (strain PR2AD2) within the family *Veillonellaceae*, and this strain was only isolated by direct isolation on plates with PYG medium and incubation under anaerobic conditions. This strain might not compete in liquid culture media because of its slow growth rate (Russell and Dombrowski, 1980) and low abundance in the community.

Only organisms classified within the *Lactobacillus* genus were isolated in the strategy used for lactic acid bacteria (MRS media incubated in an enriched CO<sub>2</sub> atmosphere), confirming the

selectivity of the culture procedure. Lactic acid bacteria were mostly isolated from sample 1, which was taken during low hydrogen production, and it presented a high abundance of members from this genus, according to the pyrosequencing results.

Based on these results, a work scheme is proposed to isolate the predominant microorganisms from hydrogen-producing reactors in Figure 4. Using these four simple isolation methods, a high proportion of the communities could be retrieved. The isolates could be used to construct artificial consortia and to study the physiological role of the different microorganisms in the reactors.



**Figure 4.** Work scheme to isolate predominant microorganisms in hydrogen producing reactors.

#### 4.2 Comparison of sequences from isolates and from pyrosequencing analysis

A high similarity was observed between sequences retrieved from isolates and sequences from the pyrosequencing analysis. The phylogenetic trees confirm that the sequences from OTUs and isolates cluster together, and they show a low phylogenetic distance between them in most cases (Fig. 1). This confirms that the isolation methods retrieved most of the abundance present in the communities. However, there were some disagreements within both methods, as follows: sequences from isolates and OTUs clustered together in the phylogenetic tree but they were not closely related; sequences from isolates were not found in the pyrosequencing analysis; and

some sequences retrieved by pyrosequencing were not related to any sequence from the isolates.

The sequences from OTUs 105, 107, 153, and 43 were classified within the *Rahnella* genus according to QIIME software analysis, but in the phylogenetic tree, these sequences were closely related to sequences from other genera from the Enterobacteriaceae family (Fig. 1B). Members from the Enterobacteriaceae family were reported to show high homology in the 16S rRNA gene sequence, and thus, it is not possible to differentiate between the different genera using this gene (Drancourt et al., 2001). A similar result was obtained for the sequences classified within the *Propionibacterium* genus, and it was not possible to find a close relationship between the sequences from the isolates and from the OTUs (OTU 47 and OTU 197). This disagreement could be because of the problems with classification using sequences with short lengths that are retrieved using the pyrosequencing method, and because of the high similarity within the sequences from the group (Liu et al., 2016).

Sequences from the isolate M13 (which showed 99% sequence homology with *Lactobacillus fermentum*) were not closely related to any sequence retrieved in the pyrosequencing analysis (Fig 1D). A similar result was obtained by Liu et al. (2016). The authors found some isolates that were not observed in the pyrosequencing analysis. The authors had two explanations for these results: 1) the species may exist in the samples at a very low number and thus not enough DNA was extracted for pyrosequencing; and 2) pyrosequencing analysis may not be able to distinguish certain species from their close relatives with a limited length of DNA sequences. Two strains isolated from sample 2 were characterized within the genus *Micrococcus* and no sequences from this genus were retrieved in the pyrosequence analysis. *Micrococcus* is frequently found in air and skin (Bergey et al., 2009), so it was not possible to discount contamination of the plates by this microorganism.

Organisms from the *Lactococcus* and *Streptococcus* genera were present in a relative abundance of 5.4% and 3.4%, respectively, according to the pyrosequencing analysis, but no representative of these genera were detected using the culture approach. These microorganisms are usually used as starters in cheese production (Beresford et al., 2001). It was previously reported that *S. thermophilus* was inhibited by some strains of *Lactobacillus delbrueckii* and that *Lactococcus lactis* was also weakly inhibited by this strain (Viderola et al., 2000). *S. thermophilus* has an optimum growth temperature between 35°C and 42°C (Radke-Mitchell and Sandine, 1986), which is above the incubation temperature used in our study (30°C). Thus, these two strains could be either inhibited by other strains in the media used for isolation, or the incubation

temperature did not favor their growth.

The other microorganisms that were not isolated using culture-based methods had a low proportion in the 16S rRNA gene pyrosequencing analysis. Because of their low abundance, it is likely that these microorganisms did not compete with the predominant microorganism in the culture medium used. Moreover, the molecular approach based on DNA was not indicative of viable cells. Because of the persistence of DNA in the environment after cells had lost their viability, DNA-based detection methods cannot differentiate between live and dead microorganisms (Nocker et al., 2006).

#### 4.3 Physiological role of the microorganism observed in the reactor samples

The microbial composition of the communities observed using both techniques was in agreement with the expected results, according to the performance of the reactor at the time of sampling. A higher abundance of the genera *Clostridium* and *Megasphaera* was observed in the sample taken from the reactor during high hydrogen production, whereas high prevalence of *Lactobacillus* and low dominance of hydrogen-producing microorganisms were observed in the sample taken when no hydrogen was produced. The presence of *Lactobacillus* was frequently reported in hydrogen-producing bioreactors fed with cheese whey (Castelló et al., 2009; Carrillo-Reyes et al., 2014; Gomes et al., 2015). This microorganism is part of the cheese whey microbiota and it persisted under the operating conditions used for hydrogen production (Gomes et al., 2015). However, the role of lactic acid bacteria in hydrogen-producing reactors is controversial because it was found that the relative abundance of *Lactobacillus* was high in samples with low and high hydrogen production (Etchebehere et al., 2016). We also observed the presence of organisms from the *Veillonelaceae* family from the *Megasphaera* genus. This organism was reported to consume organic acid and produce small amounts of hydrogen, and it increases hydrogen production after sugar consumption (Won et al., 2013). Moreover, we demonstrate here that the presence of this microorganism partially prevents the inhibition of lactic acid bacteria when hydrogen is produced by *Clostridium*. Thus, this microorganism may play a key role in hydrogen-producing reactors. The relative abundance of this microorganism was higher in sample 2, where the hydrogen yield production was also higher, but in both samples, the abundance was low.

An advantage of using the culturing approach is the possibility of studying the physiological capabilities of the isolates using raw substrates. Thus, three hydrogen-producing strains belonging to different genera (*Clostridium*, *Megasphaera*, and *Rahnella*) were selected and their hydrogen yields were determined using two different media. Different behavior was observed

for the three strains. When using a rich medium with glucose as a substrate (PYG), higher yields were obtained for the strains classified as *Clostridium* (strain RT3), but when cheese whey was used as the substrate, higher yields corresponded to the strain classified as *Rahnella* (strain R4). The potential for hydrogen production by *Rahnella aquatilis* using cheese whey was also reported by Debowski et al. (2014). They analyzed the biogas production in a solution of cheese whey powder using different isolated strains and reported the highest hydrogen production by the strain identified as *Rahnella aquatilis* (Debowski et al. 2014).

Strain PR2AD2, classified as *Megasphaera*, presented similar hydrogen production in both media, indicating that this organism may have an important role in hydrogen production in the reactor fed with cheese whey. A high hydrogen yield from a *Megasphaera* isolate was also observed by Ohnishi et al. (2010). Organisms from this genus have been reported in previous research performed by our group (Castelló et al., 2009) using a 16S rRNA gene cloning library, and it has been also isolated from other hydrogen-producing reactors (Chien et al., 2004). The presence of these organisms could contribute to the stability of the process and may also be responsible for the low yield detected in some reactors (Etchebehere et al., 2016).

Other organisms that are unable to produce hydrogen were also detected in both samples taken from the reactor. These microorganisms may compete for the substrate, reducing the efficiency of the process. However, their presence could also have a positive effect, helping the growth in the hydrogen-producing reactors. According to Hung et al., *Bifidobacterium sp.* breaks down starch into small molecules first and the simplified organic compounds could be used by *Clostridium* species for hydrogen production (Hung et al., 2011).

Strains isolated only under aerobic conditions were classified into the genera *Acetobacter*, *Micrococcus*, *Chryseobacterium*, and *Pseudoclavibacter*. Among these, *Acetobacter* and *Chryseobacterium* were previously reported in hydrogen-producing reactors (Chang et al., 2008; Castelló et al., 2011).

#### 4.4 Interaction between the different strains

Another advantage of the isolation techniques is the possibility to use the isolates in an artificially constructed inoculum. To determine the possible interaction between the *Lactobacillus* and *Clostridium* strains, co-cultures were performed. The results indicate that *Lactobacillus sp.* strain M15 completely inhibited hydrogen production by *Clostridium sp.* strain RT3. However, when the *Megasphaera sp.* strain PR2AD2 was incorporated, the inhibition was not complete and hydrogen production was detected. Onishi et al. (2010) reported a high

production of hydrogen in a reactor with a co-dominance of *Lactobacillus* and *Megasphaera*. The authors explained that the lactic acid produced by the *Lactobacillus* strain was likely consumed by the *Megasphaera* strain, improving hydrogen production. These results will allow progress in the synthesis of defined inocula for stable hydrogen production using industrial effluents.

Currently, although a culture-dependent method would not be practical to use in the analysis of the microbial communities' compositions, it is a useful tool for understanding the different roles of microorganism in bioreactors. Moreover, the isolates can be used to construct artificial consortia to inoculate reactors. Ueno et al. highlighted the importance of co-cultures in obtaining hydrogen gas with high efficiency (Ueno et al., 2001). Thus, physiological studies of hydrogen-producing microorganisms are important for the development of a stable process for hydrogen production by anaerobic microflora.

This work shows the high culturability of the microbial communities from hydrogen-producing bioreactors. The methods used successfully isolated the predominant microorganisms in this ecosystem. More than 88% of the abundance detected using the pyrosequencing analysis was represented in the isolates. It was possible to capture a high proportion of the diversity using the method of direct isolation in PYG agar plates incubated under anaerobic and aerobic conditions. These are simple methods that can be applied in any microbiology laboratory. Based on the results obtained, a work scheme was proposed to isolate the predominant microorganism from hydrogen-producing reactors (Fig 4). The tests performed with the isolates demonstrated that although the isolate from the *Clostridium* genus presents the highest yield in PYG, isolates belonging to the *Rahnella* and *Megasphaera* genera might be more important when using cheese whey as substrate. The inclusion of *Megasphaera* in the consortium partially avoids the inhibition of *Clostridium* by lactic acid bacteria. These isolates could be further used to design artificial consortia to improve hydrogen production. This consortium could reduce COD and consequently the pollutant capacity of the waste.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This research was supported by the project grants ANII FSE 2011-6437 and ANII FSE 2014-102488. L.F. was funded by ANII (Masters and PhD thesis grant). We thank Dr. Angela Cabezas for performing the suggestions and corrections.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

None declared.



## REFERENCES

- Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59 (1):143-169.
- Benzano, F., Emmer, V. and González, M.J. (2016) Proyecto biovalor. Cuantificación de residuos generados en sectores agroindustriales del Uruguay. <http://biovalor.gub.uy/documents/20182/22680/Cuantificaci%C3%B3n+de+residuos+s%C3%B3lidos/646a751a-4cab-49c2-9901-9cc309dce637> [accessed 17.03.07]
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. and Cogan, T.M. (2001) Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* 11(4):259-274.
- Bergey, D.H., Whitman, W.B., De, V.P, Garrity, G.M. and Jones, D. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol. 3*. New York: Springer.
- Bhatia, S.J., Kochar, N., Abraham, P., Nair, N.G. and Mehta, A.P. (1989) Lactobacillus acidophilus inhibits growth of Campylobacter pylori in vitro. *J Clin Microbiol* 27(10):2328-2330.
- Braga, L., Castelló, E., Fuentes, L., Borzacconi, L. and Etchebehere, C. (2015) H<sub>2</sub> production from cheese whey in a CSTR reactor. Possible causes for the decrease in H<sub>2</sub> along time. 14th *World Congr Anaerob Digestion*.
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J.P., Ruiz-Filippi, G. and Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. *Fems Microb Rev*, 41(2), 158-181.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer N., Peña A.G., et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7(5):335-336.
- Carrillo-Reyes, J., Celis, L.B., Alatraste-Mondragón, F. and Razo-Flores, E. (2014) Decreasing methane production in hydrogenogenic UASB reactors fed with cheese whey. *Biomass Bio-energy* 63:101-108.
- Carvalho, F., Prazeres, A.R. and Rivas, J. (2013) Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci Total Environ* 445:385-396.
- Castelló E., Perna, V., Wenzel, J., Borzacchini, L. and 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 Sci and Technol* 64(11):2265-2273.
- Castelló, E., Santos, C.G., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L. and Etchebehere C. (2009) Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *Int J Hydrogen Energy* 34(14):5674-5682.

- Castelló, E., Braga, L., Fuentes, L., and Etchebehere, C. (2018). Possible causes for the instability in the H<sub>2</sub> production from cheese whey in a CSTR. *Int J Hydrogen Energy*. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.12.104
- Chang, J.J., Wu, J.H., Wen, F.S., Hung, K.Y., Chen, Y.T., Hsiao, C.L., Lin, C.Y. and Huang, C.C. (2008) Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen-producing system with different hydraulic retention time. *Int J Hydrogen Energy* 33(5):1579-1585.
- Chien, C.H., Tseng, C., Wu, W.L., Chang, C.Y., Shih, T.Y. and Liu, Y.F. (2004) Molecular biological detection and characterization of hydrogen producing community in the bio-hydrogen reactors. *Environ Biotechnol: Adv Water Wastewater Appl Tropics* 357.
- Chojnacka, A., Błaszczak, M. K., Szczęsny, P., Nowak, K., Sumińska, M., Tomczyk-Żak, K., Zielenkiewicz, U., et al. (2011). Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. *Biores technol*, 102(21), 10057-10064.
- Dębowski, M., Korzeniewska, E., Filipkowska, Z., Zieliński, M. and Kwiatkowski R. (2014) Possibility of hydrogen production during cheese whey fermentation process by different strains of psychrophilic bacteria. *Int J Hydrogen Energy* 39(5):1972-1978.
- Delgado, S., Rachid, C.T., Fernández, E., Rychlik, T., Alegría, Á., Peixoto, R.S. and Mayo, B. (2013) Diversity of thermophilic bacteria in raw, pasteurized and selectively-cultured milk, as assessed by culturing, PCR-DGGE and pyrosequencing. *Food Microbiol* 36(1):103-111.
- Doetsch, R.N. (1981) Determinative methods of light microscopy. Manual of methods for general bacteriology. *Am Soc form Microbiol* 21-33.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. and Rousselier, P. (2001) Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 51 (3):925-932.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G. and El Nagggar, M.H. (2013) A critical literature re-view on biohydrogen production by pure cultures. *Int J Hydrogen Energy* 38(12):4945-4966.
- Etchebehere, C., Castelló, E., Wenzel, J., Del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., Cabrol, L., Carminato V.M., et al. (2016) Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Appl Microbiol and Biotechnol* 100(7):3371-3384.

- Gomes, B.C., Rosa, P.R.F., Etchebehere, C., Silva, E.L. and AmâncioVaresche, M.B. (2015) Role of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria on hydrogen-producing reactors operated with cheese whey wastewater. *Int J Hydrogen Energy* 40(28):8650-8660.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontología Electronica* 4(1): 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Hung, C.H., Chang, Y.T. and Chang, Y.J. (2011) Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems a review. *Bioresour Technol* 102(18):8437-8444
- Hung, C.H., Lee, K.S., Cheng, L.H., Huang, Y.H., Lin, P.J. and 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. *Appl Microbiol Biotechnol* 75(3):693-701.
- Hungate, R.E. and Macy, J. (1973) The roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. *Bulletins Ecol Res Comm* 123-126.
- Kooker, J.M., Fox, K.F. and Fox, A. (2012). Characterization of *Micrococcus strains* isolated from indoor air. *Mol Cell Probes*, 26(1), 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.09.003>
- Liu, T., Li, Y., Chen, J., Sadiq, F.A., Zhang, G., Li, Y. and He, G. (2016) Prevalence and diversity of lactic acid bacteria in Chinese traditional sourdough revealed by culture dependent and pyrosequencing approaches. *LWT-Food Sci Technol* 68:91-97.
- Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W.E. and Burton, A.L. (1960) Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal Biochem* 1(2):127-132.
- Nocker, A., Cheung, C. and Camper, A.K. (2006) Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 67:310-320.
- Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N. and Suzuki, M. (2010) Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *Int J Hydrogen Energy* 35(16):8544-8553.
- Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Lima, D.F., Borzacconi, L., Varesche, M., Zaiat, M., et al. (2013) Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int J Hydrogen Energy* 38(1):54-62.

- Poleto, L., Souza, P., Magrini, F.E., Beal, L.L., Torres, A.P.R., de Sousa, M.P., Laurino, J.P and Paesi, S. (2016). Selection and identification of microorganisms present in the treatment of wastewater and activated sludge to produce biohydrogen from glycerol. *Int J Hydrogen Energy*, 41(7), 4374-4381.
- Porwal, S., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., Purohit H.J., Sharma R., et al. (2008). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Biores Technol*, 99(13), 5444-5451
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Latrille, E., Steyer, J.P. and Trably, E. (2010) Development and application of a functional CE-SSCP fingerprinting method based on [Fe–Fe]-hydrogenase genes for monitoring hydrogen-producing *Clostridium* in mixed cultures. *Int J Hydrogen En-ergy* 35(24):13158-13167.
- Radke-Mitchell, L.C and Sandine, W.E. (1986) Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Dairy Sci* 69(10):2558-2568.
- Russell, J.B and Dombrowski, D.B. (1980) Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 39(3):604-610.
- Sim, K., Cox, M.J., Wopereis, H., Martin, R., Knol, J., Li, M.S., Cookson, W.O.C.M., Moffatt, M.F., et al. (2012) Improved detection of bifidobacteria with optimised 16S rRNA-gene based pyrosequencing. *PLoS One* 7, 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0032543
- Strobel H.J. (2009) Basic Laboratory Culture Methods for Anaerobic Bacteria. In: Mielenz J. (eds) *Biofuels. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 581:247-61. Humana Press, Totowa, NJ. DOI10.1007/978-1-60761-214-8\_1
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biol Evol* 28(10): 2731-2739.
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M. and Igarashi Y. (2001) Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:555e62.
- Viderola, C.G. and Reinheimer, J.A. (2000) Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *Int Dairy J* 10:271–275.
- Wang, X., Hoefel, D., Saint, C.P., Monis, P.T., Jin, B. (2007) The isolation and microbial community analysis of hydrogen producing bacteria from activated sludge. *J Appl Microbiol* 103:1415e23.
- Ward D.M., Weller, R. and Bateson, M.M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous un-cultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345(6270):63

Won, S.G., Baldwin, S.A., Lau, A.K. and Rezadehbashi, M. (2013) Optimal operational conditions for biohydrogen production from sugar refinery wastewater in an ASBR. *Int J Hydro-gen Energy* 38:13895–13906.

## SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Classification of representative sequences of the OTUs and comparison of the results obtained in the same samples by culturing

OTU code	No. of reads		Classification of the OTU	Sample in which strains with high sequence similarity with the OTU sequence were isolated
	Sample 1	Sample 2		
OTU 0	29	2932	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2
OTU 6	1	23	<i>Chryseobacterium</i> sp.	1
OTU 14	0	26	<i>Lactobacillus harbinensis</i> sp.	2
OTU 31	0	132	<i>Acetobacter</i> sp.	1
OTU 38	0	14	<i>Megasphaera</i> sp.	2
OTU 39	73	105	Bifidobacteriaceae	2
OTU 45	43	3220	Lactobacillales	1 and 2
OTU 46	0	595	Enterobacteriaceae	2
OTU 47	0	3	<i>Propionibacterium</i> sp	1
OTU 52	6051	23	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	2
OTU 53	523	26	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	2
OTU 61	0	3	<i>Pseudoclavibacter soli</i>	2
OTU 62	7	231	<i>Clostridium tyrobutiricum</i>	1 and 2
OTU 63	4	125	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	2
OTU 76	22	157	<i>Lactobacillus</i> sp.	1 and 2
OTU 105	2	3	<i>Rahnella aquatilis</i>	2
OTU 107	0	1	<i>Rahnella aquatilis</i>	2
OTU 124	10	2931	<i>Clostridium tyrobutiricum</i>	1 and 2
OTU 143	0	2	<i>Rahnella aquatilis</i>	2
OTU 153	0	9	<i>Rahnella aquatilis</i>	2
OTU 156	23	1	<i>Lactobacillus</i> sp.	1 and 2
OTU 158	0	289	Bifidobacteriaceae	2
OTU 180	0	37	<i>Megasphaera</i> sp.	2
OTU 196	41	3	<i>Lactobacillus</i> sp.	1 and 2
OTU 197	0	5	Propionibacteriaceae	1
OTU 219	102	1575	<i>Acetobacter</i> sp.	1

## **Trabajo 2. Knowing the enemy: homoacetogens in hydrogen production reactors**

### **Objetivos específicos abarcados en este capítulo**

En el siguiente trabajo titulado se presentan los resultados para cumplir el objetivo específico 4. Se estudió la comunidad homoacetogénica de 19 reactores de producción de H<sub>2</sub> operados en Chile, México y Uruguay. Es un trabajo en colaboración realizado en el marco de la Red Latinoamericana de Hidrógeno. Se abordan varias técnicas para el estudio de estos microorganismos como la secuenciación masiva y qPCR del gen funcional de *fthfs*. También se aplica la qPCR del gen *hydA* para cuantificar la población de microorganismos productores de hidrógeno. Con los datos obtenidos se realizaron comparaciones con los parámetros operacionales de los reactores. En el siguiente artículo se detallan los materiales y métodos, resultado, discusión y conclusión de los resultados obtenidos. Asimismo, en el Anexo 1 se detalla la puesta a punto de la técnica de qPCR para la amplificación del gen de la *fthfs*.

### **Contribución del autor de la tesis**

La contribución del autor en este trabajo fue la puesta a punto de los métodos de qPCR y secuenciación masiva del gen *fthfs* y la aplicación de estos métodos a las muestras de los reactores. Los co-autores de Uruguay (Lucía Braga, Elena Castelló), y de Chile (Alejandra Vesga, Estela Tapia-Venegas) operaron los reactores proporcionando las muestras y los datos de los reactores de Uruguay y Chile. Los co-autores de México (Dr. Rodolfo Palomo-Briones, José de Jesús Montoya-Rosales y Elías Razo-Flores) proporcionaron las muestras de los reactores de México y además realizaron los estudios estadísticos de los datos. El trabajo fue dirigido por la Dra. Etchebere. El manuscrito fue escrito por la autora en el marco de esta Tesis bajo la supervisión de la Dra. Etchebere y con la colaboración de los co-autores de México. El trabajo está en proceso de corrección por los co-autores para ser enviado a publicar.

## **Knowing the enemy: homoacetogens in hydrogen production reactors**

Laura Fuentes<sup>1</sup>, Rodolfo Palomo-Briones<sup>2</sup>, José de Jesús Montoya-Rosales<sup>2</sup>, Lucía Braga<sup>3</sup>, Elena Castelló<sup>3</sup>, Alejandra Vesga<sup>4</sup>, Estela Tapia-Venegas<sup>4</sup>, Elías Razo-Flores<sup>2</sup>, Claudia Etchebehere<sup>1</sup>

- (1) Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Av. Italia, 3318, Montevideo, Uruguay
- (2) División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., Camino a la Presa San José No. 2055, Col. Lomas 4a Sección, C.P. 78216, San Luis Potosí, SLP, México
- (3) BioProA Laboratory, Chemical Engineering Institute, Engineering Faculty, University of the Republic, Herrera y Reissig, 565, Montevideo, Uruguay
- (4) Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Av. Brasil 2085, Valparaíso, Chile.

*Trabajo a publicar...*

\*Correspondence to: Claudia Etchebehere, Microbial Ecology Laboratory, Clemente Estable Biological Institute, Ministry of Education, Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay; phone: +59824871616; fax: +59824875461; E-mail: [cetchebehere@iibce.edu.uy](mailto:cetchebehere@iibce.edu.uy); Webpage: [www.iibce.edu.uy](http://www.iibce.edu.uy)



## Abstract

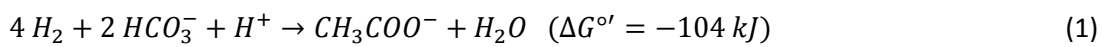
Hydrogen (H<sub>2</sub>) production through dark fermentation has been largely referred as a potential alternative for the replacement of fossil fuels. Nevertheless, it has been reported that the efficiency of the process is limited by the presence of detrimental metabolisms such as homoacetogenesis, where H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are consumed to form acetate. In this work, the gene encoding for the formyltetrahydrofolate synthetase (*fthfs*) was used to investigate the diversity of homoacetogens as well as their phylogenetic relationships through quantitative-PCR and next-generation amplicon sequencing. A total of 70 samples from 19 different H<sub>2</sub>-producing bioreactors with different configurations and operating conditions were analyzed. The abundance of the *fthfs* and hydrogenase (*hyd*) genes was dependent on the type of substrate, being systems fed with glycerol the highest number of *fthfs* gene copies. Massive sequencing revealed homoacetogens diversity was quite low across all samples investigated. In systems fed with glucose *Acetobacterium woodii* was predominant. Systems fed with cheese whey powder resulted in the codominance of *Blautia coccooides* and unclassified species within *Sporoanaerobacter*. In systems fed with glycerol *Eubacterium limosum* and *Selenomonas* sp. were dominant. Two phenomena around homoacetogenesis can be mentioned 1) a metabolic change in the same group of microorganisms or 2) a change in the microbial community in which a homoacetogenic microorganism could displace a H<sub>2</sub>-producing microorganism. These population dynamics were influenced by the inoculum used, the substrate and the operating conditions. *fthfs* gene would be a good marker to detect homoacetogenesis in an H<sub>2</sub>-producing reactors.

**Keywords:** Biohydrogen, Homoacetogenesis, Formyltetrahydrofolate synthetase, quantitative-PCR, amplicon sequencing.

## 1. Introduction

H<sub>2</sub> is considered as the best option for clean and sustainable energy (Acar, and Dincer, 2019). H<sub>2</sub> can be produced through dark fermentation which is carried out by anaerobic microorganisms that consume organic matter to produce H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and short chain carboxylic acids (e.g. acetate and butyrate). Nevertheless, H<sub>2</sub> yields and productivities are hindered by the persistence of metabolic pathways that either compete for the substrate or consume H<sub>2</sub> produced, including methanogenesis, lactic acid fermentation, and homoacetogenesis (Castelló et al., 2020).

Homoacetogenesis is a biological process where H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are consumed to form acetate through the Wood-Ljungdahl pathway (WLP) according to equation 1 (Drake et al. 2008):



In recent years, homoacetogens have been identified as the main concern in H<sub>2</sub>-producing systems. Different studies have estimated that they account for 27-57 % of total acetate observed (Arooj et al., 2008b; Luo et al., 2010). Different approaches have been followed in order to reduce the effects of homoacetogenesis in H<sub>2</sub> production, including the operation at thermophilic temperatures, the decrease of dissolved H<sub>2</sub> concentration, and alkaline fermentation. It has been reported that the homoacetogenesis presents product inhibition by the accumulation of acetate (Dinamarca et al., 2011). The operating temperature of the reactor influences the kinetics of the processes involved and the solubility of gases. At higher temperatures, the solubility of gases is lower thus decreasing the availability of H<sub>2</sub> for homoacetogenic bacteria but, on the other hand, the reaction will be faster so there are two competing phenomena (Saady, 2013). Wan et al., (2016) reported that, thermophilic, anaerobic alkaline fermentation (55 °C and pH 10), for the long term could inhibit of homoacetogenesis and increase the H<sub>2</sub> production from waste activated sludge (Wan et al., 2016). In a study carried out by Buitrón et al., 2019, it was observed that homoacetogenic activity could be reduced through headspace recirculation at gas upflow velocities higher than 17.8md<sup>-1</sup> with a decreased of 70% in hydrogen consumption by homoacetogenesis in a CSTR reactor fed with winery effluents (Buitron et al., 2019). The main difficulty in controlling homoacetogenesis is that, unlike the methanogens, many of the homoacetogenic microorganisms are H<sub>2</sub> producers and some of them are sporulated and can resist heat treatments and extreme pH conditions (Buitrón et al., 2019).

Although the importance of homoacetogenesis in hydrogen producing process by dark fermentation, little is known about the microorganisms involved. Therefore, a better

characterization of homoacetogens and their role in H<sub>2</sub> producing systems is required. 16S rRNA-based methods have been successfully used to characterize microbial communities in H<sub>2</sub> production (Carrillo-Reyes et al., 2014; Etchebehere et al., 2016; Fuentes et al., 2018). However, the use of the 16S rRNA gene to characterize homoacetogens is not the best alternative due that homoacetogens do not form a mono-phylogenetic group. They are a functional group spread in different genera and families. Therefore, identifying and targeting specific genes among homoacetogens is necessary. In this regard, certain genes encoding WLP enzymes, such as formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS), have been identified as potential markers for homoacetogens (Henderson, 2010). The FTHFS enzyme catalyzes the ATP-dependent activation of formate in the acetyl-CoA pathway of acetogenesis (Lovell et al., 1990).

Different set of primers have been previously used for the study of homoacetogens (Leaphart and Lovell (2001) Xu et al. (2009)) designed and tested primers for PCR amplification of the *fthfs* gene achieving a considerable potential for environmental applications. These primers can be used for homoacetogens quantification using qPCR. However, the simple use of qPCR is not enough for characterizing the composition of homoacetogens in dark fermentation.

Massive parallel sequencing allows the study the microbial community by using one or a few phylogenetic marker genes being a cost-effective culture-independent method. The most commonly used phylogenetic marker is 16S rRNA gene (Kulski, 2016). However, it could be also used specific gene markers such as *fthfs* gene. To date only Sight et al., (2020) have reported high-throughput sequencing *fthfs* gene to determine homoacetogenic community structure in an anaerobic methanogenic digester treating food waste.

The aim of this work was to evaluate the prevalence and taxonomic composition of homoacetogens in H<sub>2</sub>-producing reactors fed with different substrates and operated at different conditions. In the frame of the Latin America Biohydrogen Network, samples were taken from lab scale reactors operated in different laboratories from Mexico, Chile and Uruguay. qPCR and massive parallel sequencing of the *fthfs* gene amplicons were used. The novel use of both techniques together allowed us to better understand the behavior of homoacetogenesis in dark fermentative systems. A link between the microbial composition and operational data was performed in order to determine the conditions that favored the homoacetogenesis in H<sub>2</sub>-producing reactors.

## 2. *Material and methods*

### 2.1 *Selection of H<sub>2</sub>-producing reactors: experimental conditions and monitoring*

*General description of samples collected.* To evaluate the prevalence of homoacetogenesis in H<sub>2</sub>-producing reactors and its relationships with operating conditions and H<sub>2</sub> production performance, a total of 70 samples from 19 H<sub>2</sub>-producing continuous reactors operated in laboratories in Chile, Mexico and Uruguay were used. The complete list of systems, as well as their operation conditions and performance, is shown in Table 1. For identification purposes, a specific ID was assigned to each of the samples under study; the ID includes information about the country where the system was operated as well as the consecutive number of reactors and sample.

The reactors were fed with agave enzymatic hydrolysates of lignocellulosic biomass (4 reactors, 28 samples), cheese whey (1 reactor, 10 samples), glucose (3 reactors, 15 samples) and glycerol (11 reactors, 17 samples). The experimental conditions of the reactors used in our study will be briefly explained in the following paragraphs.

#### *Experiment 1-Different reactor configuration (TBR and CSTR) using enzymatic hydrolysates of agave bagasse*

*Reactors fed with hydrolysates.* Reactors MX-R1 to MX-R4 were fed with enzymatic hydrolysates of agave bagasse at organic loading rate (OLR) ranging from 43 to 100 g COD/L-d.

*TBR fed with hydrolysates.* The reactor MX-R1 was a trickling-bed reactor (TBR) fed with hydrolysates prepared with the commercial enzyme Stonezyme, where H<sub>2</sub> production is driven by biofilms rather than suspended cultures as it occurs in CSTR. The operating conditions were identical to mesophilic CSTR systems fed with hydrolysates, with pH, temperature and hydraulic retention time (HRT) automatically controlled at 5.9, 37 °C and 6 h, respectively. The experiment was carried out with the aim of evaluate the production of H<sub>2</sub> in a fixed biomass reactor and compare its results with CSTR systems.

*Mesophilic CSTR fed with hydrolysates.* MX-R2 and MX-R4 were continuous stirred-tank reactor (CSTR) systems fed with hydrolysates prepared with commercial enzymes, Cellulase 50XL (ENZQUIM, Ciudad de Mexico, Mexico) and Stonezyme (Banner Química S.A de C.V., Estado de Mexico, Mexico) (Montoya-Rosales et al. 2019; Valencia-Ojeda et al. 2020). These reactors were operated with pH, temperature and hydraulic retention time (HRT) automatically controlled at 5.9, 37 °C and 6 h, respectively. The aim of these studies was to evaluate different types of

enzymatic agave bagasse hydrolysates in the production of H<sub>2</sub> in a suspended biomass reactor.

*Thermophilic CSTR fed with hydrolysates.* The reactor MX-R3 was a CSTR fed with hydrolysates prepared with Celluclast 1.5 L-Viscozyme (Novozymes, Bagsværd, Denmark) at OLR of 5-46 g COD/L-d. This system was operated at thermophilic conditions (55 °C), pH of 5.5 and HRT values in the range of 15 to 63 h (Montiel-Corona et al., 2020). The aim of this investigation was to evaluate two types of inoculum and their effect on the thermophilic H<sub>2</sub> production and microbial communities; however, in the present research we considered only the system inoculated with thermophilic origin inoculum.

#### *Experiment 2. H<sub>2</sub> production system with biomass recycling*

*Reactor fed with cheese whey.* The reactor with ID:MX-R5 was CSTR with intermittent biomass recycling (Montoya-Rosales et al. 2020). It was fed with cheese whey powder at OLR of 191-220 g COD/L-d. HRT, temperature and pH were automatically controlled at 6 h, 37 °C and 5.9, respectively. In brief, the operation of this reactor consisted in intercalated stages where biomass was either at basal concentrations or “increased” concentrations by means of biomass recycling. This study aimed to evaluate a novel strategy for controlling the biomass concentration and its relationship with H<sub>2</sub>-producing performance.

#### *Experiment 3. Effect of HRT using glucose as substrate*

*Description of reactors fed with glucose.* Samples identified as UY-R1, UY-R2, and UY-R3, were obtained from a CSTR (3 L working volume) fed with glucose at an OLR of 30 g COD/L-d. These were operated at HRT values of 6 h (UY-R2), 10 h (UY-R1) and 24 h (UY-R3). Each reactor was operated at least 20 HRT (e.g. 120 h at HRT of 6 h). The aim of this experiment was to evaluate the impact of HRT on H<sub>2</sub> production performance and metabolic pathways. Details are found in supplementary material.

#### *Experiment 4- Effect of HRT and pH using glycerol*

*Description of reactors fed with glycerol.* Samples identified as CL-R1 to CL-R5 were obtained from eleven CSTR (2 L working volume at 37 °C) systems fed with glycerol at OLR of 24-37 g COD/L-d, pH of 5.5-6.5, and HRT values of 8, 10 and 12 h (Silva-Illanes et al., 2017). Operation details are in supplementary material.

#### *Experiment 5- Effect of ORP control*

*Description of reactors fed with glycerol.* Samples CL-R6 to CL-R11 were taken from a CSTR

operated at different oxidation-reduction potential (ORP). Two chemical products (oxidant reagents) were used to modify and control the ORP value: potassium ferricyanide ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) (samples CL R6-R8) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (samples CL R9-R11). Three different ranges were investigated: -480 to -500 mV (CL R6, CL R9), -505 to -525 mV (CL R7, CL R10) and -530 to -550 mV (CL R8, CL R11). Details are found in supplementary material.

## *2.2 Source of inoculum in systems under study*

Mesophilic systems fed with cheese whey powder and hydrolysates of agave bagasse (MX-R1, MX-R2, MX-R4 and MX-R5) were all inoculated with heat-treated anaerobic sludge obtained from a full-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor treating tequila vinasses (Casa Herradura, Mexico). The thermophilic system fed with lignocellulose hydrolysate (MX-R3) was inoculated with a thermophilic-origin inoculum (TOI) from an anaerobic thermophilic reactor (55 °C) used for the digestion of purge sludge of an aerobic wastewater treatment plant (Querétaro, México).

Systems fed with glucose (UY reactors) were inoculated with heat-treated anaerobic sludge from a full-scale UASB treating dairy wastewater. Finally, systems fed with glycerol (CL reactors) were inoculated with activated sludge from a domestic wastewater treatment plant (La Farfana, Santiago de Chile) previously treated by aeration as described by Silva-Illanes et al., (2017).

## *2.3 Volumetric $H_2$ production rate and other key indicators of $H_2$ production performance*

A series of relevant parameters and response variables were determined for each of the samples described in the previous section. For samples obtained from reactors CL R1-R5 and MX R1-R5, the required parameters and response variables were gathered from already published articles (Silva-Illanes et al. 2017; Montiel Corona and Razo-Flores 2018; Montoya-Rosales et al. 2019; Montoya-Rosales et al. 2020).

For samples obtained from reactors UY R1-R3, volumetric  $H_2$  production rate (VHPR) was determined as described elsewhere (Castelló et al., 2009), the concentration of acetate and butyrate was determined by gas chromatography (GC-14B Shimadzu, Japan), while lactate was determined by high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu, detectors RID-10A and SPD-20 A), following the methodology described by Castelló et al. (2018). Finally, the determination of chemical oxygen demand and suspended solids was performed in accordance to the standard methods (APHA/AWWA/WEF 2012).

For samples obtained from reactors CL R6-R11, glycerol and metabolites such as volatile fatty

acids (VFA), ethanol, and 1,3-propanediol were quantified using HPLC according to Silva-Illanes et al., 2017.

Table 1. Bio Hydrogen reactors and their operating conditions

Country	Reactor	Aim of the study	Substrate	Reactor configuration	OLR (g COD/L-d)	H <sub>2</sub> yield (LH <sub>2</sub> /gCODfed)	Sample ID
Mexico	R1	Effect of OLR and different enzymatic hydrolysis process using agave wastes ( <i>Experiment 1</i> )	Agave hydrolyzates	TBR	43.2-81	0.024-0.028	MX R1-1 to MX R1-6
	R2			CSTR	44-100	0.016-0.028	MX R2-1 to MX R2-6
	R3				5-46	0.010-0.090	MX R3-2 to MX R3-10
	R4				44-120	0.061-0.099	MX R4-1 to MX R4-8
	R5	Biomass control ( <i>Experiment 2</i> )	Cheese whey		124-220	0.063-0.153	MX R5-1 to MX R5-10
Uruguay	R1	Effect of HRT ( <i>Experiment 3</i> )	Glucose	CSTR	30	0.047-0.242	UY R1-1 to UY R1-5
	R2				30	0.020-0.075	UY R2-1 to UY R2-5
	R3				30	0-0.417	UY R3-1 to UY R3-8
Chile	R1	Effect of the HRT and pH ( <i>Experiment 4</i> )	Glycerol	CSTR	37	0.036	CL R1-1
	R2				37	0.047	CL R2-1
	R3				29	0.051	CL R3-1
	R4				24	0.124	CL R4-1
	R5				24	0.011	CL R5-1
	R6	Effect of adding different ORP control agents ( <i>Experiment 5</i> )			24.9	0.0292-0.0337	CL R6-1 and CL R6-2
	R7				24.9	0.0449-0.034	CL R7-1 and CL R7-2
	R8				24.9	0.0756-0.036	CL R8-1 and CL R8-2
	R9				24.9	0.0323-0.0345	CL R9-1 and CL R9-2
	R10				24.9	0.0327-0.0405	CL R10-1 and CL R10-2
	R11				24.9	0.035-0.106	CL 11-1 and CL 11-2

#### 2.4 Sampling and DNA extraction

Samples were taken from the biomass of the reactors operated in the different conditions. Biomass was separated by centrifugation at 10,000 rpm during 5 min. The resulting pellets were stored at -20°C until their use. In samples from reactors MX R1-R5 and UY R1-R3, genomic DNA was extracted with the Quick-DNA Fecal/Soil Microbe (Zymo Research, CA, USA) extraction kit following the manufacturer's instructions. In samples from reactors CL R1-R11, DNA was extracted using the PowerSoil DNA isolation kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

#### 2.5 Quantification of homoacetogens by qPCR

To quantify the proportion of homoacetogenic microorganisms across the different conditions/reactors investigated, the copy number of the *fhfs* gene was determined through qPCR. The primers FTHFS-f (5'-TTY ACW GGH GAY TTC CAT GC-3') and FTHFS-r (5'-GTA TTG DGT

YTT RGC CAT ACA) were used (Leaphart and Lovell 2001). These were synthesized at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The qPCR reaction was performed in a final volume of 25  $\mu$ L containing 12.5  $\mu$ L master mix (Rotor-Gene SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit, Qiagen, Germany), 1  $\mu$ L of each primer 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ L DNA sample (between 5 ng/ $\mu$ L and 50 ng/ $\mu$ L), and 5.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. The qPCR program and melting curve was performed according to Xu et al., (2009). DNA samples from two non-homoacetogenic strains (*Pseudomonas* sp. and *Raoultella* sp. both isolated in our laboratory) were used as negative controls.

To construct the calibration curve, a homoacetogenic strain: *Acetobacter woodii* DSMZ 1030 (Balch et al., 1977), was used. A culture of the strain was performed in liquid media (media 135 *A. woodii* DSMZ 1030) (Egli et al., 1988), the culture was incubated at 30°C. DNA was extracted from the liquid culture with the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, CA, USA) extraction kit following the manufacturer's instructions. *fthfs* gene was amplified using the primers reported by Leaphart and Lovell (2001) and the PCR program used by Xu et al. (2009). The size of the amplicon was determined in agarose gel electrophoresis. The PCR product (1.1 kb) was ligated to the TOPO-3.9kb vector (Invitrogen, CA, USA) following the manufacturer's instructions. *E. coli* TOP 10 strain cells were transformed with de ligation by heat shock. The plasmid with the insert was extracted according to Engebrecht et al., (1991). The calibration curve was then constructed using successive dilutions (1:10) of this plasmid extraction. All reactions were made by triplicate. The results were expressed in copy number/ng DNA. The standard curve presented a value of efficiency of 0.90 and R<sup>2</sup> of 0.99. DNA was quantified with NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis (Thermo Scientific)

### 2.6 qPCR Fe-Fe hydrogenase gene

To quantify H<sub>2</sub>-producing bacteria, the copy number of Fe-hydrogenase (*hydA*) gene was determined by qPCR according to Perna et al. (2013). This enzyme catalyzes the reversible oxidation of molecular H<sub>2</sub> (Fang et al., 2006). To construct the standard curve, the clone of the hydrogenase enzyme gene A10 was used (Perna et al., 2013). The standards were prepared by making successive dilutions 1:10. All reactions were made by triplicate. The results were expressed in copy number/ng DNA. The standard curve presented a value of efficiency of 0.91 and R<sup>2</sup> of 0.98. DNA was quantified with NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 UV-Vis (Thermo Scientific).

### 2.7 Homoacetogenic community composition studied by *fthfs* gene amplicon sequencing

Homoacetogenic community composition was studied by sequencing the *fthfs* gene. For this objective, ten samples were selected, namely MX R1-1, MX R2-6, MX R3-9, MX R4-7, MX R5-1,



UY R1-1, UY R2-1, UY R3-3, CL R1-1 and CL R6-1. The selection of these samples was based on the different operating conditions and the quantification of copy number of *fthfs* genes/ngDNA from the qPCR (samples with the highest values were selected).

Prior to sequencing, a nested PCR was performed to increase PCR specificity and obtain an adequate fragment size (<400bp) to sequence in Ion Torrent platform. The first PCR was performed using the primers FTHFS-f and FTHFS-r (Leaphart and Lovell 2001) following the PCR program reported by Xu et al. (2009). The resulting amplicon (1.1 kb) was recovered and purified using the Zymoclean™ Gel DNA recovery kit (Zymo Research, CA, USA) following the manufacturer's instructions. 2µL of PCR product was used to perform a second PCR using the fhs1 (5'-GTW TGG GCW AAR GGY GGM GAA GG- 3') (forward primer) and FTHFS-r (reverse primer), following the PCR program reported by Xu et al. (2009). The resulting amplicon (250 bp) was recovered and purified using the Zymoclean™ Gel DNA recovery kit. Sequencing of the *fthfs* gene amplicon was carried out on the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Montevideo, Uruguay). The sequencing analysis was performed with QIIME (Caporaso et al. 2010). All sequence reads were sorted out based on their unique barcodes. It was filtered the low-quality reads (coefficient >25), trimmed the primers, adapters and barcodes, and filtered reads with a length of <200 bases. The chimeras and noise in the sequencing reads were further removed. Sequences were clustered into operational taxonomic units (OTU) using the UClust algorithm (Edgar 2010), based on the 97% identity threshold (de novo-based OTU picking strategy). OTUs represented by one sequence (singletons) were removed from the analysis. For sequence classification analysis, only those OTUs sequences which had a relative abundance greater than 1% in any of the ten samples were selected to analyze by the Basic Local Alignment Search Tool searching protein databases using a translated nucleotide query (BLASTx). The raw data were deposited at National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the BioProject: PRJNA659251

### 3. Results

#### 3.1 Summary of reactors performance

In this research, 19 different lab-scale reactors for H<sub>2</sub> production located in Chile, Mexico and Uruguay were investigated. In particular, three different reactors configuration were evaluated: CSTR, CSTR with biomass recycling, and TBR. These reactors were fed with different substrates, including glucose, cheese whey powder, glycerol and enzymatic hydrolysates of agave bagasse.

An overview of H<sub>2</sub> production performance from reactors studied in this research is shown in

Figure 1. In general, the VHPR was clearly linked with the increase of OLR ( $r = 0.696$ ,  $p < 0.05$ ) (Figure 1-A), while the relationship between H<sub>2</sub> yield and OLR was less evident ( $r = 0.199$ ,  $p = 0.10$ ) (Figure 1-B). A maximum VHPR value of 30.8 L H<sub>2</sub>/L-d was observed in the CSTR system fed with cheese whey with biomass recycling. On the contrary, the lowest VHPR values among systems reviewed were obtained with glucose (~ 0.00 L H<sub>2</sub>/L-d) and glycerol (0.19 L H<sub>2</sub>/L-d).

However, OLR beyond 50 g COD/L-d were not used in the reactors fed with glucose and glycerol. In regard with the H<sub>2</sub> yield, the systems with the highest value were also those fed with glucose and cheese whey (0.42 and 0.16 L H<sub>2</sub>/g COD respectively), while other substrates remained at values below 0.10 L H<sub>2</sub>/g COD.

In most of reviewed systems, acetate, butyrate and lactate were the main carboxylic acids produced during H<sub>2</sub> fermentation, reaching concentrations in the ranges of 0.01-6.56, 0.00-12.20, and 0.00-19.49 g/L, respectively. In general, the concentration of acetate and butyrate were positively associated with the OLR (Figure 2, Table S2 in supplementary material). Nevertheless, the concentration/production of lactate was not clearly associated to OLR. Altogether, the observations on carboxylic acids were consistent with the relationship observed between VHPR and OLR.

### 3.2 Main relationships between H<sub>2</sub> production performance and homoacetogens abundance

The quantitative analysis of the gene *fthfs* through qPCR showed that homoacetogenic microorganisms were present across all systems investigated. The abundance of the *fthfs* gene ranged from 1.92 to 5.40E+04 copies/ng DNA. In general, it was found that the abundance of the *fthfs* gene was inversely associated to the OLR, VHPR and H<sub>2</sub> yield (Figure 3 A-C). Moreover, it was also found that the abundance of the *fthfs* gene was strongly dependent on the type of substrate, being systems fed with glycerol the highest number of *fthfs* gene copies. On the other hand, the *hydA* gene was found to be positively related to the OLR, VHPR and H<sub>2</sub> yield (Figure 3 A-C). It was also observed that the type of substrate had a relevant impact on the *hydA* abundance (Figure 4). In this case, the system fed with cheese whey showed the highest levels of *hydA* gene abundance, followed by systems fed with hydrolysates prepared with Cellulase 50XL and glycerol. On the other hand, the lowest values of *hydA* abundance were found in CSTR systems fed with glucose and hydrolysates prepared with Celluclast 1.5L.

Despite that, the relationship between OLR, VHPR and H<sub>2</sub> yield with each of the two genes was quite clear, there was not an observable relationship between *hydA* and *fthfs* genes abundances (Figure 4).

A further analysis on functional genes and H<sub>2</sub> production performance showed that the concentration of acetate and butyrate in effluents was higher in systems showing relatively high abundance of the *hydA* gene but relatively low abundance of the *fthfs* gene (Figure 3, D-E). Moreover, it was also found that the concentration of lactate was mainly affected by the abundance of the *hydA* gene, while it seemed to be unrelated to the abundance of the *fthfs* gene (Figure 3-F).

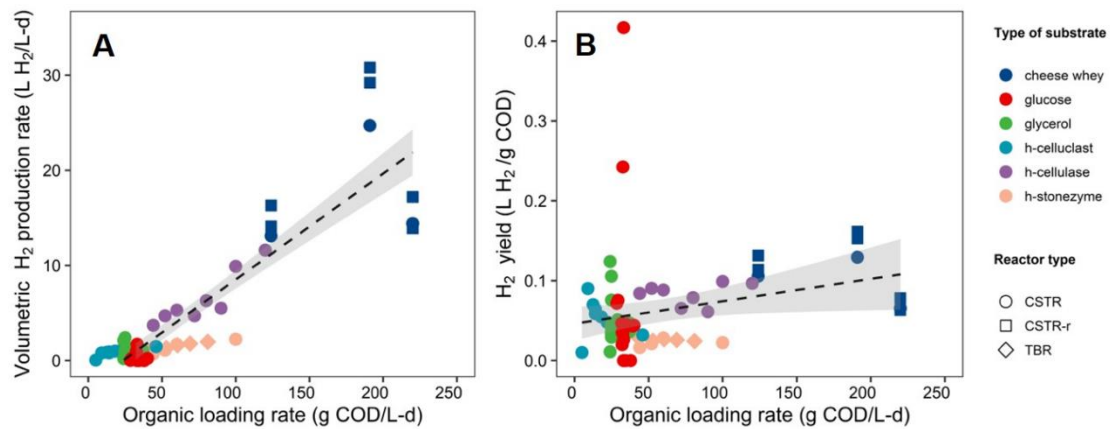


Figure 1. Correlation between VHPR and OLR (A) and H<sub>2</sub> yield and OLR (B) in all the reactors studied at the moment of sampling.

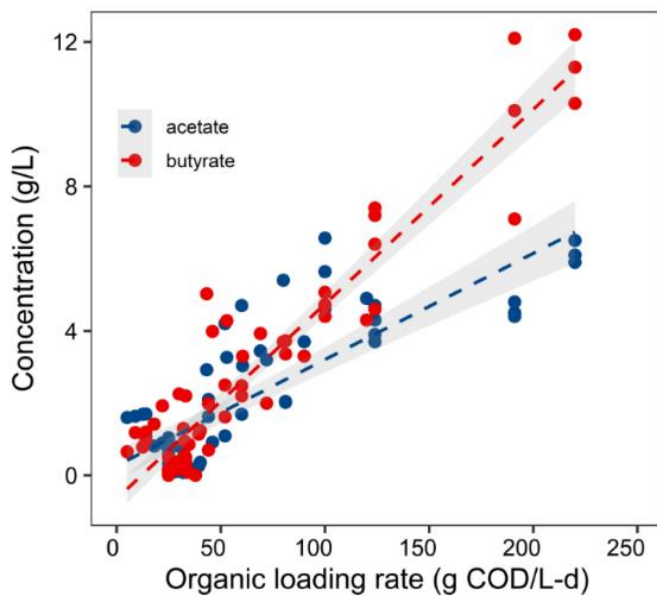


Figure 2. Correlation of the acetate and butyrate concentration and OLR in the reactors studied at the sampling time.

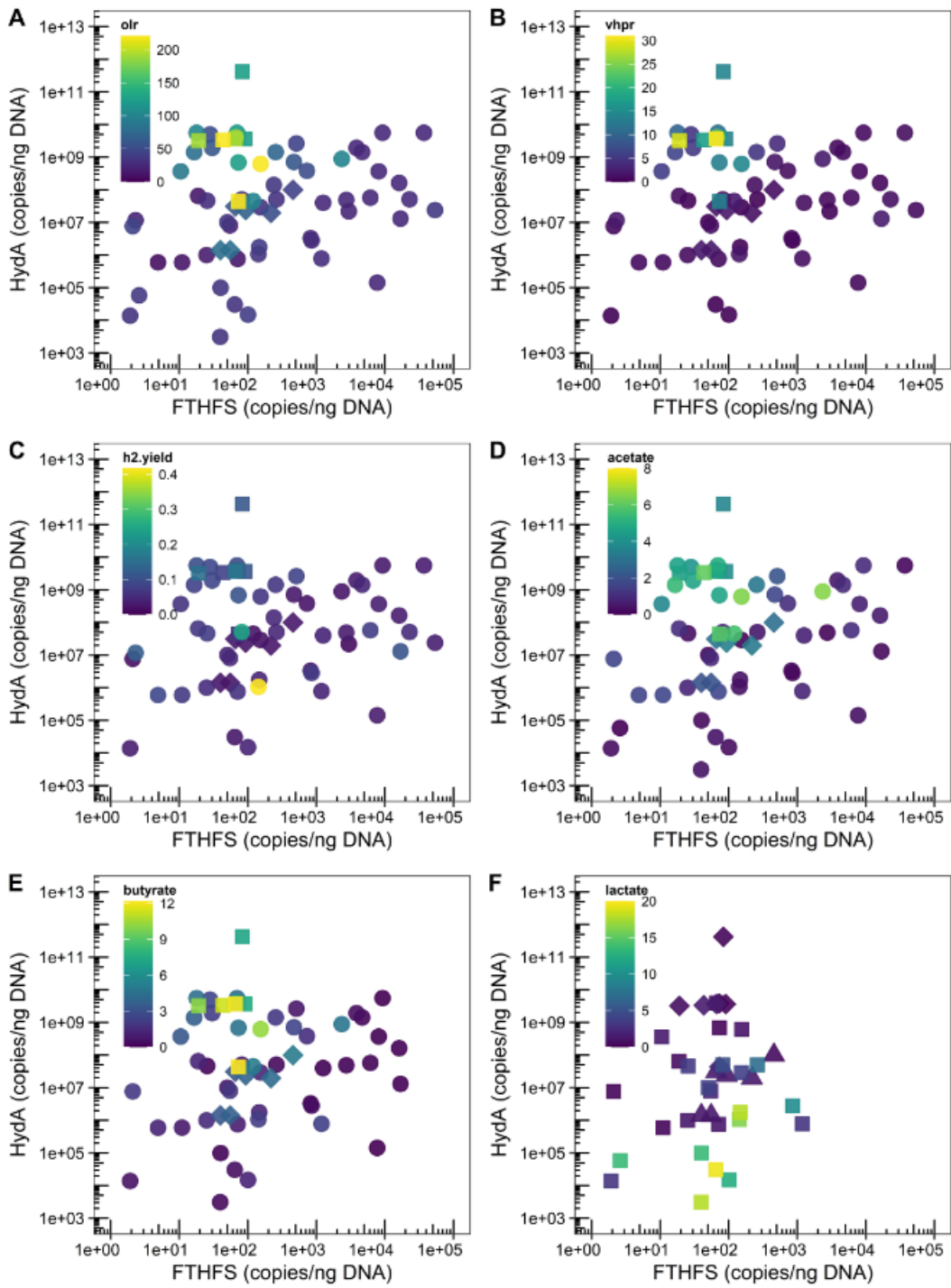


Figure 3. Correlation between the *ftfs* copies/ngDNA and the *hydA* copies/ng DNA considering the: OLR (A), VHPR (B), H<sub>2</sub> yield (C), acetate concentration (D), butyrate concentration (E), lactate concentration (F).

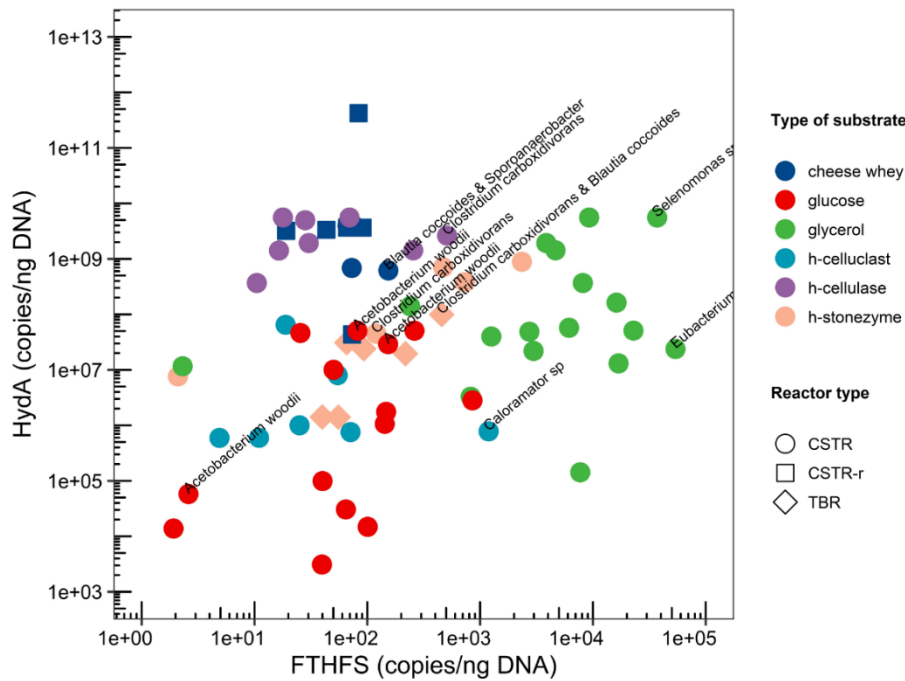


Figure 4. Correlation between *hydA* and *fthfs* (copy number/ng DNA) genes

To identify the homoacetogenic organisms involved in the process, the *fthfs* gene was sequenced from 10 selected samples. The gene was specifically amplified by Nested-PCR approach. Representative samples with high proportion of homoacetogens according to qPCR results were selected from the different reactors. The Nested-PCR strategy applied give positive results for all the samples with a total of 20,341 high-quality reads (with the following distribution: UY R1-1, 680; MX R3-9, 823; UY R2-1, 1,312; UY R3-3, 1,536; CL R1-1, 2,202; CL R6-1, 2,228; MX R1-1, 2,491; MX R4-7, 2,870; MX R2-6, 3,054; MX R5-1, 3,145 reads respectively). The reads were subsequently grouped into OTUs based on 97 % sequence similarity, obtaining 744 OTUs in total. The OTUs with a relative abundance >1 % in at least one sample were selected and classified by comparison with the databases.

In general, the homoacetogens diversity was quite low across all samples investigated; in all cases, only one species accounted >50 % of relative abundance and up to 90 % in certain cases (Table 2).

The results from the classification showed that the genus/species of homoacetogens that dominated during H<sub>2</sub> production was mainly determined by the type of substrate used. In systems fed with glucose (samples UY R1-R3) the homoacetogens population was dominated by *Acetobacterium woodii*. Systems fed with cheese whey powder (sample MX R4) showed the codominance of *Blautia coccoides* and an unclassified species of the *Sporosarcina* genus. In systems fed with glycerol (samples CL-R1 and CL-R6), the most abundant homoacetogens

were identified as *Eubacterium limosum* and *Selenomonas* sp. In the case of systems fed with enzymatic hydrolysates, the taxonomy of homoacetogens not only depended on the type of substrate but also on the type of reactor as well as the temperature regime of operation. The mesophilic CSTR systems (samples MX-R2 and MX-R5) were dominated by *Clostridium carboxidivorans*, the thermophilic CSTR system (sample MX-R3) was dominated by the thermophilic homoacetogen *Caloramator* sp., while the mesophilic TBR system (MX-R1) was co-dominated by homoacetogens belonging to *Blautia coccooides*, *Clostridium carboxidivorans*, and *Clostridium indicum* species. A phylogenetic tree was constructed with the sequences from the OTUs and their closest relatives. A similar result was obtained as the sequences were grouped according to the type of substrate (Figure S2, supplementary material). Table 3 resumes the principal group of homoacetogen detected in the *ftfhs* sequence analysis and type of homoacetogenesis according to the bibliography.

Table 2- Classification of the reads according to BLAST-X analysis. The relative abundance of the different OTUs in each community is shown with a color scale (red color higher abundance, green color lower abundance).

#OTU ID	MX R1-1	MX R2-6	MX R3-9	MX R4-1	MX R5-7	UY R1-1	UY R2-1	UY R3-3	CL R1-1	CL R6-1	Description	Per. Ident	Accessio Number
OTU118	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.46%	2.18%	0.00%	<i>Clostridium</i> sp. SN20	87.1%	WP_101693477.1
OTU140	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.13%	1.86%	0.00%	<i>Eubacterium</i> sp.	100.0%	WP_058693219.1
OTU170	0.00%	0.00%	3.65%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Caloramator proteoclasticus</i>	77.1%	WP_073248839.1
OTU173	0.20%	0.65%	0.00%	1.05%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	97.7%	WP_007060798.1
OTU179	0.00%	0.00%	1.09%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Caloramator proteoclasticus</i>	85.5%	WP_073248839.1
OTU184	36.61%	0.07%	0.12%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Blautia coccooides</i>	100.0%	GU124179.1
OTU189	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.85%	4.31%	0.00%	<i>Selenomonas bovis</i>	98.2%	WP_031586078.1
OTU218	0.00%	0.00%	8.14%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Caloramator proteoclasticus</i>	83.1%	WP_073248839.1
OTU223	0.00%	0.00%	0.00%	0.67%	0.38%	4.41%	7.55%	14.26%	0.05%	0.00%	<i>Oscillibacter ruminantium</i>	68.6%	WP_040658956.1
OTU246	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	85.00%	77.59%	56.45%	0.05%	0.04%	<i>Acetobacterium woodii</i>	97.2%	WP_014355320.1
OTU27	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.39%	1.18%	0.00%	<i>Pseudoflavonifractor</i> sp. Marseille	96.6%	WP_080907465.1
OTU300	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.52%	4.68%	0.00%	<i>Eubacterium limosum</i>	93.8%	AAK20251.1
OTU371	25.45%	80.62%	0.00%	78.63%	3.73%	0.15%	0.08%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	98.5%	WP_007060798.1
OTU403	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.15%	1.30%	0.07%	0.00%	0.00%	<i>Clostridium</i> sp. WB02 MRS01	100.0%	WP_154520701.1
OTU414	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.33%	1.63%	0.00%	<i>Bacteroides ihuae</i>	60.0%	WP_071146451.1
OTU421	0.00%	0.00%	24.54%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Caloramator</i> sp. ALD01	74.7%	WP_040684099.1
OTU423	0.00%	0.00%	34.87%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Caloramator</i> sp. ALD01	74.7%	WP_040684099.1
OTU446	9.84%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Clostridium indicum</i>	100.0%	WP_117415555.1
OTU47	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	2.15%	39.01%	0.04%	<i>Eubacterium limosum</i>	100.0%	AAK20251.1
OTU491	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	4.69%	0.05%	0.00%	<i>Arthrobacter</i> sp. ZXY-2	100.0%	WP_071416245.1
OTU506	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.91%	1.91%	1.17%	0.00%	0.00%	<i>Acetobacterium woodii</i>	86.1%	WP_014355320.1
OTU514	0.00%	0.00%	5.83%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Caloramator proteoclasticus</i>	77.8%	WP_073248839.1
OTU522	0.48%	1.18%	0.00%	1.27%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	100.0%	WP_007060798.1
OTU534	0.00%	0.00%	1.58%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Caloramator proteoclasticus</i>	60.7%	WP_073248839.1
OTU564	0.00%	0.00%	2.19%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Caloramator proteoclasticus</i>	79.7%	WP_073248839.1
OTU568	0.12%	0.03%	0.00%	0.00%	1.18%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	97.4%	WP_007060798.1
OTU58	0.00%	0.00%	1.46%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Thermobrachium celere</i>	87.0%	CDF59176.1
OTU584	0.56%	1.24%	0.00%	2.29%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Clostridium carboxidivorans</i>	93.2%	WP_007060798.1
OTU644	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.15%	0.72%	0.05%	90.89%	<i>Selenomonas</i> sp. WCA-380-WT-3B	74.6%	WP_154619892.1
OTU658	0.00%	0.56%	0.36%	0.00%	34.36%	0.00%	0.99%	0.26%	0.00%	0.00%	unclassified <i>Sporanaerobacter</i>	98.6%	WP_071139966.1
OTU661	20.27%	1.93%	1.22%	0.10%	54.91%	0.00%	0.00%	0.00%	0.09%	0.00%	<i>Blautia coccooides</i>	100.0%	ADR66354.1
OTU698	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.15%	0.23%	2.93%	37.28%	5.03%	<i>Eubacterium limosum</i>	100.0%	AAK20251.1
OTU73	0.00%	0.00%	2.55%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	Uncultured microorganism	100.0%	BAF74430.1

Table 3- Principal group of homoacetogen detected in the *ftfhs* sequence analysis and type of homoacetogenesis according to the bibliography.

Sample	Reactor configuration	Principal microorganism	Principal end products (H <sub>2</sub> and CO <sub>2</sub> )	Suggested type of homoacetogenesis
MX R1-1	TBR	<i>Clostridium carboxidivorans</i> * and <i>Blautia coccoides</i> *	acetate, ethanol, butyrate, butanol, hexanol acetate	by change in <i>Clostridium</i> metabolism and change in microbial population
MX R2-6	CSTR	<i>Clostridium carboxidivorans</i> *	acetate, ethanol, butyrate, butanol, hexanol	by change in <i>Clostridium</i> metabolism
MX R3-9	CSTR	<i>Caloramator sp</i> **	Not known	by change in microbial population
MX R4-7	CSTR	<i>Clostridium carboxidivorans</i> *	acetate, ethanol, butyrate, butanol, hexanol	by change in <i>Clostridium</i> metabolism
MX R5-1	CSTR	<i>Blautia coccoides</i> * and <i>Sporoanaerobacter</i> ****	acetate not known	by change in microbial population
UY R2-1	CSTR	<i>Acetobacterium woodii</i> *	acetate	by change in microbial population
UY R1-1	CSTR	<i>Acetobacterium woodii</i> *	acetate	by change in microbial population
UY R3-3	CSTR	<i>Acetobacterium woodii</i> *	acetate	by change in microbial population
CL R1-1	CSTR	<i>Eubacterium limosum</i> *	acetate	by change in microbial population
CL R6-1	CSTR	<i>Selenomonas sp</i> ****	not known	by change in microbial population

References \* Schiel-Bengelsdorf y Dürre, 2012; \*\* Ciranna et al., 2014; \*\*\* Hernandez-Eugenio et al., 2002, \*\*\*\* Scheifinger et al., 1973

#### 4. Discussion

##### 4.1 What do we learn from gathered reactor performance?

The analysis of H<sub>2</sub> production performance across the 19 lab-scale reactors showed a strong positive relationship between OLR and VHPR. The relationship was independent of the type of substrates and reactor configuration, which indicates that such relationship was a general characteristic among H<sub>2</sub>-producing systems. The highest OLR and VHPR values were reached in systems fed with cheese whey, which is a substrate rich in lactose, an easy to metabolize carbohydrate. Moreover, cheese whey contains other different compounds (lipids, proteins, amino acids, minerals, etc.) that enrich the substrate and make it ideal for dark fermentation. On the other hand, the CSTR system fed with agave bagasse hydrolysates prepared with the enzyme Celluclast 1.5L showed the lowest values of OLR and VHPR. This was probably due to the thermophilic regime (55 °C) of such a system as well as other specific conditions required to maintain biomass in the system (e.g. relatively large HRT but low substrate concentration). The others substrates evaluated were arranged in accordance to multiple parameters such as the complexity of substrates but also in accordance to the specific objectives of each study.

The OLR also affected the concentrations of acetate and butyrate, which increase as expected consequence of the increase of available substrate to perform dark fermentation. However, the present study revealed that the increase of acetate and butyrate along the OLR scale was not equal; the acetate to butyrate ratio changed from 0.09 up to 139 (mol/mol) as the OLR (and also the VHPR) increases. The acetate to butyrate ratio has been previously referred to as an

indicative of H<sub>2</sub> production performance. For instance, Fang et al. (2006) reported that the acetate to butyrate ratio can be affected by pH, ranging from 0.44 at pH 4.0 to 1.15 at pH 7.0. The best acetate to butyrate ratios for H<sub>2</sub> production were in the range of 0.41 to 0.7 (pH 4.5-5.5). Hafez et al. (2010) investigated the effect of OLR on H<sub>2</sub> production in a CSTR reactor with biomass recycling; they found that the acetate to butyrate ratio was positively associated to the H<sub>2</sub> yield. In the present study, the acetate to butyrate ratio can be associated to higher VHPR values, but its association to the H<sub>2</sub> yield is rather a weak association.

#### *4.2 Two rings to rule them all: *fthfs* and *hydA* genes as “predictors” of H<sub>2</sub> production performance*

The analysis of the genes encoding FTHFS and HydA (key enzymes involved in homoacetogenesis and H<sub>2</sub> production, respectively) revealed that their abundance was mainly affected by the OLR and type of substrate. The impact of the type of substrate can be explained by the different microbial communities developed in each of the H<sub>2</sub>-producing systems, which is dependent on the type of substrate and operating conditions.

The relationship between high OLR values, high *hydA* and low *fthfs* copy number suggested that H<sub>2</sub>-producing bacteria outcompeted homoacetogens in conditions of high substrate availability (high OLR). It is hypothesized that the high availability of substrate led to the selection of microorganisms performing fermentation linked to H<sub>2</sub> production, which is a highly energetic metabolism ( $\Delta G^{\circ} = -206$  kJ/mol from glucose) (Fang et al., 2015), while microorganisms performing homoacetogenesis were incapable to compete due to the low energy obtained through such pathway ( $\Delta G^{\circ} = -104$  kJ/mol (Saady, 2013)). At low OLR, it is possible that homoacetogens find proper conditions for their growth; however, this could also depend on other factors (dissolved H<sub>2</sub> concentration, acetate concentration, inoculum, mass transfer rate, etc) (Saady, 2013). Interestingly, the observed relationship between OLR and *fthfs* copy number seems to be contrary to previous studies arguing that homoacetogenesis was favored at high OLR due to the higher accumulation of H<sub>2</sub> expected at such conditions (Palomo-Briones et al. 2018); however, such investigation was conducted in systems showing high values of H<sub>2</sub> production, where the accumulation of H<sub>2</sub> could indeed be an issue. Evidence found in the present study shows that the relationship between OLR and the presence of homoacetogens was positive across different systems fed with different substrates.

Furthermore, results on H<sub>2</sub> production performance and genes quantification revealed that samples with relatively high VHPR were characterized by high abundance of *hydA* gene and low



abundance of *fthfs* gene. This phenomenon was similar when considering H<sub>2</sub> yield instead of VHPR.

Moreover, the high abundance of the *hydA* gene was associated to the acetate and butyrate concentrations, indicating that such metabolic products were mostly produced through dark fermentation, not homoacetogenesis. This observation suggests, contrary to expectations, that the presence of homoacetogens was not associated with an increase of acetate concentrations.

Finally, the negative relationship between lactate and the *hydA* gene clearly showed that metabolisms leading to H<sub>2</sub> and lactic-acid were usually presented in different stages/conditions.

Homoacetogenesis has the effect of lowering H<sub>2</sub> performance and it is not in competition with lactate processes. As lactate production pathway is not H<sub>2</sub> consuming, it would not compete with homoacetogenic microorganisms. On the other hand, lactate productions would compete with H<sub>2</sub> production for the substrate. This would explain why, without *hydA* genes, there is no production of H<sub>2</sub> and lactic acid is present. Therefore, it could be suggested a competition between H<sub>2</sub> producing bacteria and lactic acid bacteria in this case. The role of lactic acid bacteria in hydrogen-producing reactors is controversial because it was found that the relative abundance of these microorganisms was high in samples with low and high hydrogen production (Etchebehere et al. 2016; Fuentes et al., 2018). There are reports of microorganisms able to consume lactic acid and produce H<sub>2</sub>. *Megasphaera* sp. is an example of this (Won et al. 2013).

#### 4.3 Predominance of particular homoacetogens in each reactor

In general, it is reported the low diversity of microorganisms in hydrogen producing reactors (Etchebehere et al., 2016; Fuentes et al., 2018). Therefore, the low diversity of homoacetogenic microorganisms in this reactors was not an exception. Moreover, as homoacetogenesis is not a distributed property, a very large diversity is not expected. A predominance of *Clostridium carboxidivorans* and *Acetobacterium woodii* were observed (Table 3). Both microorganisms have been extensively studied and are reported as homoacetogenic.

Samples MX R1-1, MX R2-6 and MX R4-7 taken from reactors fed with agave hydrolysisate showed a high abundance of *Clostridium carboxidivorans* achieving a relative abundance of 80.62% (MX R2-6). *C. carboxidivorans* is a strictly anaerobic homoacetogenic bacterium that produces acetate, ethanol, butanol, and butyrate. *C. carboxidivorans* can express all the genes of the Wood-Ljungdahl pathway for CO<sub>2</sub> fixation. It can grow autotrophically with H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> or CO. It can also grow chemoorganotrophically with simple sugars. This microorganism presents both H<sub>2</sub> production and homoacetogenesis pathways (Liou et al., 2005).

On the other hand, *Acetobacter woodii* is a homoacetogenic able to grow using H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> as source of carbon and energy to produce acetate as sole product. *A. woodii* was firstly isolated from black sediment of a marine estuary with H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> as substrate (Balch et al. 1977; Drake et al., 2013). *A. woodii* is also able to use organic compounds such as fructose to produce acetate (Braun and G.Gottschalk.1981). This microorganism selectively produces acetate under autotrophic conditions, but is limited at high acetate concentrations (Straub et al., 2014). This organism can also use formate as sole energy and carbon source and possesses a novel enzyme complex, the hydrogen-dependent CO<sub>2</sub> reductase that catalyzes oxidation of formate to H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. *A. woodii* was predominant in samples from the reactors fed with glucose.

Other microorganisms reported as homoacetogenic were also detected, a high relative abundance of *Blautia coccooides* and *Eubacterium limosum* was found in some samples. *B. coccooides* is an homoacetogenic bacteria that has been investigated for a better understanding of the metabolic characteristics of homoacetogens in mixotrophic cultures. It can grow with H<sub>2</sub> as a sole carbon source and achieving an acetate yield of 5.32 g/g dry cell weight after 240 h of incubation (Lui et al., 2015). In samples fed with glycerol, sequencing analysis indicates the presence of the *Eubacterium limosum* bacterium present in 76% abundance within homoacetogens (CL R1-1). This is a homoacetogenic microorganism able to grow at high CO or CO<sub>2</sub> concentrations. It has also the ability to utilize methanol and a variety of energy sources such as sugars, polyhydroxylalcohols, isoleucine, valine and lactate. Grew well under lithotrophic conditions with (Genthner and Bryant, 1982; Chang et al., 2001). Homoacetogenic utilization of substrates only occurs with H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> and formate. With other substrates, butyrate and H<sub>2</sub> are also produced (Drake et al., 2013).

In the samples from the reactor fed with glucose (UY samples), the presence of homoacetogenic microorganisms from the genus *Oscillibacter* (4-14 %) was also observed. In particular, *Oscillibacter valericigenes*, was described as a mesophilic, homoacetogenic, non-spore forming, anaerobic fermentative bacterium that grow with optimum pH of 6 to 6.5 and 30 °C (Iino et al., 2007). However, it has been reported in semi-continuous sludge fermentation bioreactor at pH values of 4.0 (Maspolim et al., 2015). This microorganism has been associated to low H<sub>2</sub> production during the pH decrement strategy in H<sub>2</sub>- producing reactors (Carrillo-Reyes et al., 2014).

According to the metabolic pathways, we observed two types of homoacetogenic microorganisms, some that consume H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> to produce acetate litotrophically and others capable of produce H<sub>2</sub> by fermentation and consume it when H<sub>2</sub> accumulates. Therefore, it

could be suggested that when *C. carboxidivorans* predominates (samples MX R1-1, MX R2-6, MX R4-7), homoacetogenesis is a result of metabolic changes rather than a coexistence of different group of microorganisms. On the other hand, when a homoacetogenic non-hydrogen producer microorganism predominates (e.g *A. woodii* in samples UY R2-1, UY R1-1, UY R3-3), homoacetogenesis could be a result of the coexistence between homoacetogenic and H<sub>2</sub> producing microorganism.

On the other hand, microorganisms not reported as homoacetogens were detected (*Caloramator* sp, *Sporoanaerobacter* and *Selenomonas* sp.), whose genes were found in the database. Furthermore, these microorganisms were reported as H<sub>2</sub>-producers. It could be suggested that either these microorganisms have the gene but it is not active, or that homoacetogenesis has not been yet studied in these microorganisms.

Sample MX R3-9 taken from a reactor operated at thermophilic conditions presented high relative abundance of *fthfs* gene from *Caloramator* sp. Within *Caloramator* genera, *C. proteoclasticus* was isolated from mesophilic granular methanogenic sludge. However, its optimum growth occurred at 55 °C and at pH values between 7.0 and 7.5, with a doubling time of 30 min (Tarlera et al., 1997). Homoacetogenic nature of this organism has not been established.

*Sporanaerobacter* sp. is neutrophilic and heterotrophic H<sub>2</sub> producer (Hernandez-Eugenio et al., 2002). *S. acetigenes* is reported as non- homoacetogenic bacterium (Ljungdahl et al., 1989; Hernandez-Eugenio et al., 2002).

In CL R6-2 sample, fed with glycerol, almost 91% of relative abundance of *fthfs* genes corresponds to a *Selenomonas* sp. Within *Selenomonas* genera, *S. ruminantium* is a non-spore forming anaerobe that ferments carbohydrates primarily to lactate, propionate, acetate and CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>. It is reported that H<sub>2</sub> can be used by *S. ruminantium* in the formation of propionate, which is produced via the succinate pathway (Scheifinger et al., 1973). Some strains produce traces of H<sub>2</sub> from glucose, lactate, or glycerol (Chen et al., 1977).

In particular, sample UY R3-3 presents a low relative abundance of OTU 491 whose closer relative was the *fthfs* gene from *Arthrobacter* sp ZXY-2. Liu et al., (2016) reported the presence of *fthfs* in this bacterium studying the sequestration of CO<sub>2</sub> in petroleum reservoir using *fthfs* as biomarker (Liu et al., 2016). However, this microorganism is aerobic and has not been reported as homoacetogen. The presence of aerobic microorganisms in dark fermentation reactor have been previously reported. They could have a role in consuming the oxygen present in the reactor

(Chang et al. 2008; Castelló et al. 2011).

It should be noted that *fthfs* gene is present in both homoacetogenic and syntrophic acetate oxidation bacteria. Syntrophic acetate-oxidizing bacteria (SAOB) have been identified by biogas production in protein rich substrates. They produce H<sub>2</sub> using the WL pathway. However, when they grow in syntrophy with methanogens, they reverse this pathway and oxidize the acetate to H<sub>2</sub> and carbon dioxide (Hori et al., 2011). *Clostridium ultunense*, *Thermacetogenium phaeum*, *Thermotoga lettingae* and *Syntrophaceticus schinkii* are examples of this group of microorganisms. *fthfs* is also reported in bacteria that are capable of oxidizing purines (purinolytics) and in sulfate-reducing bacteria. In reducing sulfate, *fthfs* gene has an insert not allowing its expression as a functional FTHFS enzyme (Hori et al., 2011; Müller et al., 2016). We did not detect any microorganism of this microorganism. Therefore, the *fthfs* gene would be a good marker to detect homoacetogenesis in H<sub>2</sub>- producing reactors.

The massive parallel sequencing allowed us to identify the microorganisms that presented the *fthfs* gene. However, as we worked with DNA the expression of this gene was not evaluated. In this case, it becomes important to evaluate the activity of these microorganisms by detecting AGVs that are indicative of the presence of metabolic pathways. The use of several techniques together allowed us to draw conclusions.

In conclusion, the homoacetogenic population dynamics are influenced by the inoculum used, the substrate and the operating conditions. Two phenomena around homoacetogenesis can be mentioned. It can be due to 1) a metabolic change in the same group of microorganisms or 2) a change in the microbial community in which a homoacetogenic microorganism could co-exist with H<sub>2</sub>-producing microorganism. In the CSTR fed with glucose the phenomenon of the change of the microbial community would be applied. The same could apply to the reactors fed with glycerol. While in the case of CSTR reactors fed with agave enzymatic hydrolysates, there would be explained by a change of microbial metabolism (Table 3).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

LF was funded by ANII and CAP-CSIC doctoral scholarship, CE is funded by ANII-SNI. This work was partly supported by the Fondo Sectorial SENER-CONACYT Sustentabilidad Energética, Clúster Biocombustibles Gaseosos (project 247006).

## **REFERENCES**

Acar, C., & Dincer, I. (2019). Review and evaluation of hydrogen production options for better

environment. *Journal of Cleaner Production*, 218, 835-849.

APHA/AWWA/WEF (2012) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Stand Methods. <https://doi.org/ISBN 9780875532356>

Ahlert, S., Zimmermann, R., Ebling, J., & König, H. (2016). Analysis of propionate-degrading consortia from agricultural biogas plants. *Microbiology Open*, 5(6), 1027-1037.

Anderson, P. J., Cole, L. J., McKay, D. B., & Entsch, B. (2002). A flavoprotein encoded in *Selenomonas ruminantium* is characterized after expression in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 24(3), 429-438.

Arimi, M. M., Knodel, J., Kiprop, A., Namango, S. S., Zhang, Y., & Geißen, S. U. (2015). Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: a review. *Biomass and bioenergy*, 75, 101-118.

Arooj, M. F., Han, S. K., Kim, S. H., Kim, D. H., & Shin, H. S. (2008b). Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate. *International journal of hydrogen energy*, 33(13), 3289-3294.

Balch, W. E., Schoberth, S., Tanner, R. S., & Wolfe, R. S. (1977). *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 27(4), 355-361

Benemann JR (1996). Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nature Biotechnology*, 14:1101–1103.

Borrel, G., Adam, P.S. and Gribaldo, S. (2016) Methanogenesis and the wood–ljungdahl pathway: an ancient, versatile, and fragile association. *Genome Biol. Evol.*, 8, 1706–1711

Bruant, G., Lévesque, M. J., Peter, C., Guiot, S. R., & Masson, L. (2010). Genomic analysis of carbon monoxide utilization and butanol production by *Clostridium carboxidivorans* strain P7T. *PloS one*, 5(9).

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

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

Castello, E., Braga, L., Fuentes, L. and Etchebehere, C. (2018) Possible causes for the instability in the H<sub>2</sub> production from cheese whey in a CSTR. *Int J Hydrogen Energy* 43, 2654–2665.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Huttley, G.

- A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335.
- Chang, I. S., Kim, B. H., Lovitt, R. W., & Bang, J. S. (2001). Effect of CO partial pressure on cell-recycled continuous CO fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612. *Process Biochemistry*, 37(4), 411-421.
- Chang, J.J., Wu, J.H., Wen, F.S., Hung, K.Y., Chen, Y.T., Hsiao, C.L., Lin, C.Y. and Huang, C.C. (2008) Molecular monitoring of microbes in a continuous hydrogen producing system with different hydraulic retention time. *Int J Hydrogen Energy* 33, 1579–1585.
- Chen, M., & Wolin, M. J. (1977). Influence of CH<sub>4</sub> production by *Methanobacterium ruminantium* on the fermentation of glucose and lactate by *Selenomonas ruminantium*. *Applied and environmental microbiology*, 34(6), 756-759.
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2009). Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4296-4304.
- Diekert, G., & Wohlfarth, G. (1994). Metabolism of homoacetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66(1-3), 209-221.
- Dinamarca, C., Gañán, M., Liu, J., & Bakke, R. (2011). H<sub>2</sub> consumption by anaerobic non-methanogenic mixed cultures. *Water Science and Technology*, 63(8), 1582-1589.
- Drake, H.L., Küsel, K. and Matthies, C. (2013) Acetogenic prokaryotes. In: *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 3–60.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Egli, C., Tschan, T., Scholtz, R., Cook, A. M., & Leisinger, T. (1988). Transformation of tetrachloromethane to dichloromethane and carbon dioxide by *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(11), 2819-2824.
- Engbrecht, J., Brent, R., & Kaderbhai, M. A. (1991). Minipreps of plasmid DNA. *Current protocols in molecular biology*, 15(1), 1-6.
- Etchebere, C., Castelló, E., Wenzel, J., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., ... & Fuentes, L. (2016). Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(7), 3371-3384.
- Fang HHP, Li C, Zhang T (2006) Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *Int J Hydrogen Energy* 31:683–692 . <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.07.005>

- Fang, H., Zhang, T., Ch, Li. Characterization of Fe-hydrogenase genes diversity and hydrogen-producing population in acidophilic sludge. *J Biotechnol* 2006;126:357e64.
- Feng, Y., Stams, A. J., Sánchez-Andrea, I., & de Vos, W. M. (2018). *Eubacterium maltosivorans* sp. nov., a novel human intestinal acetogenic and butyrogenic bacterium with a versatile metabolism. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(11), 3546-3550.
- Gagen, E. J., Denman, S. E., Padmanabha, J., Zadbuke, S., Al Jassim, R., Morrison, M., & McSweeney, C. S. (2010). Functional gene analysis suggests different acetogen populations in the bovine rumen and tamar wallaby forestomach. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7785-7795.
- Genthner, B. S., & Bryant, M. P. (1982). Growth of *Eubacterium limosum* with carbon monoxide as the energy source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(1), 70-74.
- Hafez H, Nakhla G, El. Naggat MH, Elbeshbishy E, Baghchehsaraee B (2010) Effect of organic loading on a novel hydrogen bioreactor. *Int J Hydrogen Energy* 35:81–92 .  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.051>
- He, Y., Li, M., Perumal, V., Feng, X., Fang, J., Xie, J., ... & Wang, F. (2016). Genomic and enzymatic evidence for acetogenesis among multiple lineages of the archaeal phylum Bathyarchaeota widespread in marine sediments. *Nature microbiology*, 1(6), 1-9.
- Heise, R., Müller, V., Gottschalk, G. (1989) Sodium dependence of acetate formation by the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J Bacteriol* 171:5473–5478
- Henderson, G., Naylor, G. E., Leahy, S. C., & Janssen, P. H. (2010). Analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants reveals the presence of new potentially homoacetogenic bacteria in the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Hernandez-Eugenio, G., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Patel, B. K., Thomas, P., Macarie, H., ... & Ollivier, B. (2002). *Sporanaerobacter acetigenes* gen. nov., sp. nov., a novel acetogenic, facultatively sulfur-reducing bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(4), 1217-1223.
- Heyrman, J., Verbeeren, J., Schumann, P., Swings, J., & De Vos, P. (2005). Six novel *Arthrobacter* species isolated from deteriorated mural paintings. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4), 1457-1464.
- Hori, T., Sasaki, D., Haruta, S., Shigematsu, T., Ueno, Y., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2011). Detection of active, potentially acetate-oxidizing syntrophs in an anaerobic digester by flux measurement and formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS) expression profiling. *Microbiology*, 157(7), 1980-1989.
- Hughenoltz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of bacteriology*, 180(18), 4765-4774.

- Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H., & Kim, I. S. (2004). Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology*, 111(3), 297-309.
- Iino, T., Mori, K., Tanaka, K., Suzuki, K. I., & Harayama, S. (2007). *Oscillibacter valericigenes* gen. nov., sp. nov., a valerate-producing anaerobic bacterium isolated from the alimentary canal of a Japanese corbicula clam. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(8), 1840-1845.
- Karnholz, A., Küsel, K., Gößner, A., Schramm, A., Drake, H.L. (2002) Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen. *Appl Environ Microbiol* 68:1005–1009
- Kulski, J. K. (2016). Next-generation sequencing—an overview of the history, tools, and “Omic” applications. *Next Generation Sequencing—Advances, Applications and Challenges*, 3-60.
- Leaphart, A. B., & Lovell, C. R. (2001). Recovery and analysis of formyltetrahydrofolate synthetase gene sequences from natural populations of acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(3), 1392-1395.
- Liu, C., Li, J., Zhang, Y., Philip, A., Shi, E., Chi, X., & Meng, J. (2015). Influence of glucose fermentation on CO<sub>2</sub> assimilation to acetate in homoacetogen *Blautia coccooides* GA-1. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 42(9), 1217-1224.
- Liu, J. F., Mbadanga, S. M., Sun, X. B., Yang, G. C., Yang, S. Z., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2016). Microbial communities responsible for fixation of CO<sub>2</sub> revealed by using *mcrA*, *cbbM*, *cbbL*, *fthfs*, *fehd*-hydrogenase genes as molecular biomarkers in petroleum reservoirs of different temperatures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, 164-175.
- 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.
- Ljungdahl, L. G., Hugenholtz, J. & Wiegel, J. (1989). Acetogenic and acid-producing clostridia. In *Clostridia*, pp. 145±191. Edited by N. P. Minton & D. J. Clarke. New York: Plenum Press.
- Lory, S. (2013). *The prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry*. E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.). Springer Berlin Heidelberg.
- Lovell, C.R. and Leaphart, A.B. (2005) Community-level analysis: key genes of CO<sub>2</sub>-reductive acetogenesis. *Methods Enzymol.*, 397, 454–69.
- Lovell, C. R., Przybyla, A., & Ljungdahl, L. G. (1990). Primary structure of the thermostable formyltetrahydrofolate synthetase from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry*, 29(24), 5687-5694.
- Maintinguer, S. I., Fernandes, B. S., Duarte, I. C., Saavedra, N. K., Adorno, M. A. T., & Varesche, M. B. (2008). Fermentative hydrogen production by microbial consortium. *International Journal of Hydrogen*



Energy, 33(16), 4309-4317.

Madigan, M. & J. Martinko, J. (2006) Brock's Biology of Microorganisms, NJ, Pearson Prentice Hall, 11th edition (p. 352)

Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., & Ng, W. J. (2015). The effect of pH on solubilization of organic matter and microbial community structures in sludge fermentation. *Bioresource technology*, 190, 289-298.

Modestra, J. A., Katakajwala, R., & Mohan, S. V. (2020). CO<sub>2</sub> Fermentation to Short Chain Fatty Acids using selectively Enriched Chemolithoautotrophic Acetogenic Bacteria. *Chemical Engineering Journal*, 124759.

Mohan, S. V. (2008). Fermentative hydrogen production with simultaneous wastewater treatment: influence of pretreatment and system operating conditions

Montiel Corona V, Razo-Flores E (2018) Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresour Technol* 249:334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>

Montiel-Corona, V., Palomo-Briones, R., & Razo-Flores, E. (2020). Continuous thermophilic hydrogen production from an enzymatic hydrolysate of agave bagasse: inoculum origin, homoacetogenesis and microbial community analysis. *Bioresource Technology*, 123087.

Montoya-Rosales, J.J., Olmos-Hernández, D. K., Palomo-Briones, R., Montiel-Corona, V., Mari, A. G., & Razo-Flores, E. (2019). Improvement of continuous hydrogen production using individual and binary enzymatic hydrolysates of agave bagasse in suspended-culture and biofilm reactors. *Bioresource technology*, 283, 251-260.

Montoya-Rosales J de J, Palomo-Briones R, Celis LB, Etchebehere C, Razo-Flores E (2020) Discontinuous biomass recycling as a successful strategy to enhance continuous hydrogen production at high organic loading rates. *Int J Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.265>

Moscoviz, R., Trably, E., Bernet, N., & Carrère, H. (2018). The environmental biorefinery: state-of-the-art on the production of hydrogen and value-added biomolecules in mixed-culture fermentation. *Green chemistry*, 20(14), 3159-3179.

Müller, B., Sun, L., Westerholm, M., & Schnürer, A. (2016). Bacterial community composition and fhs profiles of low-and high-ammonia biogas digesters reveal novel syntrophic acetate-oxidising bacteria. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 48.

Palomo-Briones R, Trably E, López-Lozano NE, Celis LB, Méndez-Acosta HO, Bernet N, Razo-Flores E (2018) Hydrogen metabolic patterns driven by Clostridium-Streptococcus community shifts in a continuous stirred tank reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:2465–2475. <https://doi.org/10.1007/s00253-018->

Parameswaran, P., Zhang, H., Torres, C. I., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2010). Microbial community structure in a biofilm anode fed with a fermentable substrate: the significance of hydrogen scavengers. *Biotechnology and bioengineering*, 105(1), 69-78.

Perna, V., Castelló, E., Wenzel, J., Zampol, C., Lima, D. F., Borzacconi, L., ... & 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.

Peters, V., Janssen, P. H., & Conrad, R. (1998). Efficiency of hydrogen utilization during unitrophic and mixotrophic growth of *Acetobacterium woodii* on hydrogen and lactate in the chemostat. *FEMS microbiology ecology*, 26(4), 317-324.

Prins, R. A. (1971). Isolation, culture, and fermentation characteristics of *Selenomonas ruminantium* var. *bryanti* var. n. from the rumen of sheep. *Journal of bacteriology*, 105(3), 820-825.

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

Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61(2), 262-280.

Scheifinger, C.C., Latham, M. J. and Wolin, M. J. (1975). Relationship of lactate dehydrogenase specificity and growth rate to lactate metabolism by *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol.* 30:916-921.

Sharma, S., Radl, V., Hai, B., Kloos, K., Fuka, M. M., Engel, M., ... & Schloter, M. (2007). Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 445-452.

Silva-Illanes, F., Tapia-Venegas, E., Schiappacasse, M. C., Trably, E., & Ruiz-Filippi, G. (2017). Impact of hydraulic retention time (HRT) and pH on dark fermentative hydrogen production from glycerol. *Energy*, 141, 358-367.

Singh, A., Müller, B., Fuxelius, H. H., & Schnürer, A. (2019). AcetoBase: a functional gene repository and database for formyltetrahydrofolate synthetase sequences. *Database*, 2019

Straub, M., Demler, M., Weuster-Botz, D., & Dürre, P. (2014). Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii*. *Journal of biotechnology*, 178, 67-72.

Valencia-Ojeda C, Montoya-Rosales J de J, Palomo-Briones R, Montiel-Corona V, Celis LB, Razo-Flores E (2020) Assessment of agave bagasse enzymatic hydrolysates obtained with a non-specialized lignocellulosic enzyme in continuous hydrogen production. *Submitt to Ind Crop Prod*

- Vaishampayan, P. A., Kanekar, P. P., & Dhakephalkar, P. K. (2007). Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(4), 273-278.
- Wan, J., Jing, Y., Zhang, S., Angelidaki, I., & Luo, G. (2016). Mesophilic and thermophilic alkaline fermentation of waste activated sludge for hydrogen production: focusing on homoacetogenesis. *Water research*, 102, 524-532.
- White D (1995). *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. Oxford University Press, New York.
- Wiegel, J. (1994). Acetate and the potential of homoacetogenic bacteria for industrial applications. In *Acetogenesis* (pp. 484-504). Springer, Boston, MA.
- Xu, K., Liu, H., Du, G., & Chen, J. (2009). Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments. *Anaerobe*, 15(5), 204-213.
- Zhao, X., Wang, L., Du, L., Yang, J., Dong, J., & Ma, F. (2017). Optimization of culturing conditions for isolated *Arthrobacter* sp. ZXY-2, an effective atrazine-degrading and salt-adaptive bacterium. *RSC advances*, 7(53), 33177-33184.
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J. W., & Zhang, Y. (2018). Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: a mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource technology*, 248, 68-78.

## Supplementary material

### *CL samples*

The inoculum was taken from a domestic wastewater treatment activated sludge plant located in La Farfana, Santiago de Chile. Before use, the sludge was pre-treated by aeration for 24 h in the same feeding medium used to feed the reactor, this strategy to enrich in H<sub>2</sub> producing bacteria was previously described by Silva-Illanes et al., (2017). The medium was composed of 10 gL<sup>-1</sup> of pure glycerol and the following nutrients (in mgL<sup>-1</sup>): NH<sub>4</sub>Cl 1,000; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 100; NaCl 10; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O 10; CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 10; MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 9.4; FeCl<sub>2</sub> 2.78.

The experiments were carried out in a 2 L (working volume) glass continuous stirred tank reactor (CSTR). After inoculation with the pre-treated biomass (5 gSSV L<sup>-1</sup>), nitrogen gas was fluxed for 15 min to reach the anaerobic conditions. The temperature was controlled and maintained at 37 °C with an external jacket and automatic control, the agitation was maintained at 150 rpm. pH was monitored and regulated by a sensor/controller connected to a pump with a NaOH 0.8 M solution and the HRT was set with the feeding flux.

Experiments from CL R1 to R5 vary the pH and HRT as is shown in Table S1. They correspond to five reactors operated at different pH and HTR. The operation conditions are described in Silva-Illanes et al., (2017).

Experiments from CL R6 to R11 correspond to six reactors operated at different oxidation-reduction potential (ORP) and applying oxidant agents. Two chemical products (oxidant agents) were selected to adjust the redox potential value: potassium ferricyanide (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) (samples from CL R6 to CL R8) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (samples from CL R9 to CL R11). ORP values were selected according to the ORP measured in a continuous system of H<sub>2</sub> production with glycerol as a substrate at pH 5.5, HRT of 12 h and ORP value varying between -530 to -580 mV. Therefore, ORP was fixed in three ranges: -480 to -500 mV (CL R6, CL R9), -505 to -525 mV (CL R7, CL R10) and -530 to -550 mV (CL R8, CL R11), by varying the amount of oxidant agent addition. Oxidant agent addition was carried out using a sensor/controller device (Thermo scientific Alpha pH/ORP 190 1/8 DIN) connected to a pump adding an oxidant agent solution of 0.3 M. Each condition was intercalated with control conditions; therefore, a total of six steady states lasting at least 30 HRT equivalents were investigated (referred as number 1, e.g. CL R8-1 is the control of reactor 8), obtaining twelve samples in total (table 1). This experiment was performed with the aim of investigate the role of ORP and its potential use as a control tool. The reactor was operated in each condition for at least 30 HRT at steady-state taking control samples. The agents

were subsequently added and again after at least 30 HRT at steady state were taken samples at each experience. The steady-state hydrogen yield and metabolite production values were determined when the variation of hydrogen yields was not higher than 15%.

#### *UY samples*

A 3 L continuous stirred tank reactor (CSTR) was inoculated with a heat pre-treated anaerobic sludge from a UASB reactor treating as substrate dairy waste. The inoculum was heat treated 90 minutes at 100 °C, as reported by Wongaret et al., (2007) and fed with glucose, mineral medium (Davila-Vazquez et al., 2009) and yeast extract (3,0 g/L).

Three different HRT reactor conditions were tested, at HRT 6 h (UY R2), 10 h (UY R1) and 24 h (UY R3) (table 1). Each operation lasted 20 HRTs (120 h in the operation with HRT 6 h, 200 h in the operation with the HRT 10 h and 480 h in the operation with HRT 24 h). The reactor's OLR (30gCOD/ Ld) was kept constant during each operation.

Table S1. Reactors operation conditions and results of H<sub>2</sub> production, qPCR of *fthfs* and qPCR of *hydA* copy number

Sample	Reactor	HRT (h)	Substrate, description	OLR (g COD/L-d)	VHPR (L H <sub>2</sub> /L-d)	H <sub>2</sub> yield (LH <sub>2</sub> /gCODFe d)	<i>fthfs</i> (copy number/ ng DNA)	<i>hydA</i> (copy number/ ng DNA)
MX R1-1	TBR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	43.2	1.23	0.028	4.57E+02	9.93E+07
MX R1-2	TBR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	52.9	1.31	0.025	2.18E+02	1.96E+07
MX R1-3	TBR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	60.5	1.61	0.027	6.58E+01	3.09E+07
MX R1-4	TBR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	69	1.78	0.026	9.32E+01	2.40E+07
MX R1-5	TBR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	81	1.98	0.024	3.99E+01	1.41E+06
MX R1-6	TBR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	81	1.96	0.024	5.54E+01	1.40E+06
MX R2-1	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	44	0.72	0.016	2.10E+00	7.63E+06
MX R2-2	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	52	1.1	0.021	7.31E+02	3.79E+08
MX R2-3	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	60	1.7	0.028	4.71E+02	7.07E+08
MX R2-5	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	100	2.25	0.023	2.35E+03	8.82E+08
MX R2-6	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Stonezyme)	100	2.23	0.022	1.20E+02	4.49E+07
MX R3-2	CSTR (55 °C)	63	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	5	0.05	0.010	5.65E+00	not detected
MX R3-3	CSTR (55 °C)	63	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	9	0.81	0.090	4.90E+00	5.91E+05
MX R3-4	CSTR (55 °C)	48	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	12.5	0.87	0.070	1.10E+01	5.94E+05
MX R3-5	CSTR (55 °C)	48	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	14	0.82	0.059	7.12E+01	7.55E+05
MX R3-6	CSTR (55 °C)	48	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	14	0.9	0.064	1.89E+01	6.46E+07
MX R3-7	CSTR (55 °C)	36	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	18	0.99	0.055	2.51E+01	9.96E+05
MX R3-8	CSTR (55 °C)	30	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	22	1.05	0.048	5.48E+01	8.01E+06
MX R3-9	CSTR (55 °C)	24	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	30	1.23	0.041	1.19E+03	7.78E+05
MX R3-10	CSTR (55 °C)	15	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	46	1.47	0.032	3.54E+01	not detected
MX R4-1	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	44	3.7	0.084	5.11E+02	2.62E+09
MX R4-2	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	52	4.7	0.090	2.82E+01	4.97E+09
MX R4-3	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	80	6.3	0.079	1.65E+01	1.41E+09
MX R4-4	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	100	9.9	0.099	1.79E+01	5.55E+09
MX R4-5	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	120	11.6	0.097	6.97E+01	5.56E+09
MX R4-6	CSTR (37 °C)	6	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	60	5.3	0.088	3.03E+01	1.92E+09
MX R4-7	CSTR (37 °C)	10	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	72	4.7	0.065	2.56E+02	1.42E+09
MX R4-8	CSTR (37 °C)	8	hydrolyzed agave bagasse (Celluclast)	90	5.5	0.061	1.05E+01	3.66E+08
MX R5-1	CSTR (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	124	13.1	0.106	7.30E+01	6.83E+08
MX R5-2	CSTR-r (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	124	13.9	0.112	9.06E+01	3.65E+09
MX R5-3	CSTR-r (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	124	14.1	0.114	8.36E+01	4.22E+11
MX R5-4	CSTR-r (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	124	16.3	0.132	7.26E+01	3.79E+09
MX R5-5	CSTR (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	191	24.7	0.129	6.69E+01	3.96E+09
MX R5-6	CSTR-r (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	191	29.2	0.153	1.91E+01	3.20E+09
MX R5-7	CSTR (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	220	14.4	0.066	1.54E+02	6.19E+08
MX R5-8	CSTR-r (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	220	13.9	0.063	7.33E+01	4.35E+07
MX R5-9	CSTR-r (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	220	17.2	0.078	4.34E+01	3.34E+09
MX R5-10	CSTR-r (37 °C)	6	whey (Biomass recycling)	191	30.8	0.161	6.61E+01	3.66E+09
UY R1-1	CSTR (37 °C)	10	Glucose	30	0.98	0.242	8.19E+01	5.06E+07
UY R1-2	CSTR (37 °C)	10	Glucose	30	0.18	0.047	2.62E+02	5.05E+07
UY R1-5	CSTR (37 °C)	10	Glucose	30	0.01	0.072	8.56E+02	2.80E+06
UY R2-1	CSTR (37 °C)	6	Glucose	30	0.08	0.020	1.53E+02	2.90E+07
UY R2-2	CSTR (37 °C)	6	Glucose	30	0.19	0.045	5.03E+01	1.00E+07
UY R2-3	CSTR (37 °C)	6	Glucose	30	0.14	0.035	not detected	1.23E+06
UY R2-4	CSTR (37 °C)	6	Glucose	30	0.23	0.075	2.56E+01	4.60E+07
UY R2-5	CSTR (37 °C)	6	Glucose	30	0.14	0.034	1.92E+00	1.38E+04
UY R3-1	CSTR (37 °C)	24	Glucose	30	0.21	0.043	1.01E+02	1.48E+04
UY R3-3	CSTR (37 °C)	24	Glucose	30	0	0	2.60E+00	5.77E+04
UY R3-4	CSTR (37 °C)	24	Glucose	30	0	0	4.02E+01	9.89E+04
UY R3-5	CSTR (37 °C)	24	Glucose	30	0.11	0.026	6.46E+01	3.04E+04
UY R3-6	CSTR (37 °C)	24	Glucose	30	0	0	3.97E+01	3.09E+03
UY R3-7	CSTR (37 °C)	24	Glucose	30	0.22	0.044	1.47E+02	1.74E+06
UY R3-8	CSTR (37 °C)	24	Glucose	30	1.72	0.417	1.43E+02	1.06E+06
CL R1-1	CSTR (37 °C)	8	Glycerol, pH 6.5	37	0.93	0.036	5.40E+04	2.37E+07
CL R2-1	CSTR (37 °C)	8	Glycerol, pH 5.5	37	1.04	0.047	2.40E+02	1.40E+08
CL R3-1	CSTR (37 °C)	10	Glycerol, pH 6.0	29	1.28	0.051	2.29E+04	5.08E+07
CL R4-1	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, pH 5.5	24	2.11	0.124	2.31E+00	1.16E+07
CL R5-1	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, pH 6.5	24	0.19	0.011	2.98E+03	2.18E+07
CL R6-1	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, R6 control	24.9	1.04	0.034	3.71E+04	5.55E+09
CL R6-2	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, ORP [-480/-500 mV]	24.9	0.9	0.029	9.27E+03	5.56E+09
CL R7-1	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, R7 control	24.9	0.72	0.034	3.86E+03	1.92E+09
CL R7-2	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, ORP [-505/-525 mV]	24.9	0.88	0.045	4.66E+03	1.42E+09
CL R8-1	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, R8 control	24.9	0.6	0.036	8.14E+03	3.66E+08
CL R8-2	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, ORP [-530/-550 mV]	24.9	0.92	0.076	6.15E+03	5.72E+07
CL R9-1	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, R9 control	24.9	0.7	0.032	2.74E+03	4.86E+07
CL R9-2	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, ORP [-480/-500 mV]	24.9	0.78	0.035	7.73E+03	1.42E+05
CL R10-1	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, R10 control	24.9	0.61	0.033	8.25E+02	3.28E+06
CL R10-2	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, ORP [-505/-525 mV]	24.9	1.06	0.041	1.26E+03	3.97E+07
CL R11-1	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, R11 control	24.9	0.59	0.035	1.62E+04	1.62E+08
CL R11-2	CSTR (37 °C)	12	Glycerol, ORP [-530/-550 mV]	24.9	2.41	0.106	1.69E+04	1.30E+07

Table S2. Reactor VFA production and % homoacetogenesis

Sample	Acetate g/L	Lactate g/L	Butyrate g/L	Propionate g/L	Ethanol g/L	Succinic g/L	Formic g/L	1,3 Propanediol g/L	%homoacetogenesis
MX R1-1	2.92	0.52	5.03	0.00			Not measured		57.25%
MX R1-2	3.26	1.34	4.28	0.00			Not measured		51.43%
MX R1-3	3.03	1.51	3.30	0.00			Not measured		45.67%
MX R1-4	3.44	1.27	3.93	0.00			Not measured		44.69%
MX R1-5	2.02	1.20	3.36	0.00			Not measured		42.88%
MX R1-6	2.05	1.23	3.72	0.00			Not measured		74.74%
MX R2-1	1.63	0.25	1.99	0.00			Not measured		56.64%
MX R2-2	1.10	0.00	1.62	0.00			Not measured		56.85%
MX R2-3	1.69	0.00	2.48	0.00			Not measured		55.68%
MX R2-5	6.57	0.00	4.72	0.00			Not measured		45.92%
MX R2-6	5.64	0.00	5.07	0.00			Not measured		49.36%
MX R3-2	1.60	0.00	0.65	0.00			Not measured		52.02%
MX R3-3	1.64	0.00	1.18	0.00			Not measured		32.24%
MX R3-4	1.69	0.27	0.78	0.32			Not measured		3.31%
MX R3-5	1.70	1.20	0.98	0.35			Not measured		0.94%
MX R3-6	1.08	0.71	1.20	0.34			Not measured		-12.65%
MX R3-7	0.81	1.36	1.42	0.45			Not measured		-22.26%
MX R3-8	0.90	2.21	1.93	0.32			Not measured		-15.36%
MX R3-9	0.80	2.98	2.26	0.80			Not measured		-20.61%
MX R3-10	0.92	5.35	3.99	1.23			Not measured		1.09%
MX R4-1	2.10	0.00	0.70	0.00			Not measured		21.10%
MX R4-2	4.20	0.00	2.50	0.00			Not measured		34.18%
MX R4-3	5.40	0.00	3.70	0.00			Not measured		35.87%
MX R4-4	4.60	0.00	4.40	0.00			Not measured		31.00%
MX R4-5	4.90	0.00	4.30	0.00			Not measured		26.98%
MX R4-6	4.70	0.00	2.20	0.00			Not measured		31.46%
MX R4-7	3.20	0.00	2.00	0.00			Not measured		31.48%
MX R4-8	3.70	1.40	3.30	0.00			Not measured		36.98%
MX R5-1	4.70	0.22	4.60	0.00			Not measured		22.03%
MX R5-2	3.90	0.34	7.40	0.00			Not measured		34.71%
MX R5-3	3.70	0.37	7.20	0.00			Not measured		35.45%
MX R5-4	4.30	0.31	6.40	0.00			Not measured		20.67%
MX R5-5	4.40	0.68	7.10	0.00			Not measured		-1.10%
MX R5-6	4.50	0.78	10.10	0.00			Not measured		5.83%
MX R5-7	6.50	1.01	10.30	0.00			Not measured		74.91%
MX R5-8	5.90	2.37	12.20	0.00			Not measured		59.04%
MX R5-9	6.10	1.58	11.30	0.00			Not measured		56.96%
MX R5-10	4.80	1.46	12.10	0.00			Not measured		5.77%
UY R1-1	0.91	4.78	0.95	0.05			Not measured		-
UY R1-2	0.49	7.16	0.31	0.02			Not measured		40.37
UY R1-3	0.16	9.46	0.27	0.01			Not measured		57.66
UY R1-4	0.09	9.65	0.19	0.02			Not measured		72.23
UY R1-5	0.11	9.65	0.37	0.03			Not measured		-
UY R2-1	0.08	3.82	1.30	0.00			Not measured		-
UY R2-2	0.20	3.82	0.86	0.00			Not measured		-
UY R2-3	0.12	5.18	0.44	0.00			Not measured		44
UY R2-4	0.31	3.34	0.16	0.00			Not measured		38
UY R2-5	0.25	3.01	0.55	0.00			Not measured		79.5
UY R3-1	0.26	12.41	1.14	0.96			Not measured		51.08
UY R3-2	0.22	9.01	1.95	0.95			Not measured		-
UY R3-3	0.01	13.57	0.00	0.00			Not measured		33.3
UY R3-4	0.20	13.57	0.08	0.00			Not measured		41.2
UY R3-5	0.39	19.49	0.50	0.07			Not measured		49.5
UY R3-6	0.38	17.88	0.29	0.04			Not measured		49
UY R3-7	0.36	17.88	1.24	0.02			Not measured		-
UY R3-8	0.34	16.26	2.20	0.00			Not measured		-
CL R1-1	Silva-Illanes et al., 2013	Not measured			Silva-Illanes et al., 2013				31.90%
CL R2-1	Silva-Illanes et al., 2014	Not measured			Silva-Illanes et al., 2014				52.54%
CL R3-1	Silva-Illanes et al., 2015	Not measured			Silva-Illanes et al., 2015				31.26%
CL R4-1	Silva-Illanes et al., 2016	Not measured			Silva-Illanes et al., 2016				37.48%
CL R5-1	Silva-Illanes et al., 2017	Not measured			Silva-Illanes et al., 2017				-
CL R6-1	0.16	Not measured	0.00	0.00	1.08	0.03	0.09	4.53	50.94%
CL R6-2	0.95	Not measured	0.01	0.81	1.43	0.35	0.06	1.22	69.93%
CL R7-1	0.49	Not measured	0.49	1.27	0.36	1.68	0.00	0.61	44.76%
CL R7-2	0.95	Not measured	0.14	1.47	1.27	0.31	0.15	0.97	36.65%
CL R8-1	0.70	Not measured	0.13	4.20	0.77	0.00	0.00	1.86	37.02%
CL R8-2	1.04	Not measured	0.12	1.41	1.16	1.21	0.06	1.89	-
CL R9-1	0.09	Not measured	0.03	0.32	1.37	0.00	0.07	2.24	24.25%
CL R9-2	0.33	Not measured	0.01	0.04	1.53	0.00	0.06	3.10	-
CL R10-1	0.18	Not measured	0.05	0.00	0.89	1.60	0.18	2.25	82.11%
CL R10-2	0.72	Not measured	0.05	0.11	2.68	0.12	0.03	1.81	79.93%
CL R11-1	0.57	Not measured	0.02	0.06	2.00	1.03	0.08	1.05	88.90%
CL R11-2	0.19	Not measured	0.02	0.28	1.85	0.00	0.06	1.14	83.41%

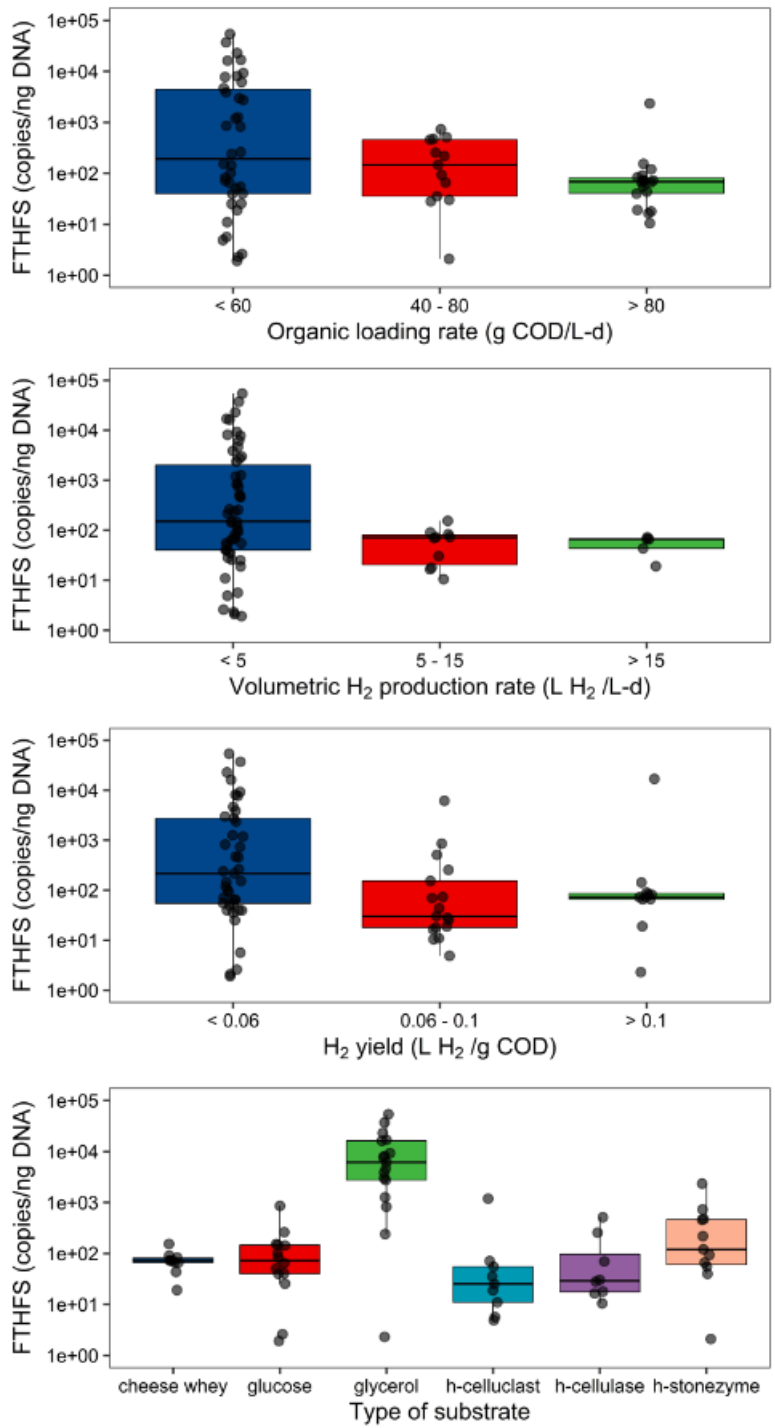


Figure S1. Boxplot showing the values of fthfs gene copies/ng DNA in the samples grouped by Volumetric hydrogenproducing rate, H<sub>2</sub> yield and reactors substrate.



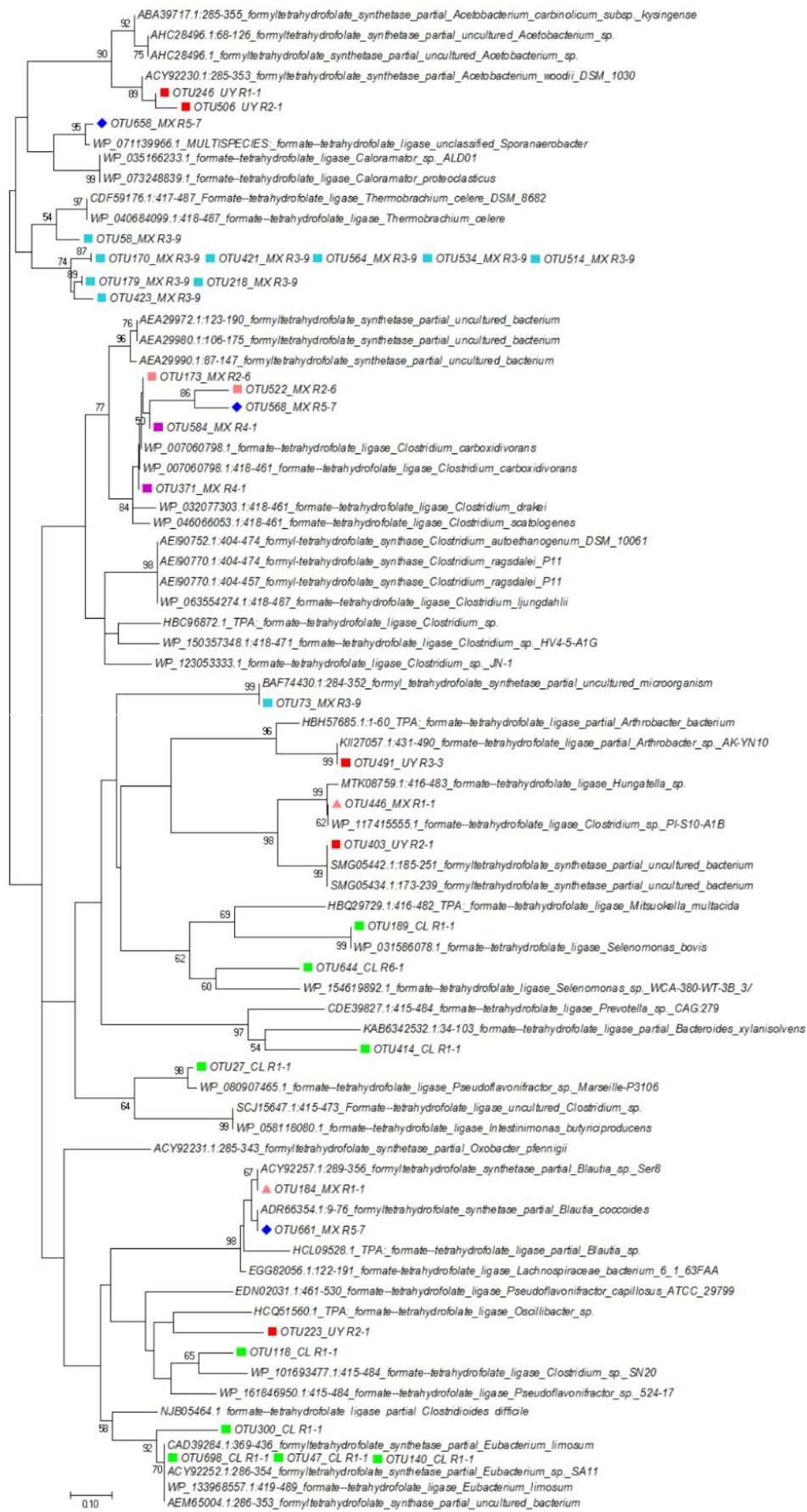


Figure S2. Phylogenetic analysis of deduced FTHFS amino acid sequences. Phylogenetic tree was performed using the Neighbor-Joining Test with 1000 bootstrap replicates. GenBank accession numbers of reference sequences are shown before the species names. Bootstrap values of  $\geq 50\%$  are shown at nodes. The scale bar represents 10% sequence divergence. Phylogenetic tree was performed based on amino acid sequence according to Gagen et al., (2010). For this, representative sequences obtained from BLAST-X were download from GenBank to make sequencing alignment. Amino acid sequences were aligned by ClustalW, a function within MEGA 5.1 (Tamura et al. 2011)

## ANEXO 1

### Puesta a punto de la técnica de qPCR del gen *fthfs*

Para poner a punto el método de qPCR en nuestro laboratorio se testaron varios set de primers. Se utilizó el método descrito en Leaphart y Lovell (2001), con los primers FTHFS-f y FTHFS-r. El tamaño del producto de PCR esperado es de 1,1 kb. También se probaron los primers forward descritos por Xu y col. (2009) *fhs1* y *fhs2*. Xu y col. (2009) reportaron una mejor especificidad de los primers *fhs1*-FTHFS-r (250 pb) en comparación al uso de los primers FTHFS-f-FTHFS-r (1,1 kb) y *fhs2*-FTHFS-r (912 pb). Los primers fueron sintetizados en Macrogen inc. Service.

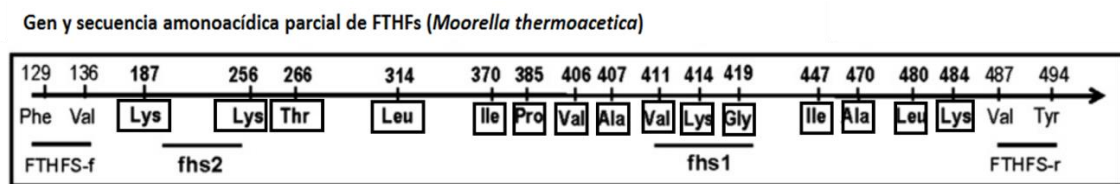


Figura A1. Posiciones de los primers utilizados para PCR en tiempo real para el gen FTHFS en función de los números de aminoácidos correspondientes a la numeración de *Moorella thermoacetica*. En los cuadrados se indican los residuos de aminoácidos claves, que son útiles para diferenciar secuencias FTHFS de acetógenos conocidos de aquellos de otros no acetógenos.

### Curva de calibración gen *fthfs*

Se utilizó como organismo de referencia la cepa de bacteria homoacetogénica *Acetobacterium woodii* DSMZ 1030 (Balch et al., 1977). El ADN fue extraído de un cultivo de *A. woodii* en medio líquido utilizando el kit de extracción de ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research) según las condiciones descritas por el fabricante. Para hacer la curva de calibración se realizó la amplificación del gen *fthfs* mediante PCR según las condiciones descritas en Leaphart y Lovell (2001).

Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes 15,25 µL H<sub>2</sub>O, 2,5 µL Buffer Taq 10X, 1,5 µL MgCl<sub>2</sub> 25 µM, 0,25 µL BSA, 2 µL dNTP mix (2.5 µM), 1 µL primer FTHFS-f (10 µM), 1 µL primer FTHFS-r (10 µM), 0,5 µL de Taq polimerasa (Fermentas) y 1 µL de muestra de ADN. El programa utilizado fue: desnaturalización a 94 °C durante 4 minutos, después 9 ciclos de 94 °C durante 45 s, 63 °C durante 45 s (disminuyendo en 1 C por ciclo) y 72 °C durante 1 minuto. Después de eso, se realizaron 30 ciclos de 94°C durante 45 s, 55°C durante 45 s y 72°C durante 1 min. Finalmente, se realizó un paso de extensión de 72°C durante 5 min. El tamaño del amplicón se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GoodView y utilizando 1 µl de Gene Ruler TM Plus DNA Ladder de 1 Kb (Fermentas) como marcador molecular. Tanto para la

preparación del gel de agarosa como del buffer de electroforesis se utilizó Tris-Borate-EDTA (TBE) 0,5x (Tris-Borate 45mM y 1mM EDTA). La corrida electroforética se realizó a un voltaje de 100 V y colocado por pocillo 10 µL de muestra con 2 µL de loading buffer (Fermentas). Se observaron perfiles de ADN bajo luz UV de un transiluminador (Fotodyne, New Berlin, WI, EE. UU.).

El producto de PCR de 1,1 kb fue ligado al vector TOPO-3.9kb (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido con el inserto se clonó en *E. coli* TOP 10 mediante transformación con shock térmico. Se realizó la extracción de los plásmidos según Engebrecht et al., 1991 y los plásmidos con el gen de *fthfs* inserto fueron utilizados para construir la curva de calibración para el qPCR. Los estándares se prepararon realizando diluciones sucesivas 1:10 del plásmido.

Para realizar la reacción de qPCR se utilizó el kit de Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó la mezcla de reacción en un único tubo considerando el número de muestras y controles para analizar y luego se repartió en los tubos de qPCR. El volumen final por muestra fue de 25 µL donde se agregó 12,5 µL del Mix 2X, 1 µL del primer FTHFS-r y 1 µL del primer FTHFS-f, 5 µL de muestra de ADN y 5,5 µL de H<sub>2</sub>O. El ciclo según se realizó según lo descrito por Leaphart y Lovell (2001). El ensayo fue realizado con el ADN de la cepa de referencia *A. woodii* y también se utilizaron ADN de cepas como control negativo (*Pseudomonas* sp. y *Raoultella* sp. ambas aisladas en nuestro laboratorio).

### *Resultados*

En un principio, se llevó a cabo la amplificación del gen *fthfs* utilizando ADN de la cepa de referencia *A. Woodii* y se logró la amplificación del gen (Figura 2) utilizando los diferentes conjuntos de cebadores con los tamaños de los fragmentos reportados en la bibliografía. Las cepas negativas utilizadas no se amplificaron con los cebadores FTHFS-f y FTHFS-r, lo que indica la especificidad con este conjunto de cebadores.

En el momento de la puesta a punto de la qPCR se observó que el set de primers FTHFS-f y FTHFS-r fueron los que presentaron mejor especificidad y los resultados se muestran en la figura 3. Se detectó amplificación de muestras de ADN correspondientes a las cepas puras y ADN de una comunidad microbiana obtenido de ensayos de actividad homoacetogénica en lote. Esta última muestra presentó amplificación en PCR en Tiempo Real lo cual es consistente con los resultados obtenidos de esta muestra que presentó consumo de H<sub>2</sub> y producción de acetato.

Las curvas de melting muestran un desplazamiento de los picos correspondientes a la muestra de ADN de la comunidad microbiana en comparación con los picos de la cepa pura observados (figura 3). El desplazamiento de la curva puede deberse a las diferentes especies de microorganismos homoacetogénicos que pueden estar presentes en la muestra. Esto es consistente con los resultados de Xu et al. (2009). Sin embargo, observamos que los cebadores FTHFS-f y FTHFS-r presentaron un mejor especificidad en comparación con los cebadores fhs1 y fhs2 y FTHFS-r, por lo que utilizamos el primer conjunto de cebadores para analizar muestras de diferentes biorreactores.

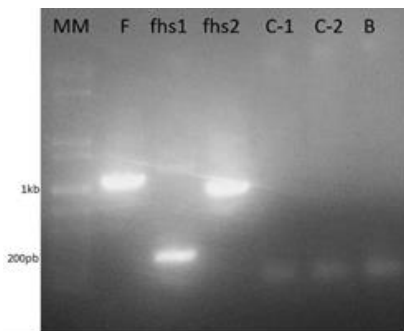


Figura A2. Gel de electroforesis. MM: marcador molecular, F: amplificación con cebadores FTHFS-f y FTHFS-r, fhs1: amplificación con cebadores fhs1 y FTHFS-r, fhs2: amplificación con cebadores fhs2 y FTHFS-r, C-1: *Raoultella* spp usada como control negativo usando cebadores FTHFS-f y FTHFS-r, C-2: control negativo de *Pseudomonas* spp usando cebadores FTHFS-f y FTHFS-r, B: control negativo sin muestra de ADN.

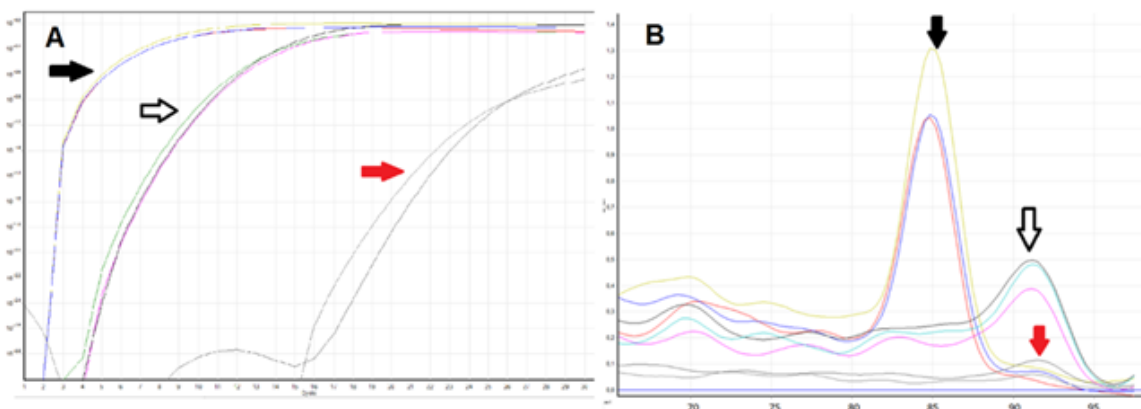


Figura A3. A: Curvas de amplificación. B: Curva de melting. Flecha negra: *A. woodii*, Flecha blanca: muestra de actividad homoacetogénica, Flecha roja: control negativo.

Sin embargo, para los estudios de secuenciación masiva del gen de *fthfs* donde se requieren fragmentos más cortos (menor a 400 pb) se realizó una nested PCR donde el primer par utilizado fue el FTHFS-f y FTHFS-r y posteriormente se realizó una segunda PCR para el par fhs1-FTHFS-r.

## Capítulo 3

## 1. Introducción

### 1.1 Celdas de combustible microbianas

Las celdas de combustible microbianas (en inglés Microbial Fuel Cells, MFC) son dispositivos bio-electroquímicos (BES) que convierten un sustrato en electricidad mediante la actividad metabólica de microorganismos (Ieropoulos et al., 2005).

Un sistema bioelectroquímico es un tipo de biorreactor en el que pueden tener lugar procesos biológicos y electroquímicos para generar electricidad, H<sub>2</sub> u otros productos de interés. Inicialmente, la investigación de BES se centró en la producción de electricidad en las MFC. Los BES se han utilizado en muchas otras aplicaciones, incluida la producción de hidrógeno en celdas de electrólisis microbiana (MEC), la producción química a partir de la reducción de CO<sub>2</sub> en los procesos de electrosíntesis microbiana (MES) y la desalinización de agua en celdas microbianas de desalinización (MDC) (Moscoviz et al., 2016).

Las MFC presentan tres componentes: una cámara anódica que funciona como ánodo, una cámara catódica que funciona como cátodo y un intercambiador de cationes. La cámara anódica es el compartimento de crecimiento, donde se suministran todos los componentes para que crezcan microorganismos adecuados pudiéndose o no agregar mediadores electroquímicos (Figura 1). Las reacciones metabólicas de los microorganismos generan electrones que son dirigidos al ánodo (Min et al., 2005). Por otro lado, en el cátodo debe ocurrir una reacción con alto potencial redox y rápida. En general se forma agua por reducción del oxígeno (cátodos abiertos al aire). Para ello se usa un electrodo de platino que cataliza la reacción entre las moléculas. Sin embargo, este tipo de electrodo no es sustentable económicamente y se han buscado otras alternativas más baratas incluyendo biocátodos (Park et al., 2020).

El intercambiador de iones constituye el compartimento de interconexión del cátodo con el ánodo por donde se completa la reacción. El intercambiador más usado es la membrana de intercambio de cationes Nafion TM que actúa como una membrana de intercambio de protones. Otras membranas también utilizadas son membranas de diálisis, puentes salinos, papel de carbón y capa de Nafion líquida entre otras (Mohan et al, 2008).

### 1.2 ¿Cómo generan electricidad los microorganismos?

Los microorganismos sobreviven y crecen gracias a la energía que obtienen por transferencia de electrones a partir de un dador de electrones. Se pueden dar dos procesos por los cuales ocurre esta transferencia: la respiración y la fermentación.

En la respiración los microorganismos obtienen los electrones de un sustrato y los transfieren a través de una serie de transportadores a un aceptor externo de electrones (oxígeno en el caso de respiración aeróbica, nitrato, sulfato y otros en respiraciones anaeróbicas). Durante esta transferencia se genera un gradiente de protones que luego se disipa con la concomitante formación de ATP. La cantidad de energía obtenida en el proceso está dada por la diferencia de potencial redox entre el dador de electrones (sustrato) y el aceptor de electrones (por ejemplo, el oxígeno) (Madigan, 2000). Estos procesos naturales se utilizan en las MFC para obtener electricidad.

El ánodo de las MFC es un compartimento que carece de aceptores externos de electrones (ambiente anaeróbico sin nitrato ni sulfato) en el cual el electrodo de grafito actúa como aceptor externo de electrones. La cantidad de electricidad producida depende de la diferencia de potencial redox entre el sustrato a degradar y el electrodo (Rahimnejad et al., 2015).

El resultado final es un proceso catalizado por los microorganismos en el cual un sustrato rico en electrones se transforma en: i) electrones que se transfieren al electrodo en el ánodo ii) protones que migran al cátodo, iii) productos oxidados que salen de la MFC. Los electrones fluyen a través del circuito eléctrico hacia el cátodo donde el oxígeno es reducido a agua (en cátodos químicos) o en procesos mediados por microorganismos (en cátodos microbianos) (Clauwaert et al., 2007) (Figura 1).

### *1.3 Microorganismos asociados a la transferencia de electrones al ánodo*

Para que funcione una celda microbiana es fundamental que el bioánodo sea colonizado por microorganismos con capacidad de transferir electrones (microorganismos electroactivos). Dependiendo del inóculo, del sustrato utilizado, de las condiciones de operación de la celda, del diseño de la celda, la comunidad microbiana que se desarrolle va a variar y por lo tanto va a variar el desempeño de la celda (Logan y Regan, 2006; Aelterman et al., 2006). Estos consorcios microbianos se verán afectados por el tipo de sustrato y la presencia o no de aceptores de electrones externos y además por la presencia del ánodo. El electrodo va a forzar a las células a transferir los electrones a la superficie de éste y por lo tanto se va a desarrollar un biofilm eléctricamente activo alrededor del ánodo (Rahimnejad et al., 2015).

En la naturaleza, existe una gran diversidad de microorganismos electroactivos. En particular, organismos de la familia Proteobacteriaceae, Gram negativos, como *Geobacter sulfurreducens* o *Shewanella oneidensis* se han utilizado como microorganismos modelo para investigar los mecanismos de transferencia de electrones en MFC. Sin embargo, también se ha reportado que



algunas bacterias Gram-positivas, como diferentes especies del género *Clostridium*, así como algunas especies de arqueas, levaduras y microalgas pueden transferir electrones a través de su barrera celular a un ánodo o aceptar electrones de un cátodo (Sydow et al., 2014).

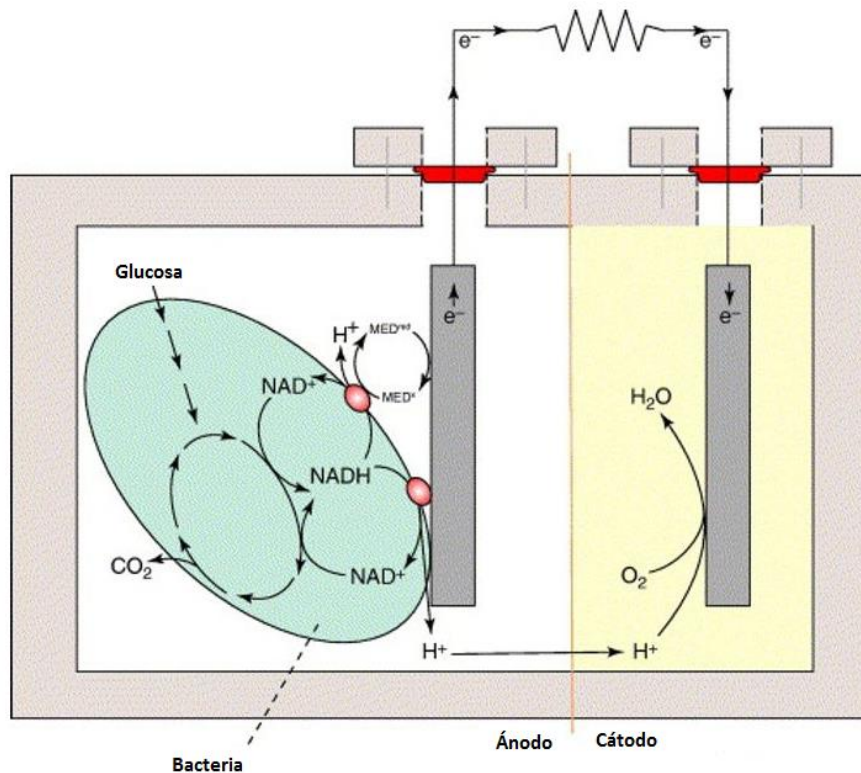


Figura 1. Esquema de cómo opera una celda microbiana de combustible (extraído de Rabaey, Verstraete 2005).

Debido a la gran diversidad de microorganismos que se ha reportado en estas comunidades se piensa que la capacidad de transferir electrones es ubicua en el mundo microbiano. Esto es muy prometedor ya sea para encontrar nuevos grupos de microorganismos electroactivos como para la robustez del sistema. Sistemas diversos garantizarían sistemas más estables y mayor efectividad en la producción de electricidad (Aeltermann, 2009).

A pesar de que las comunidades desarrolladas en las MFC han sido estudiadas por varios autores en los últimos años, aún queda mucho por saber. Cuál es el rol de cada uno de los grupos, la importancia de su presencia y como afectan las condiciones de la celda al desarrollo de éstos son algunos de los temas a dilucidar. En este trabajo se propone profundizar en este aspecto.

#### 1.4 Mecanismos de transferencia de electrones

Los seres vivos conservan energía al trasladar electrones de un sustrato orgánico (donante de electrones) a un receptor de electrones terminal (por ejemplo, oxígeno) a través de reacciones redox en una cadena respiratoria. En la respiración clásica, estas reacciones redox son intracelulares. Sin embargo, en los microorganismos electroactivos, las reacciones de transferencia de electrones se extienden más allá de la superficie celular en un proceso llamado transferencia de electrones extracelular (EET). EET es una característica metabólica única que permite a los microorganismos electroactivos utilizar donantes o aceptores de electrones en estado sólido ubicados fuera de la célula, que de otra forma permanecerían inaccesibles (Schröder et al., 2015). Los microorganismos que 'liberan' electrones en un receptor de electrones extracelular de estado sólido son electrógenos, mientras que los microorganismos que 'recuperan' electrones de un donante de electrones extracelular son electrótrofos. Los electrógenos son capaces de liberar electrones en una superficie de electrodo (ánodo), que es cuantificable como corriente eléctrica positiva, mientras que los electrótrofos recuperan electrones de una superficie de electrodo (cátodo), que es cuantificable como corriente eléctrica negativa (Schröder et al., 2015).

Las bacterias electrogénicas presentan distintos tipos de transferencia de electrones al ánodo. Estos pueden ser directos o indirectos (Figura 2). Los mecanismos directos se caracterizan por la transferencia de electrones directamente al ánodo sin ayuda de mediadores externos. Los electrones se transfieren a través de proteínas de membrana como citocromos tipo c, o prolongaciones denominadas pili que funcionan como “nanowires” (Lovley, 2008). *Shewanella* spp., *Geobacter* spp. presentan este tipo de mecanismo (Malvankar y Lovley, 2012).

Por otro lado, la transferencia indirecta de electrones requiere de la ayuda de mediadores externos o mediadores producidos por los mismos microorganismos. Estos son mediadores redox solubles que transportan los electrones desde la bacteria al electrodo. Microorganismos del género *Shewanella* producen riboflavinas como mediadores para la transferencia de electrones (Marsili et al., 2008).

En el caso de las pilinas (proteínas que conforman el pili o nanowire), en *Geobacter* se encuentran altamente conservados entre las especies de *Geobacter* y formando una línea de descendencia independiente entre las pilinas bacterianas (Reguera et al. 2005; Reguera, 2018). Cuando las pilinas se ensamblan, forman fibras que, en ausencia de metales y cofactores redox, conducen electrones a tasas que exceden en gran medida las tasas de respiración celular (Lampa-Pastirk et al. 2016). Los pili conductores presentes en *Geobacter* presentan estructuras

motivos de superficie flexibles que promueven interacciones electrostáticas con los aceptores de electrones extracelulares y su reducción. Cuando se da la reducción de los óxidos de Fe (III), los pili solubilizan parte del metal como Fe (II) pero también forman magnetita, un mineral magnético mixto que contiene Fe (III) y Fe (II) que permanece unido a los filamentos del pili. El Fe (II) soluble proporciona el donante de electrones para los oxidantes de Fe (II), que reciclan el hierro (Reguera, 2018). Las propiedades semiconductoras del producto de magnetita pueden promover la transferencia de electrones interspecies y el acoplamiento sintrófico del metabolismo de *Geobacter* con bacterias reductoras de nitrato (Kato, et al., 2012).

También se ha observado que la magnetita estimula las interacciones electro-sintróficas entre *Geobacter* y microorganismos metanogénicos (Kato et al., 2012). De hecho, los estudios ambientales de suelos indican la interacción electro-sintrófica entre *Geobacter* y metanogénicas con una alta expresión de los genes de pilina en *Geobacter* (Holmes et al. 2017). Esto sugiere que los pili están mediando directa o indirectamente (a través de magnetita) la transferencia de electrones interespecies con los socios sintróficos. Los nanowires promueven la agregación célula-célula y la formación de biofilms en varias superficies, incluidos los electrodos (Reguera, 2018). El biofilm presenta abundancia de citocromos de tipo C (c-Cyts) y requiere que la red de nanowires conecte electrónicamente las células. Esto permite que los biofilms continúen creciendo a distancias de micrómetro desde una superficie subyacente de aceptación de electrones y recojan la corriente del metabolismo oxidativo colectivo de las células del biofilm (Steidl et al., 2016).

Por otro lado, se ha reportado que en *Shewanella oneidensis* MR-1 la transferencia de electrones extracelular implica interacciones entre cofactores de flavina secretados y c-Cyts especializados de membrana externa. Originalmente se informó que esta bacteria producía nanowires para EET (El-Naggar et al. 2010). Se suponía erróneamente que los nanowires en MR-1 eran pili conductores, como en *Geobacter*, aunque la conductividad de los filamentos de pili de MR-1 se había descartado anteriormente (Reguera et al. 2005). Ahora se ha establecido que los nanowires en MR-1 son extensiones de membrana externa formadas por la fusión de vesículas de membrana externa (Pirbadian et al. 2014).

Por otro lado, las flavinas secretadas son, de hecho, el mecanismo principal para la reducción de aceptores de electrones insolubles por MR-1. Una vez secretados, los cofactores solubles pueden ser utilizados por otros organismos, incluidos los que carecen de mediadores (Prokhorova et al. 2017).

Muchos de los microorganismos electrogénicos son reductores de hierro y manganeso, es decir, utilizan estos metales como aceptores de electrones (Weber et al., 2006). El hierro se encuentra generalmente en la naturaleza como óxido de Fe (III) siendo utilizado como aceptor de electrones para la oxidación de la materia orgánica.

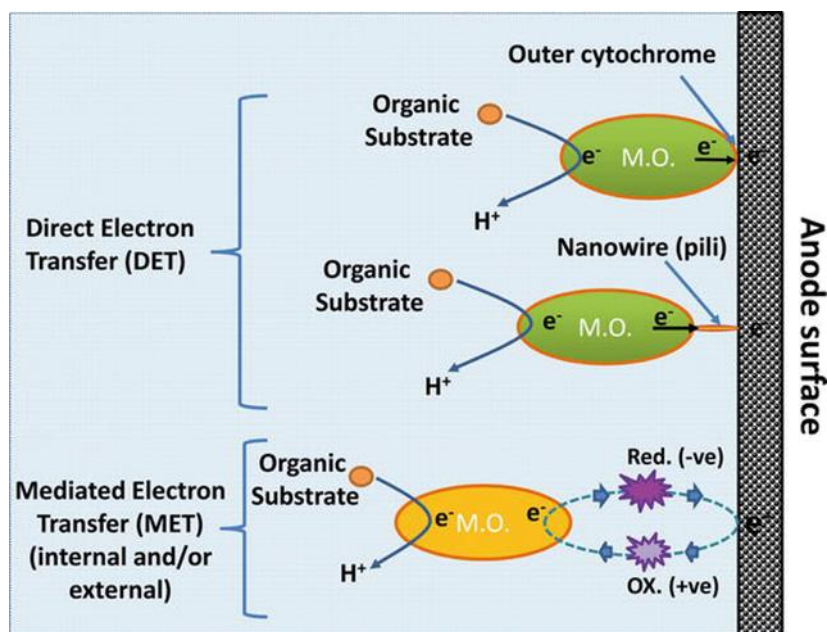


Figura 2. Mecanismos de transferencia de electrones al ánodo. Extraído de Sayed et al., 2017

### 1.5 Utilización de aguas residuales como sustratos para MFCs

Se ha estudiado diversos compuestos orgánicos como fuentes de energía en MFCs. Desde carbohidratos (glucosa, sacarosa, celulosa y almidón), ácidos grasos volátiles (formiato, acetato, butirato), alcoholes (etanol, metanol), aminoácidos, proteínas e incluso compuestos inorgánicos como sulfuros y drenajes de minas (Cheng et al., 2011, Clauwaert et al., 2008, He et al., 2005, Heilmann and Logan, 2006, Ishii et al., 2013, Min et al., 2005, Rabaey y Rozendal 2010).

A pesar de que se ha obtenido buenos rendimientos energéticos con sustratos puros, su aplicación a gran escala aún no es factible económicamente. Por otro lado, la utilización de aguas residuales tiene la ventaja de eliminar un contaminante y obtener energía. En este sentido se ha utilizado un amplio rango de aguas residuales como agua residual doméstica (Liu et al., 2011), agua residual de producción cervecera (Feng et al., 2008), agua residual del reciclado de papel (Huang y Logan, 2008) y efluente de digestores anaeróbicos (Aelterman et al., 2006a).

Sin embargo, la cantidad de electricidad producida es alrededor de 10 veces menor que la producida por sustratos puros (Aelterman et al., 2006a, Clauwaert et al., 2008a) por lo cual es necesario optimizar los procesos. Además, se ha reportado que la composición del agua residual afecta fuertemente el potencial de las MFCs (Rabaey y Verstraete, 2005). El tipo de agua residual afecta la composición microbiana de la comunidad que coloniza el bioánodo por lo cual se afectará el rendimiento del proceso. Los microorganismos que crecen en la superficie del ánodo de los MFC son los factores clave porque son responsables tanto de la degradación de compuestos como de la producción de electricidad. Por tanto, las poblaciones y la actividad de las bacterias en el ánodo son muy importantes para la producción de electricidad (Gao et al., 2014). No todos los microorganismos presentes en el consorcio de biofilms están involucrados en el proceso EET; sin embargo, pueden participar en otras funciones, como proporcionar nutrientes orgánicos a los microbios electrogénicos del consorcio (Lovley, 2008).

En cuanto a las comunidades microbianas que se desarrollan en las celdas, los trabajos basados en secuenciación de genes del ARNr de 16S muestran un predominio de secuencias afiliadas a los filos Proteobacteria, seguido de Firmicutes y secuencias no clasificadas (Aelterman, 2009; Sciarria et al., 2019).

A pesar de que las comunidades desarrolladas en las MFC han sido estudiadas por varios autores en los últimos años, aún queda mucho por saber, en particular la mayoría de los trabajos se basan en técnicas independientes de cultivo por lo cual el rol de los diferentes microorganismos detectados no se conoce.

### *1.6 Antecedentes*

En el marco del tema de producción de hidrógeno, se decidió estudiar la utilización de los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación como alimentación de celdas microbianas. En este contexto el uso de celdas de combustible microbianas sería una forma de complementar la producción de energía luego de la producción de H<sub>2</sub>. En el trabajo de posgrado de Wenzel et al. (2017) se operaron tres celdas de combustible microbianas con diferentes sustratos: 1-suero de queso, 2- acetato y 3-efluente de salida de un reactor de producción de hidrógeno alimentado con suero de queso (Wenzel et al., 2017, Figura 3).

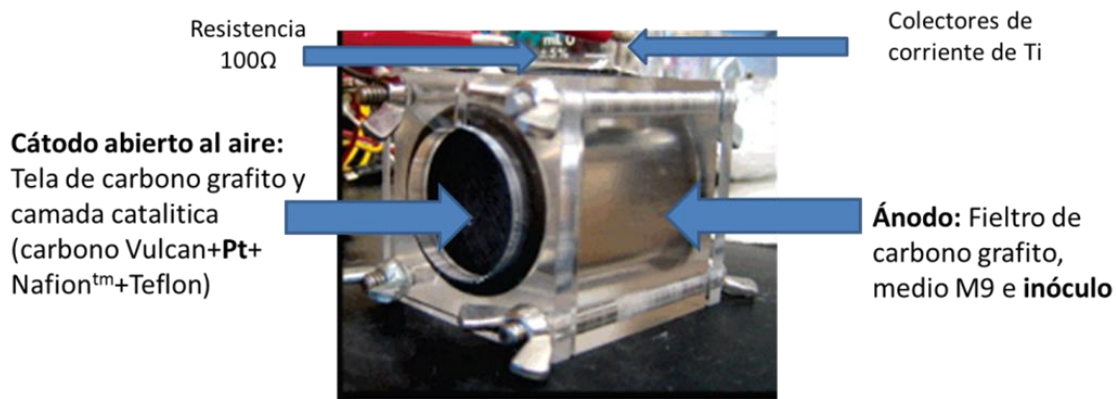


Figura 3. Celda de combustible microbiana operada en el laboratorio

Al finalizar la operación de las celdas se tomaron muestras de los ánodos y se realizó el análisis de la comunidad microbiana mediante secuenciación masiva del gen del ARNr de 16S.

En este trabajo de tesis nos enfocamos a estudiar los microorganismos responsables de la transferencia de electrones en estas celdas. Para estudiar estos microorganismos se aplicaron diferentes métodos para aislar microorganismos electrogénicos. Se logró aislar varios microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Raoultella*, *Geobacter*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Lactobacillus*, *Comamonas* y *Ralstonia*. Los resultados fueron publicados en Wenzel et al. (2017). Uno de los microorganismos aislados se caracterizó como perteneciente al género *Raoultella*. Una especie de este microorganismo se reportó como electrogénica en el trabajo de Kimura et al., 2014. Este género se caracteriza por ser microorganismos aerobios facultativos que utilizan una amplia variedad de azúcares como fuente de carbono y energía. Debido a que este género no ha sido muy estudiado como electrogénico, se decidió profundizar en el estudio de este microorganismo con el objetivo de caracterizar nuestro aislamiento y profundizar en los mecanismos de electrogénesis para determinar su rol e importancia en las celdas.

## 2. Objetivos de este capítulo

Obtener conocimiento que permita mejorar el rendimiento de energía con celdas de combustible microbianas.

### Objetivos específicos

1. Determinar cuáles son los microorganismos responsables de transferencia de electrones en celdas microbianas de cátodo al aire operadas previamente en nuestro laboratorio (Resultados publicados en Wenzel et al., 2017)

2. Profundizar en la caracterización de una cepa electrogénica aislada de previamente de una MFC operada en nuestro laboratorio (Resultados presentados en Fuentes et al., 2020)
3. Determinar cuáles serían los posibles mecanismos de electrogénesis (Resultados presentados en Fuentes et al., 2020)

## REFERENCIAS

Aelterman, P., K. Rabaey, P. Clauwaert, and W. Verstraete. (2006a). Microbial fuel cells for wastewater treatment. *Water Science and Technology* 54:9-15. Cheng, S., & Logan, B. E. (2011). Increasing power generation for scaling up single-chamber air cathode microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 102(6), 4468-4473.

Clauwaert, P., Rabaey, K., Aelterman, P., De Schamphelaire, L., Pham, T. H., Boeckx, P., ... & Verstraete, W. (2007). Biological denitrification in microbial fuel cells. *Environmental science & technology*, 41(9), 3354-3360.

Clauwaert, P., Aelterman, P., De Schamphelaire, L., Carballa, M., Rabaey, K., & Verstraete, W. (2008). Minimizing losses in bio-electrochemical systems: the road to applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(6), 901-913. El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J., ... & Gorby, Y. A. (2010). Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18127-18131.

Feng, Y., Wang, X., Logan, B. E., & Lee, H. (2008). Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(5), 873-880.

Gao, C., Wang, A., Wu, W. M., Yin, Y., & Zhao, Y. G. (2014). Enrichment of anodic biofilm inoculated with anaerobic or aerobic sludge in single chambered air-cathode microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 167, 124-132.

He, Z., Minteer, S. D., & Angenent, L. T. (2005). Electricity generation from artificial wastewater using an upflow microbial fuel cell. *Environmental science & technology*, 39(14), 5262-5267.

Heilmann, J., & Logan, B. E. (2006). Production of electricity from proteins using a microbial fuel cell. *Water Environment Research*, 78(5), 531-537.

Holmes, D. E., Shrestha, P. M., Walker, D. J., Dang, Y., Nevin, K. P., Woodard, T. L., & Lovley, D. R. (2017). Metatranscriptomic evidence for direct interspecies electron transfer between *Geobacter* and *Methanoxithrix* species in methanogenic rice paddy soils. *Applied and environmental microbiology*, 83(9).

Huang, L., & Logan, B. E. (2008). Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(2), 349-355.

- Ieropoulos IA, Greenman J, Melhuish C, Hart J. (2005). Comparative study of three types of microbial fuel cell. *Enzyme Microb Technol*;37: 238–45.
- Ishii, S. I., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Wu, A., Yamanaka, Y., Nealson, K. H., & Bretschger, O. (2013). Identifying the microbial communities and operational conditions for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water research*, 47(19), 7120-7130.
- Kato, S., Hashimoto, K., & Watanabe, K. (2012). Methanogenesis facilitated by electric syntrophy via (semi) conductive iron-oxide minerals. *Environmental microbiology*, 14(7), 1646-1654.
- Lampa-Pastirk, S., Veazey, J. P., Walsh, K. A., Feliciano, G. T., Steidl, R. J., Tessmer, S. H., & Reguera, G. (2016). Thermally activated charge transport in microbial protein nanowires. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Liu, G., Yates, M. D., Cheng, S., Call, D. F., Sun, D., & Logan, B. E. (2011). Examination of microbial fuel cell start-up times with domestic wastewater and additional amendments. *Bioresource technology*, 102(15), 7301-7306.
- Logan, B.E. y Regan, J.M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in microbiology* 14, 512–518. Lovley, D. R. (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current opinion in Biotechnology*, 19(6), 564-571.
- Lovley, D. R. (2017). Syntrophy goes electric: direct interspecies electron transfer. *Annual review of microbiology*, 71, 643-664. Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. (2000). *Brock Biology of Microorganisms*, vol. Prentice-Hall, Upper Saddle River, N. J.
- Malvankar, N. S., & Lovley, D. R. (2012). Microbial nanowires: a new paradigm for biological electron transfer and bioelectronics. *ChemSusChem*, 5(6), 1039-1046.
- Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., & Bond, D. R. (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3968-3973.
- Min, B., Cheng, S. y Logan, B.E. (2005). Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Research* 39, 1675-1686.
- Mohan, S. V., Mohanakrishna, G., & Sarma, P. N. (2008). Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *International journal of hydrogen energy*, 33(9), 2156-2166
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., & Bernet, N. (2016). Electro-fermentation: how to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends in biotechnology*, 34(11), 856-865. Park, D. H., & Zeikus, J. G. (2003). Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation. *Biotechnology and bioengineering*, 81(3), 348-355.



- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., ... & Gorby, Y. A. (2014). *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12883-12888.
- Prokhorova, A., Sturm-Richter, K., Doetsch, A., & Gescher, J. (2017). Resilience, dynamics, and interactions within a model multispecies exoelectrogenic-biofilm community. *Applied and environmental microbiology*, 83(6).
- Rahimnejad, M., Adhami, A., Darvari, S., Zirepour, A., & Oh, S. E. (2015). Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: a review. *Alexandria Engineering Journal*, 54(3), 745-756.
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis—revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 706-716.
- Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*, 23(6), 291-298.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098-1101.
- Reguera, G. (2018). Microbial nanowires and electroactive biofilms. *FEMS microbiology ecology*, 94(7), fiy086.
- Sayed, E. T., & Abdelkareem, M. A. (2017). Yeast as a biocatalyst in microbial fuel cell. *Old Yeasts-New Questions. InTech*, 41-65.
- Sciarria, T. P., Arioli, S., Gargari, G., Mora, D., & Adani, F. (2019). Monitoring microbial communities' dynamics during the start-up of microbial fuel cells by high-throughput screening techniques. *Biotechnology Reports*, 21, e00310.
- Schröder, U., Harnisch, F., & Angenent, L. T. (2015). Microbial electrochemistry and technology: terminology and classification. *Energy & Environmental Science*, 8(2), 513-519.
- Steidl, R. J., Lampa-Pastirk, S., & Reguera, G. (2016). Mechanistic stratification in electroactive biofilms of *Geobacter sulfurreducens* mediated by pilus nanowires. *Nature Communications*, 7, 12217.
- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., & Holtmann, D. (2014). Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(20), 8481-8495.
- Weber, K. A., Achenbach, L. A., & Coates, J. D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 752-764.
- Wenzel, J., Fuentes, L., Cabezas, A., & Etchebehere, C. (2017). Microbial fuel cell coupled to biohydrogen reactor: a feasible technology to increase energy yield from cheese whey. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(6), 807-819.

### **Trabajo 3. Microbial fuel cell coupled to biohydrogen reactor: a feasible technology to increases energy yield from cheese whey**

#### **Objetivos específicos abarcados en este trabajo**

En el artículo de Wenzel et al., 2017 se muestran los resultados de las operaciones de tres MFC operadas con distinto sustrato. El objetivo del trabajo fue estudiar la producción de energía en una celda de combustible microbiana con efluente producido por la fermentación oscura de suero de queso y comparar su desempeño con dos celdas de combustible microbianas, una alimentada con suero de queso y un control alimentado con acetato. En este trabajo se abarca el siguiente objetivo específico:

Determinar cuáles son los microorganismos responsables de transferencia de electrones en celdas microbianas de cátodo al aire operadas previamente en nuestro laboratorio

#### **Contribución del autor de la tesis**

El trabajo del autor se basó en colaborar con la operación de las celdas, realizar los aislamientos de los microorganismos presentes en el bioánodo y la caracterización de estos microorganismos mediante la secuenciación del gen de bacteria ARNr 16S así como la interpretación de los resultados.

**Microbial fuel cell coupled to biohydrogen reactor: a feasible technology to increase energy yield from cheese whey**

Wenzel J<sup>1</sup>, Fuentes L<sup>1</sup>, Cabezas A<sup>1\*</sup>, Etchebehere C<sup>1</sup>

1 Microbial Ecology Laboratory, Biochemistry and Genomics Department, Biological Research Institute "Clemente Estable", Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay. Microbiology Department,

Paper publicado en **Bioprocess and Biosystems Engineering** DOI 10.1007/s00449-017-1746-6

\* Correspondence to: Angela Cabezas

Microbial Ecology Laboratory, Biochemistry and Genomics Department, Biological Research Institute "Clemente Estable", Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay. Microbiology Department,

E-mail: acabezas@iibce.edu.uy

Telephone: (598) 2487-1616. Fax: (598) 2487-5461

## Abstract

An important pollutant produced during the cheese making process is cheese whey which is a liquid by-product with high content of organic matter, composed mainly by lactose and proteins. Hydrogen can be produced from cheese whey by dark fermentation but organic matter is not completely removed producing an effluent rich in volatile fatty acids. Here we demonstrate that this effluent can be further used to produce energy in microbial fuel cells. Moreover, current production was not feasible when using raw cheese whey directly to feed the microbial fuel cell. A maximal power density of 439 mW/m<sup>2</sup> was obtained from the reactor effluent which was 1000 times more than when using raw cheese whey as substrate. 16S rRNA gene amplicon sequencing showed that potential electroactive populations (*Geobacter*, *Pseudomonas* and *Thauera*) were enriched on anodes of MFCs fed with reactor effluent while fermentative populations (*Clostridium* and *Lactobacillus*) were predominant on the MFC anode fed directly with raw cheese whey. This result was further demonstrated using culture techniques. A total of 45 strains were isolated belonging to 10 different genera including known electrogenic populations like *Geobacter* (in MFC with reactor effluent) and known fermentative populations like *Lactobacillus* (in MFC with cheese whey). Our results show that microbial fuel cells are an attractive technology to gain extra energy from cheese whey as a second stage process during raw cheese whey treatment by dark fermentation process.

Keywords: Microbial fuel cell, cheese whey, biohydrogen, microbial community, amplicon sequencing, anode bacteria isolation

## 1. Introduction

Cheese whey is a liquid by-product that remains after the cheese making process and represent up to 95% of the initial milk volume and is considered an important pollutant partially due to its high chemical oxygen demand (0.8–102 gCOD/L) [1]. Dry matter in cheese whey accounts up to 7% and it is composed by lactose, proteins, salts, lipids, lactic acid, citric acid and nitrogenated compounds such as urea and uric acids [2]. The typical treatment for this wastewater are anaerobic lagoons, but more efficient technologies as nutrient and water recovery or anaerobic digestion have been explored and applied at full scale [1]. One interesting alternative for cheese whey treatment is dark fermentation where biohydrogen is produced, which we and other authors have demonstrated feasible [3–10]. However, this option presents some limitations like strong variations in hydrogen yields and the incomplete degradation of organic matter remaining as volatile fatty acids which indicates that further research is necessary to obtain a stable and efficient system [4, 9, 11]. Within bioelectrochemical systems, microbial fuel cells (MFC) are emerging as a new alternative for energy recovery during treatment of wastewaters. In MFCs, the organic matter is converted to CO<sub>2</sub>, protons and electrons by microorganisms as part of their metabolism using the anode electrode as a final electron acceptor. The released electrons are transferred to a current collector and migrate through an external resistor to the cathode generating electric current. At the cathode, oxygen reduction to water is catalyzed using the electrons and protons produced on the anode [12]. In a MFC, the development of a biofilm on the anode surface is essential for an improved bio-catalysis and electron transfer to get efficient current production. Microbial communities developed on MFC anodes are very diverse and no typical MFC microbial community has been described [13]. Several phylogenetic groups have been found to be predominant in MFCs, however, some genera like *Geobacter* and *Pseudomonas* are commonly found in mixed culture MFC anodes and are associated with current production due to their feasibility of current generation under axenic conditions [14]. Nevertheless, highly diverse communities are detected on anodes [15, 16] and therefore, predicting electrical power production performances through microbial ecology analysis is still a challenge. MFCs have been proposed as a possible technology to harness energy from the remaining organic matter after the dark fermentation process for effluents like cellulose, organic solid wastes, cane molasses, crude glycerol and sucrose [17–21]. To our knowledge, the effluent of dark fermentation of cheese whey has never been used for energy production in MFCs. But, several studies report the use of cheese whey to produce energy in MFCs generally with low coulombic efficiencies [22–27]. A predominance of alternative pathways instead of current production were inferred through the low coulombic efficiencies obtained and cheese whey

sterilization has been recommended to improve MFC performance [23, 24]. No analysis of the microbial communities associated to anodes of cheese whey fed MFCs have been reported which is relevant to understand the scarce coulombic efficiencies obtained. Our focus was to study the feasibility of energy production with effluent produced by dark fermentation of cheese whey in microbial fuel cells and to compare its performance with two microbial fuel cell, one fed with cheese whey and a control fed with acetate. We intend to explain the performance of the microbial fuel cells, in terms of current production and coulombic efficiency, through the analysis of the microbial communities developed on the anodes and the isolation of bacteria from the anodes.

## 2. *Materials and methods*

### 2.1 *MFC set-up and operation*

Three single chamber air cathode MFCs containing graphite felt anodes were built using acrylic according to Liu and Logan (28). Each MFC consisted of a 4 cm long by 3 cm in diameter chamber with a measured working volume of 25 mL after installing the electrodes. Graphite felt anodes (7 cm<sup>2</sup>) (Alfa Aesar) were connected to a 3 cm titanium wire as current collector. The cathodes (7 cm<sup>2</sup> total exposed surface area) were made by applying a platinum catalyst (0.36 mg Pt/cm<sup>2</sup>, Electrodes and more-US) and a Nafion membrane layer (Dupont) on the liquid-facing side of a carbon cloth (Fuel Cell Earth). Five PTFE (SIGMA–Aldrich) diffusion layers were added on the air-facing side [29]. An external resistance of 200  $\Omega$  was used to connect anode and cathode electrodes as 218  $\Omega$  was shown to produce maximum power in a similar MFC fed with acetate [30]. Medium was recirculated using a peristaltic pump (i150, iPumps-UK) with a flow of 3 mL/min between the anodic chamber and an auxiliary 120 mL flask. MFCs were inoculated (10% v/v) with liquid from the anodic chamber of a tubular MFC operated in LabMet, Belgium. This MFC was inoculated with activated sludge and fed with acetate for more than 2 years. The liquid from the anodic chamber was stored at 4 °C for 6 months before using it as inoculum in the MFCs. All MFCs were initially fed with mineral medium containing (per liter) 5.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g NaCl, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.24 g MgSO<sub>4</sub>, 0.011 g CaCl<sub>2</sub>, 1 mg FeSO<sub>4</sub>, 0.07 mg ZnCl<sub>2</sub>, 0.1 mg MnCl<sub>2</sub>, 0.006 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.002 mg CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.024 NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.036 mg Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.238 mg CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O and 2.5 gCOD/L of sodium acetate as organic substrate. Sodium acetate was replaced by complex substrates (2.5 gCOD/L) when the voltage response after each sodium acetate addition was similar (aprox. 2–3 months). The complex substrates used were raw cheese whey for MFC 1 and the effluent from a biohydrogen producing reactor fed with cheese whey for MFC 2 (full description of the these substrates can be found in the following section). The

complex substrates were previously diluted in the mineral medium to reach a concentration of 2.5 gCOD/L for MFC 1 and MFC 2, respectively. A third MFC was operated with sodium acetate (2.5 gCOD/L) as substrate throughout the whole experiment and was used as control MFC. A complete operation cycle was considered from the feeding start until a cell potential value below 5 mV. MFCs were operated at 30 °C in a thermostatically controlled room and the initial pH was 7.2. Samples (1 mL) were taken from the anodic chamber of the MFCs for reducing sugars and volatile fatty acids measurements.

### *2.2 Complex substrates used to fuel the MFCs*

Raw cheese whey was provided from a dairy factory in Canelones, Uruguay. The average composition of the cheese whey was as follows: chemical oxygen demand (COD) 67,000 mg/L (standard deviation 6000 mg/L, 66 samples); total nitrogen 1335 mgN/L; total phosphorus 310 mg/L; and pH 4.7 (standard deviation 0.9, 66 samples) [3]. The concentration of reducing sugars was 54.7 g/L (61.4 gCOD/L assuming reducing sugars as lactose) which represents 92% of the total COD. The main volatile fatty acid (VFA) was lactic acid with a concentration of 0.59 g/L. The biohydrogen reactor effluent was obtained from a lab scale biohydrogen producing reactor fed with the aforementioned raw cheese whey operated at the BioProA laboratory (Engineering Faculty, University of the Republic in Uruguay). The COD of the reactor effluent was 25,000 mg/L (measured by BioProA group according to standard methods [31]). No lactose was detected in the reactor effluent and the main VFAs were acetic (8.7 g/L) and butyric (6.6 g/L). Both complex substrates were homogenized, dispensed in 20 mL falcon tubes and stored at -20 °C until use.

### *2.3 Chemical analyses*

Volatile fatty acids concentration was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with a Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (300 × 7.8 mm) column (Phenomenex) and a diode array detector (Waters 2998) at the HPLC platform of the Biological Research Institute "Clemente Estable" (Uruguay). Prior to the analysis protein content was precipitated for each sample adding a final concentration of 1 M perchloric acid (Sigma Aldrich) and centrifuged 5 min at 5000g. The pellet was discarded and the supernatant was filtered through 0.22 µm filter (Sartorius) Reduced sugar concentration was measured by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [32] and the calibration curve was performed using lactose.

### *2.4 Electrochemical measurements and coulombic efficiency calculation*

Cell potential was registered every 15 min using a datalogger (Keithley, USA) connected to a personal computer. The coulombic efficiency (CE), the ratio between the charge in coulombs

recovered and total charge in coulombs in the substrate, was calculated as previously described for the best operation cycle after adding the complex substrate [33]. Polarization curves were performed in a three arrange electrodes using a PGZ 301 Voltalab potentiostat and the Voltmaster 4 software (Radiometer Analytical, France) using the working cell volume (25 mL) to calculate the power density by cubic meter or the anode geometrical area to calculate the power density by square meter. The reference and counter electrode were connected to the cathode and the working electrode was connected to the anode. Before performing polarization curves, the cell was operated under open circuit conditions for a period of 15 min. The cell resistance was gradually decreased to obtain the short circuit value. The power density was calculated assuming an ohmic like system.

## *2.5 Microbial community analysis*

### *2.5.1 DNA extraction and amplicon sequencing*

Microbial communities of the bio-anode biofilm were analyzed at the end of the experiments. Anode graphite felts were washed with sterile distilled water, chopped in fine pieces and the genomic DNA was extracted using the Power Soil DNA Kit (Mo Bio laboratories, Carlsbad, CA, USA) as described by the manufacturer instructions DNA was dehydrated with 95% ethanol and submitted to the Institute for Agrobiotechnology Rosario (INDEAR, Rosario, Argentina) for 454-pyrosequencing analysis (Roche Genome Sequencer FLX Titanium system). A fragment of 16S rRNA genes, corresponding to V3 and V4 regions, were amplified with the primer set 515 forward and 806 reverse [34]. Sequences were analyzed using the Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) software [35]. Chimera detection was performed with USEARCH 6.1 software. De novo OTUs picking and taxonomic assignment were defined using the UClust algorithm on the basis of 97% sequence identity with Greengenes database reference sequences. Sequence alignments were performed with PyNAST. Alpha (Dominance, Shannon, Simpson and Equitability) and Beta (weighted-Unifrac and principal component analysis) diversity analysis were performed with the QIIME software. Raw sequences were deposited at NCBI-SRA database (Accession number SRX958299).

### *2.5.2 Anodic bacteria isolation and 16S rRNA gene sequencing*

Anode samples from MFC 1 (raw cheese whey), MFC 2 (biohydrogen reactor effluent) and the control MFC (acetate) were suspended in sterile PBS buffer and treated with sonication (15 s, 200 kHz) to detach bacteria from the anodes. 1mL from the anode suspensions were inoculated into 25 mL vials with 10 mL of different media (Table 1). The vials were sparged with nitrogen



gas (99.99%, The Linde Group, Uruguay) to ensure anaerobic conditions. Successive dilutions were made and then two strategies were followed. (1) Direct plate isolation from dilutions  $10^{-5}$  to  $10^{-8}$ ; (2) dilution to extinction. Vials were incubated until growth was observed and plate isolation was performed from the last vial showing growth. For isolation, the media were supplemented with agar (1.3%, Difco). Plates were incubated under aerobic and anaerobic conditions. For anaerobic conditions, anaerobic bags (Anaerocult® A mini, Merck, Germany) were used. Different media were selected to cover diverse physiological groups, focusing on anaerobic respiring bacteria which includes several exoelectrogenic bacteria. *Fusibacter* media (DSM 853) was included due to the high abundance of *Fusibacter* on anodes detected by 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Geobacter* media (DSM 579) was included as several species within *Geobacter* are exoelectrogenic. Media and culture conditions are shown in Table 1.

Table 1. Isolated strains from anodes. Media and culture conditions used to isolate bacteria from the anodes.

Media and incubation conditions <sup>a</sup>	MFC	Strain
Anaerobic. LB with iron <sup>b</sup> as electron acceptor	1	FE1, FE5, FE7 FE2, FE8
Aerobic. M9 media with acetate <sup>c</sup> as electron donor	1	O1 O2, O3, O5, O13, O7 O17
	2	O15, O16, O18, O19, O20 O12, O23 O22 O26
	Control	O8, O11, O10, O6, O14 O9 O4
Anaerobic. M9 media with acetate as electron donor and nitrate <sup>d</sup> as electron acceptor	Control 2	N1, N4, N7, N9, N11, N14 N2, N3, N5, N6, N10 N8, N12
Anaerobic. <i>Fusibacter</i> media	2	F
Anaerobic. <i>Geobacter</i> media with acetate as electron donor and iron <sup>b</sup> as electron acceptor	2	B, NV NAR

<sup>a</sup>All cultures were incubated at 30 °C

<sup>b</sup>Iron was added as ferric citrate 20 mM

<sup>c</sup>Acetate was added as sodium acetate 1 g/L

<sup>d</sup>Nitrate was added as potassium nitrate 20 mM

Colony PCR was performed to amplify the 16S rRNA gene by resuspending a colony in 100µL of sterile Milli-Q water and heated 15 minutes at 100 °C and then at -20 °C for 20 minutes. The suspension was centrifuged 15 minutes at 12000 rpm and 2µL were used for the PCR reaction. PCR was performed using the general Bacteria primers, 27F and 1492R as described previously

[3, 36]. PCR products were verified in 1% agarose gel and sequenced in Macrogen Sequencing Service (Korea). Sequences were deposited at NCBI GeneBank database under the following accession numbers: N1 KX898513, N2 KX898514, N3 KX898515, N4 KX898516, N5 KX898517, N6 KX898518, N7 KX898519, N8 KX898520, N9 KX898521, N10 KX898522, N11 KX898523, N12 KX898524, N14 KX898525, O4 KX898526, O22 KX898527, O23 KX898528, O26 KX898529, FE1 KX898530, FE2 KX898531, FE5 KX898532, FE7 KX898533, FE8 KX898534, O1 KX898535, O2 KX898536, O3 KX898537, O5 KX898538, O6 KX898539, O7 KX898540, O8 KX898541, O9 KX898542, O10 KX898543, O11 KX898544, O12 KX898545, O13 KX898546, O14 KX898547, O15 KX898548, O16 KX898549, O17 KX898550, O18 KX898551, O19 KX898552, O20 KX898553, B KX898554, F KX898555, NAR KX898556, NV KX898557.

### *2.6 Phylogenetic analysis*

Phylogenetic trees were constructed with sequences from the most abundant OTUs presented in Table 2 and one phylogenetic tree with the 16S rRNA gene sequences of the isolated strains. The phylogenetic trees were constructed using the software MEGA 5.2 [37]. Sequences were aligned using clustalW together with sequences downloaded from GeneBank database (National Center for Biotechnology Information-NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The phylogenetic relationship between sequences was determined using the Neighbor-Joining method [38], and the bootstrap consensus tree was inferred from 1000 replicates [39]. For the OTUs 225 positions were considered while for the isolated strains the positions considered were 493.

## *3. Results*

### *3.1 Electrochemical performance of the microbial fuel cells*

After changing the influent from acetate to the complex substrate, a higher potential was obtained for MFC 2 (fed with biohydrogen bioreactor effluent) compared to MFC 1 (fed with raw cheese whey) (Fig. 1). The maximum cell potential obtained for MFC 2 was 0.209 V in the first operation cycle with reactor effluent but dropped to 0.142 and 0.097 V in the second and third cycles, respectively (Fig. 1). MFC 1 reached only 0.035 V in the first feed cycle with raw cheese whey and this potential was never exceeded in subsequent cycles (Fig. 1). The control MFC (fed with acetate) reached almost a constant potential close to 0.2 V in every successive feed cycle (Fig. 1). Polarization curves performed at the last cycle of operation showed that MFC 2 produced higher optimal current density than MFC 1 (Table 2). However, both produced less optimal current density than the control. When comparing power densities, MFC 2 produced 1000 times more power density than MFC 1 and the control produced a maximum power density

1.2 times higher than MFC 2 (Table 2). The coulombic efficiency (CE) (calculated from the current measured during MFC operation) obtained for MFC 2 was 24%, whereas for MFC 1 the CE was 14% but, the COD removal in MFC 1 was only 42%. Both CEs were lower than the CE of the control MFC (46%) (Table 2). To determine if the current was related to the consumption of organic compounds present in the complex substrates reducing sugars and volatile fatty acids were measured. Reducing sugars were the main substrate at the beginning of the operation cycle in MFC 1 and were consumed producing VFAs (mainly acetic) which remained in the MFC until the end of the batch cycle (Fig. 2a). In MFC 2 no reducing sugars were detected in the substrate and the main VFAs present initially were acetic, butyric and propionic acids. After one operation cycle, all measured VFAs were completely consumed. The pH in MFC 1 decreased reaching a value of 4.7 at the end of the batch cycle while pH remained close to 7 until the end of the experiment in MFC 2 (Fig. 2).

Table 2: Electrochemical performance determined as current densities, power densities and coulombic efficiencies of the operated microbial fuel cells are presented.

MFC	Substrate <sup>a</sup>	Current density (A/m <sup>2</sup> ) <sup>c</sup>	Power density (mW/m <sup>2</sup> ) <sup>c</sup>	Coulombic efficiency (%) <sup>c</sup>	COD removal (%) <sup>d</sup>
MFC 1	Cheese whey	1.37	0.34	14	41
MFC 2	Reactor effluent <sup>b</sup>	1.71	439	24	100
Control	Acetate	2.17	504	46	100

<sup>a</sup>The concentration of each substrate was 2.5 gCOD/L

<sup>b</sup>The effluent used was obtained from a biohydrogen producing reactor fed with cheese whey

<sup>c</sup>Optimum values are presented obtained from polarization curves

<sup>d</sup>Calculated theoretically from VFA and lactose concentrations

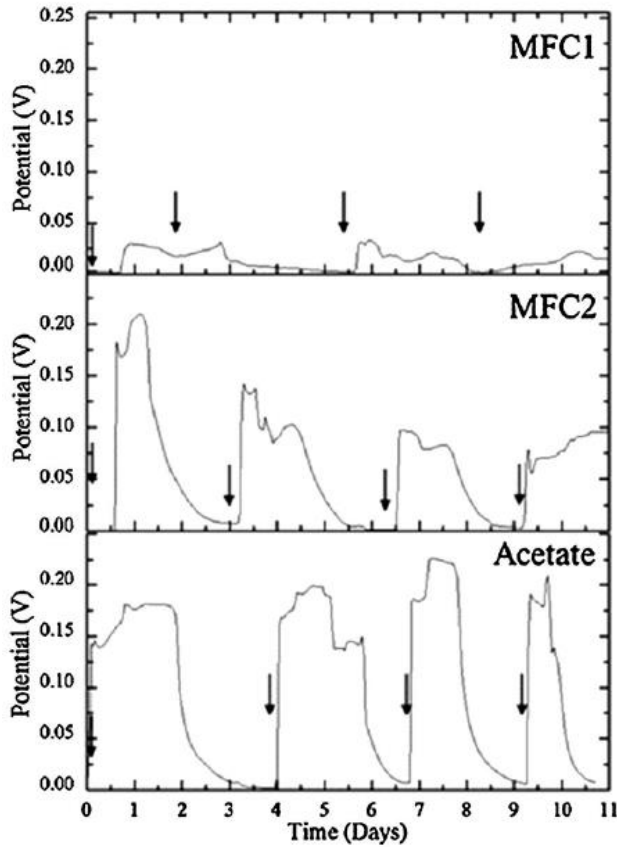


Figure 1. Potential response for MFC1 and MFC2 compared to the control in consecutive batch cycles. MFC1 was operated with cheese whey, MFC 2 with reactor effluent and the control with acetate, Time 0 indicates the moment when the influent was changed from acetate to the complex substrate. Arrows indicate consecutive substrate additions.

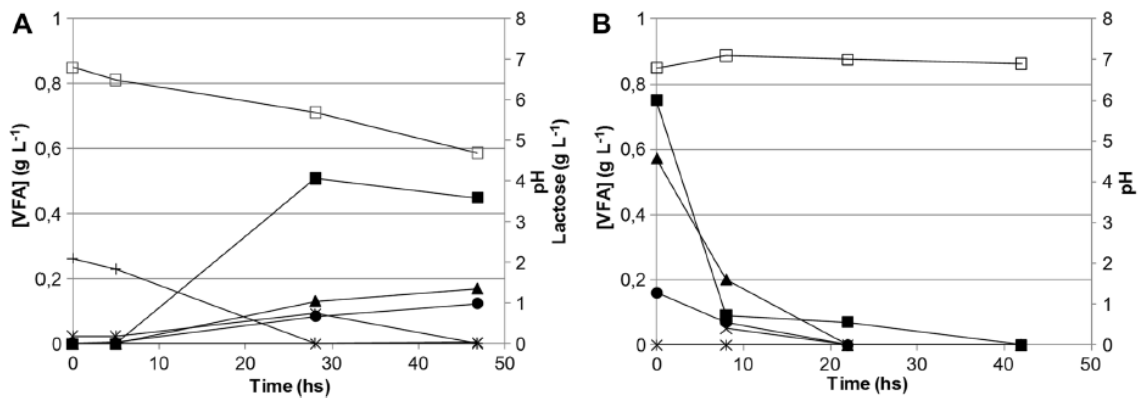


Figure 2. Volatile fatty acids (VFA) concentration, lactose concentration (measured as reducing sugars) and pH during one batch cycle for MFC 1 (a) and MFC 2 (b). Lactose is only shown for MFC 1 as it was not detected in MFC 2. pH (open square), Lactose (plus symbol), Acetic acid (closed square), Propionic acid (closed circle), Lactic acid (asterisk), Isobutyric acid (multiple symbol), Butyric acid (closed triangle). For the control MFC acetate was completely consumed (data not shown)

### 3.2 Microbial community analysis of anodes

To understand the differences in the electrochemical performance of the MFCs through the anode microbial communities, we performed 16S rRNA gene based high throughput sequencing analysis. A total of 4877, 5334 and 2673 high-quality reads (average length of 225 bp) were obtained for MFC 1, MFC 2 and control MFC, respectively. The number of OTUs at 3% distance were 211 for MFC 1, 213 for MFC 2 and 155 for the control MFC. Alpha diversity indexes calculated from pyrosequencing data showed that the microbial community on the anode from MFC 2 presented higher diversity (Shannon indexes) and evenness (Dominance index) than the microbial communities of the anodes from the MFC1 and control MFC (MFC 1: 2.879 and 0.193; MFC 2: 3.616 and 0.049 and control MFC 3.073 and 0.097, Shannon and Dominances indexes, respectively). Weighted UniFrac analysis followed by principal component analysis showed that the microbial communities from the anode of MFC 2 and control MFC were phylogenetically more similar than the community from the anode of MFC 1 (Fig. 3a). The microbial communities from MFC 2 and control MFC anodes share 43 OTUs while only 16 OTUs are shared by the microbial communities of MFC 1 anodes and the control MFC anodes (Fig. 3b). This indicates a strong selective pressure of the substrates used on the microbial communities developed on the anodes. The OTUs analyzed at phylum level were grouped into 28 phyla being the main phyla Proteobacteria and Firmicutes (Fig. 4). Firmicutes was clearly predominant in MFC 1 anodes accounting for 73% of the total sequences, whereas both Proteobacteria and Firmicutes were predominant in MFC 2 anodes (31 and 42%, respectively) and the control MFC anodes (29 and 38%) (Fig. 4). The composition within Proteobacteria showed a predominance of the classes Alpha, Beta, Gamma and Delta Proteobacteria on the anodes of all MFCs and Firmicutes was dominated by Bacilli and Clostridia. However, relative abundances of each class changed depending on the MFC substrate (Fig. 4). Main OTUs within Proteobacteria were different in the different MFC anodes indicating the strong influence of the substrate used. One OTU (429) predominant in the control MFC (19.2%) and in MFC 2 (6.1%) was, according to the phylogenetic tree, closely related to *Geobacter anodireducens* (Table 3; Fig. S1). Several species within the genus *Geobacter* have been shown to be exoelectrogenic bacteria and OTU 429 might be relevant for current production in MFC 2 and the control MFC. OTU 123 classified according to the phylogenetic tree within the genus *Pseudomonas*, was more abundant in MFC 2 than OTU 429 (8.7 vs 6.1%) (Table 3; Fig. S1). *Pseudomonas aeruginosa* has been reported as electroactive and the genus *Pseudomonas* has been frequently found, using rRNA 16S amplicon sequencing, on anodes of MFCs indicating that OTU 123 might also be related to current production in MFC 2 [40]

In MFC 2 and the control MFC, predominant OTUs within Firmicutes were classified, according to the phylogenetic analysis as belonging to the genera *Fusibacter*, *Clostridium*, *Dethiosulfatibacter* and the family Peptostreptococaceae and *Dethiosulfatibacter* sp. (Table 3, Fig. S1). A completely different community was detected on the anode of MFC 1 where the predominant OTUs were classified as belonging to the genera *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Clostridium* (Table 3, Fig. S1).

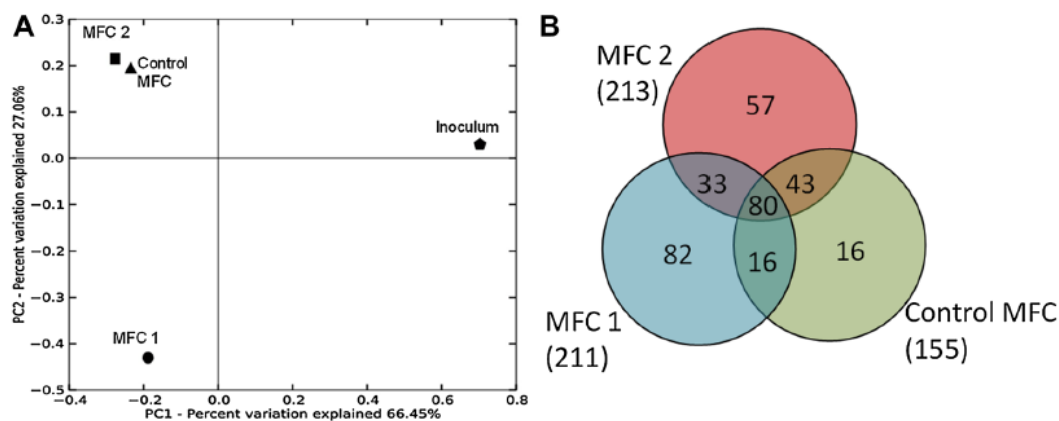


Figure 3. A) Weighted UniFrac analysis with principal component analysis (PCA) of pyrosequencing results for MFC 1 (fed with raw cheese whey), MFC 2 (fed with biohydrogen reactor effluent), the control MFC (fed with acetate) and the inoculum. The percentage of variation explained is presented on each axis. B) Overlap of OTUs in bacterial communities from MFC 1, MFC 2 and control MFC. The number in parentheses indicates the total number of OTUs in the community

The microbial communities developed on the anodes differ strongly from the microbial community of the inoculum used, presenting high abundance of three OTUs classified within the phylum *Fusobacteria*, and the genera *Rhodopseudomonas* and *Arcobacter* which were not present in the microbial communities of the MFC anodes indicated a strong influence of the substrate and the MFC operation on the anode community selection (Table 3, Fig S1).

Table 3. Relative abundance of major OTUs (>2% in at least one sample) detected on anodes of MFC1, MFC 2 and control MFC as well as the inoculum used. Phylogeny is shown based on phylogenetic tree obtained using MEGA

Phylogenetic group	OTU	Relative abundance (%)			
		Inoculum	MFC 1	MFC 2	Control MFC
<b>Firmicutes</b>					
Bacilli	OTU 120 ( <i>Lactobacillus</i> )	0	3.8	0	0
Bacilli	OTU 513 ( <i>Streptococcus</i> )	0	9.5	0	0
Clostridia	OTU 95 ( <i>Clostridium</i> )	0	27.8	0	0
Clostridia	OTU 196 ( <i>Clostridium</i> )	0.2	11.2	0	0
Clostridia	OTU 505 (Unc. <i>Peptostreptococcaceae</i> )	0	0.1	5.2	0.1
Clostridia	OTU 22 (Unc. <i>Clostridiaceae</i> )	0.1	1.5	2.7	0.9
Clostridia	OTU 52 ( <i>Fusibacter</i> )	0.2	3.8	12.4	10.7
Tisierella	OTU 340 ( <i>Dethiosulfatibacter</i> )	0.1	0.7	2.7	12.1
Negativicutes	OTU 288 (Unc. <i>Veillonellaceae</i> )	0	3.2	0	0
<b>Proteobacteria</b>					
Alphaproteobacteria	OTU 556 ( <i>Rhodopseudomonas</i> )	5.3	0.4	0.1	0.5
Betaproteobacteria	OTU 298 ( <i>Nitrosomonas</i> )	0	0.1	4.8	2.2
Betaproteobacteria	OTU 577 ( <i>Thauera</i> )	0	0	2.3	0
Gammaproteobacteria	OTU 123 ( <i>Pseudomonas</i> )	0.1	0.1	8.7	0.1
Deltaproteobacteria	OTU 429 ( <i>Geobacter</i> )	0	1.8	6.1	19.2
Epsilonproteobacteria	OTU 402 ( <i>Arcobacter</i> )	20.1	0	0	0
Actinobacteria	OTU 260 ( <i>Actinomyces</i> )	0	3	0	0
Bacteroidetes	OTU 94 (Unc. <i>Bacteroidales</i> )	0	0.4	1.2	2.3
Fusobacteria	OTU 393 (Unc. <i>Fusobacteriales</i> )	37.3	0	0	0
Candidatus Hydrogenedentes	OTU 168 (Unc. <i>Hydrogenedentes</i> )	0	0.3	2.2	2.2
Deinococcus-Thermus	OTU 154 (Unc. <i>Deinococcales</i> )	0	0.2	3.9	0.9
Verrucomicrobia	OTU 258 (Unc. <i>Spartobacteria</i> )	0	1.1	1.2	11.5
Unc. Bacteria	OTU 357 (Unc. <i>Bacteria</i> )	0	0	3.1	0.6

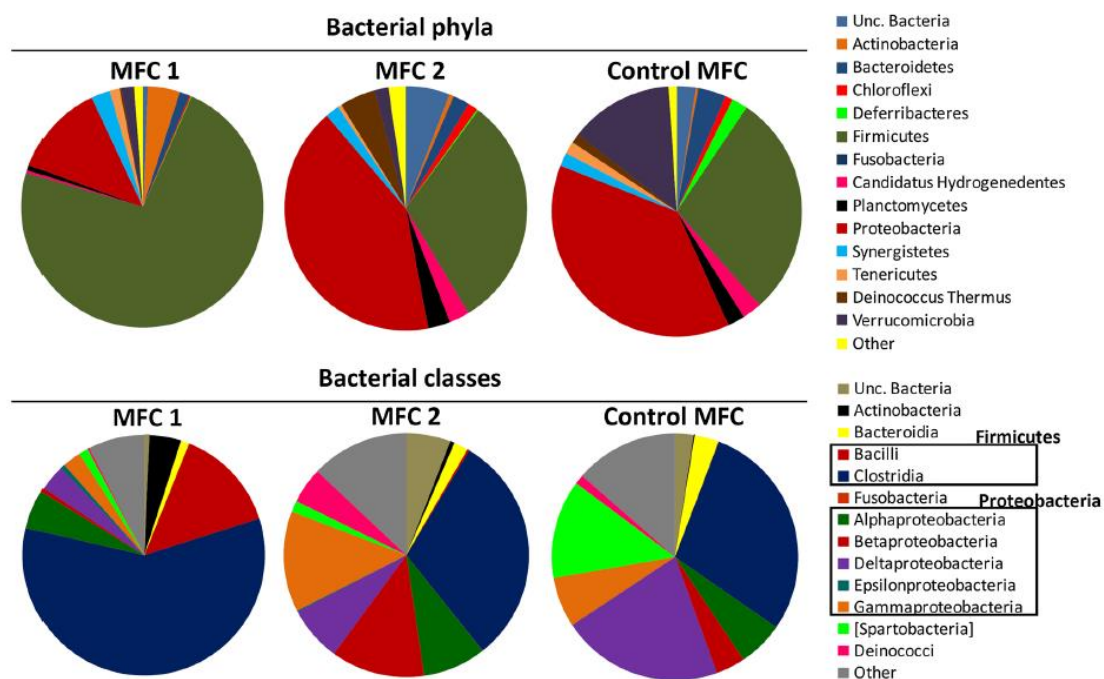


Fig. 4 Microbial community composition at phylum level and class level of anodes from MFC 1 (fed with raw cheese whey), MFC 2 (fed with biohydrogen reactor effluent) and the control MFC (fed with acetate), obtained by 16S rRNA gene pyrosequencing. Phyla or classes with relative abundances below 1% are grouped and named "Other"

### 3.3 Anode bacteria isolation

45 bacterial strains were isolated from the different anodes using different culture media and incubation conditions. From the anodes of MFC 2, 19 isolates were obtained classified according to the phylogenetic analysis to the genera *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Raoultella*, *Geobacter*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum* and *Lactobacillus* (Table 4, Fig. S2). From MFC 1, 11 strains belonging to the genera *Pseudomonas*, *Lactobacillus* and *Comamonas* and one strain that could only be classified as belonging to the family *Enterobacteriaceae* were isolated (Table 4, Fig. S2). From the control MFC 13 strains were isolated belonging to the genera *Pseudomonas*, *Paracoccus* and *Ralstonia* (Table 4, Fig. S2). Most genera detected by the culture approach were also detected by high throughput sequencing with the exception of the genera *Raoultella* and *Ralstonia* which were isolated but not detected in any of the anode samples by amplicon sequencing. All the genera detected by the isolation procedure include at least one species reported as being able to produce current in pure culture with the exception of *Achromobacter* (Table 4).

Table 4. Strains isolated from anodes with their phylogenetic affiliation obtained from the phylogenetic tree (Fig. S2)

Phylogenetic affiliation	Number of isolated strains			Detected by amplicon sequencing	Described as electroactive
	MFC 1	MFC 2	Control MFC		
<i>Lactobacillus</i>	5	1	0	Yes (only in MFC 1)	<i>L. pentosus</i> [50]
<i>Enterobacteriaceae</i>	1	0	0	Yes (only in MFC 1)	<i>Proteus vulgaris</i> [54], <i>Enterobacter</i> sp [55, 56], <i>Klebsiella</i> sp. [57, 58], <i>Raoultella electrica</i> [48], <i>E. coli</i> [59], <i>Citrobacter freundii</i> [60]
<i>Pseudomonas</i>	5	6	5	Yes (In all MFCs)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [61]
<i>Comamonas</i>	1	0	0	Yes (In MFC 1)	<i>Comamonas denitrificans</i> [62]
<i>Ochrobactrum</i>	0	2	0	Yes (only in MFC 2)	<i>Ochrobactrum anthropic</i> [63]
<i>Achromobacter</i>	0	1	0	Yes (only in MFC 2)	No report
<i>Paracoccus</i>	0	7	7	Yes (in all MFCs)	<i>P. denitrificans</i> PS-1 [64]
<i>Ralstonia</i>	0	0	1	No	<i>Ralstonia eutropha</i> [65]
<i>Geobacter</i>	0	2	0	Yes (in all MFCs)	<i>G. sulfurreducens</i> [43], <i>G. anodireducens</i> [44]
<i>Raoultella</i>	0	1	0	No	<i>Raoultella electrica</i> [48]

## 4. Discussion

This is the first report where the effluent from a biohydrogen reactor fed with raw cheese whey was used to produce current in a MFC. The maximum power density, as well as CE values obtained were in the range reported for other MFCs using dark fermentation effluent (Table 5). VFAs present in the influent were consumed completely and pH values were constant throughout the operation of the MFC. After changing the substrate from acetate to the reactor



effluent the potential decreased, until the third operation cycle, indicating that the anodic microbial community had to adapt to the new operation condition. When using cheese whey directly to feed the MFC, a very low maximum power density and CE were obtained, similarly to other MFCs using raw cheese whey [25, 26] (Table 5). Endogenous fermenting bacteria present in the cheese whey are introduced in the MFC favouring fermentation processes instead of current generation. The low diversity obtained for MFC 1 might be explained by an outgrowth of lactic acid bacteria which ferment lactose with a concomitant acidification of the medium. These microorganisms are also known to produce antimicrobial compound as bacteriocins, and might in this way compete successfully with electrogenic microorganisms [41]. In MFC 1 lactose was consumed and acetate concentration increased up to a concentration of 0.5 g/L with a concomitant drop in the pH to values lower than 5 indicating that fermentation of lactose occurred. In MFC 2, the lactose was consumed in the hydrogenogenic reactor and no fermentable sugars were fed into the MFC 2. Acetate remained at the end of the cycle and current production was lost indicating that the acetate was not used by electrogenic bacteria in this MFC. If the pH would have been controlled more efficiently, probably the acetate would have been consumed and the performance of MFC1 increased. Zhang et al. [42] operated a similar MFC with acetate at four different pHs (4, 5, 6 and 7). The authors demonstrated that the performance decreases when lowering the pH but acetate was still consumed. Moreover, the performance of the MFCs was restored when increasing the pH in all MFCs except at pH4 probably due to an irreversible damage to the biofilm. The successful current production when using the effluent from dark fermentation of cheese whey and the poor current production using raw cheese whey indicates that the combination of biohydrogen production from cheese whey and current generation from the effluent of the reactor in a MFC is a viable option to completely treat cheese whey obtaining energy in the forms of hydrogen and current.

High predominance of known exoelectrogenic bacteria were detected on the anodes of MFC 2 and the control MFC anodes while fermenting bacteria were enriched on the anode of MFC 1 explaining the MFC performances. In MFC 2 and in the control MFC a high proportion of reads classified within the genus *Geobacter* were observed. Moreover, two strains belonging to *Geobacter* were isolated from the anode of MFC 2. Several species within the genus *Geobacter* (*G. sulfurreducens*, *G. metallireducens* and *G. anodireducens*) are known electrogenic microorganisms [43–45]. Other genera detected on MFC 2 anodes might play a role in power production, such as *Pseudomonas* and *Thauera*. *Pseudomonas aeruginosa* has been reported as electrogenic in pure culture [40] and *Thauera humireducens* strain SgZ-1, isolated from a MFC anode, was able to use organic acids (acetate, propionate, pyruvate, and lactate) but not

fermentable sugars (glucose and sucrose) as electron donors in both anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) and Fe(III) reductions [46]. However, it has not been tested for current production in pure culture and iron reduction does not directly imply electron transfer to anodes [47]. Several strains isolated from all anodes were affiliated to *Pseudomonas* and according to the phylogenetic analysis, the strains isolated from MFC 2 form a separate cluster which might indicate a particular role in current generation in this MFC. The ability of current generation in pure culture should be determined to confirm that these strains are electrogenic.

Table 5 Literature overview of the performance of MFC fed with cheese whey

Substrate	Substrate concentration (mgCOD/L)	Optimal power density (W/m <sup>3</sup> )	Optimal power density (mW/m <sup>2</sup> )	CE (%)	Microbial community analysis	References
RCW with HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4670	1.3	–	3.9	nd	[22]
SCW	6700	–	46	11	nd	[23]
SCW	700	–	40	nd	nd	[24]
RCW	730	–	18.4	1.9	nd	[25]
RCW	96,500	–	0.4	0.1	SEM	[26]
SCW	–	–	188.8	26	nd	[27]
RCW	2000	0.009	0.34	14	16S rRNA gene sequencing	This work (MFC 1)
DFSW	25,000	20.9	501	nd	nd	[18]
CDFE	6250	34.8	–	47	nd	[17]
GDFE	7610	–	92	14	nd	[20]
SDFE	1622	12.5	–	49	nd	[21]
MDFE	6000	3.02	–	2.5	nd	[19]
CWRE	2000	12.2	439	24	16S rRNA gene sequencing	This work (MFC 2)

RCW raw cheese whey, SCW sterilized cheese whey, DFSW dark fermentation synthetic wastewater, CDFE cellulose dark fermentation effluent, GDFE glycerol dark fermentation effluent, SDFE sucrose dark fermentation effluent, MDFE molasses dark fermentation effluent, CWRE cheese whey biohydrogen reactor effluent, nd not determined, SEM scanning electron microscopy

Interestingly, one strain isolated from MFC 2 (strain NAR) presents a 16S rRNA gene sequence closely related to *Raoultella ornithinolytica* and *Raoultella electrica*. Kimura et al [48] demonstrated that *R. electrica* is able to produce current from glucose in a H-type MFC. According to the 16S rRNA gene sequence, strain NAR is more similar to *R. ornithinolytica* than to *R. electrica* but due to the similarities in 16S rRNA gene sequences within of members of the *Klebsiella/Raoultella* complex, sequencing of other genes like *gyrA*, *rpoB* and *parC* would be needed for species-level identification. Current generation in pure culture using other substrates other than glucose would give more information about the role of this strain in current production from biohydrogen reactor effluent. No sequence closely related to the 16S rRNA sequence of *Raoultella* was detected by pyrosequencing indicating that combining culture methods with high throughput sequencing are complementary techniques. Cultivation approach has no PCR bias and we might even detect bacteria that are in very low proportion but are favored by the culture media.

In MFC 1, a high proportion of fermenting microorganisms were detected by pyrosequencing on the anode classified within the genera *Clostridium* and *Lactobacillus*. Members of these genera are able to ferment lactose producing volatile fatty acids decreasing the pH which might hamper the growth of electrogenic bacteria [49]. Moreover, several strains affiliated to *Lactobacillus* were isolated from MFC 1. Even though *Lactobacillus* species are fermentative, electricity production by *Lactobacillus pentosus* has been shown in a microbial fuel cell fed with synthetic dairy wastewater [50]. The sequences from the *Lactobacillus* strains isolated in this work were closely related to other *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* [51]. To understand more on the role of *Lactobacillus* in dairy effluent MFCs current production of these strains should be studied in pure culture.

The relative abundance of *Fusibacter* spp. in MFC 2 and the control MFC anodes was surprisingly high. It has been reported that member of the genera *Fusibacter* ferment several sugars to acetate, H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, or reduce thiosulfate and elemental sulphur [52]. Sulfur compounds can be present in the feeding of MFC 2 as proteins containing amino acids with S can be present in cheese whey, and therefore, in the biohydrogen reactor effluent (which is used to feed MFC 2) as cheese whey is used to produce the biohydrogen. Moreover, amino acids with S can be also present in biomass from cell decay. These compounds together with organic substrates coming from the decay of biomass could explain the presence of *Fusibacter* on the anodes. But, their role on the anodes is not yet clear and must be further investigated. An effort to isolate *Fusibacter* from the anodes using *Fusibacter* media was performed but, no strain isolated using this media was classified within the genus *Fusibacter*. One of the problems of biohydrogen production from raw cheese whey is the stability of the process. We have demonstrated previously the difficulties in obtaining a stable hydrogen production, mainly due to the negative effect of non-hydrogen producing fermenters and the low predominance of high-yield hydrogen producing organisms [3, 4]. Interestingly, when using cheese whey as substrate in a MFC, a high proportion of *Clostridium* (39 %) were selected on the anode. The presence of *Clostridium* is generally associated with a good performance of biohydrogen production by dark fermentation [53]. Then, the application of a MFC could be a way to select this high yield hydrogen microorganism for further hydrogen production. Moreover, the elimination of organic acids which are a source of instability and low yields in dark fermentation may also result in higher hydrogen production. An alternative could be a combination of both processes in a single device operated intermittently as a MFC and as a biohydrogen producing reactor by dark fermentation. More work is necessary to investigate the way to combine these two processes in order to achieve a stable process and higher energy recovery.

In the present work, the differences in the electrochemical performance of two MFCs were explained through the analysis of the anode microbial communities. Electroactive populations were enriched on anodes of MFCs fed with biohydrogen reactor effluent while fermentative populations were predominant on the MFC anode fed directly with raw cheese whey. Effluent from dark fermentation of cheese whey was successfully used to produce current in MFC. But, fermentative metabolism prevail in the cheese whey fed MFC resulted in low power production and acidification which hampered the use of the VFAs produced for current production. Our results demonstrate that MFC might be an attractive technology to be applied as a second stage process during raw cheese whey treatment by dark fermentation process, improving energy recovery or within biohydrogen reactors to stabilize the process.

### **Acknowledgements**

The authors thanks to Marcela Martínez and Juan A. Abin from the HPLC platform at the “Clemente Estable” Institute for chemical analysis of the samples. The authors also thanks to Dr. Nico Boon from LabMet (University of Gent, Belgium) for provided electroactive biomass and helpful suggestions on MFC operation. This work was funded by project ANII FSE 067 and ANII FSE 6432. J. Wenzel and L. Fuentes were funded ANII grants for postgraduate students in Uruguay.

### **Conflict of interest**

No conflict of interest declared

### **REFERENCES**

1. Carvalho F, Prazeres AR, Rivas J (2013) Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Sci Total Environ* 445–446:385–396. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.038
2. Vymazal J (2014) Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: a review. *Ecol Eng* 73:724–751. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.09.034
3. Castelló E, García y Santos C, Iglesias T et al (2009) Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *Int J Hydrogen Energy* 34:5674–5682. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.05.060
4. Castelló E, Perna V, Wenzel J et al (2011) Microbial community composition and reactor performance during hydrogen production in a UASB reactor fed with raw cheese whey inoculated with compost. *Water Sci Technol* 64:2265–2273. doi:10.2166/wst.2011.706

5. Perna V, Castelló E, Wenzel J et al (2013) Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int J Hydrogen Energy* 38:54–62. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.10.022
6. Venetsaneas N, Antonopoulou G, Stamatelatos K et al (2009) Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour Technol* 100:3713–3717. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.025
7. Davila-Vazquez G, Cota-Navarro CB, Rosales-Colunga LM et al (2009) Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. *Int J Hydrogen Energy* 34:4296–4304. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.063
8. Yang P, Zhang R, McGarvey J a., Benemann JR (2007) Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int J Hydrogen Energy* 32:4761–4771. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.07.038
9. Cota-Navarro CB, Carrillo-Reyes J, Davila-Vazquez G et al (2011) Continuous hydrogen and methane production in a twostage cheese whey fermentation system. *Water Sci Technol* 64:367. doi:10.2166/wst.2011.631
10. Ghimire A, Frunzo L, Pirozzi F et al (2015) A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. *Appl Energy* 144:73–95. doi:10.1016/j.apenergy.2015.01.045
11. Azbar N, Çetinkaya Dokgöz FT, Keskin T et al (2009) Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions. *Int J Hydrogen Energy* 34:7441–7447. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.04.032
12. Rabaey K, Rodríguez J, Blackall LL et al (2007) Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *ISME J* 1:9–18. doi:10.1038/ismej.2007.4
13. Clauwaert P, Aelterman P, Pham TH et al (2008) Minimizing losses in bio-electrochemical systems: the road to applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:901–913. doi:10.1007/s00253-008-1522-2
14. Sharma M, Bajracharya S, Gildemyn S et al (2014) A critical revisit of the key parameters used to describe microbial electrochemical systems. *Electrochim Acta* 140:191–208. doi:10.1016/j.electacta.2014.02.111
15. Shun'ichi I, Suzuki S, Norden-krichmar TM et al (2013) Identifying the microbial communities and operational conditions for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water Res* 47:7120–7130. doi:10.1016/j.watres.2013.07.048
16. Koch C, Popiel D, Harnisch F (2014) Functional redundancy of microbial anodes fed by domestic wastewater. *Chem Electrochem* 1:1923–1931. doi:10.1002/celc.201402216

17. Wang A, Sun D, Cao G et al (2011) Integrated hydrogen production process from cellulose by combining dark fermentation, microbial fuel cells, and a microbial electrolysis cell. *Bioresour Technol* 102:4137–4143. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.137
18. Vázquez-Larios AL, Solorza-Feria O, Vázquez-Huerta G et al (2011) Effects of architectural changes and inoculum type on internal resistance of a microbial fuel cell designed for the treatment of leachates from the dark hydrogenogenic fermentation of organic solid wastes. *Int J Hydrogen Energy* 36:6199–6209. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.01.006
19. Pandit S, Balachandar G, Das D (2014) Improved energy recovery from dark fermented cane molasses using microbial fuel cells. *Front Chem Sci Eng* 8:43–54. doi:10.1007/s11705-014-1403-4
20. Chookaew T, Prasertsan P, Ren ZJ (2014) Two-stage conversion of crude glycerol to energy using dark fermentation linked with microbial fuel cell or microbial electrolysis cell. *N Biotechnol* 31:179–184. doi:10.1016/j.nbt.2013.12.004
21. ElMekawy A, Srikanth S, Vanbroekhoven K et al (2014) Bioelectro-catalytic valorization of dark fermentation effluents by acetate oxidizing bacteria in bioelectrochemical system (BES). *J Power Sources* 262:183–191. doi:10.1016/j.jpowsour.2014.03.111
22. Kelly PT, He Z (2014) Understanding the application niche of microbial fuel cells in a cheese wastewater treatment process. *Bioresour Technol* 157:154–160. doi:10.1016/j.biortech.2014.01.085
23. Tremouli A, Antonopoulou G, Bebelis S, Lyberatos G (2013) Operation and characterization of a microbial fuel cell fed with pretreated cheese whey at different organic loads. *Bioresour Technol* 131:380–389. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.173
24. Stamatelatou K, Antonopoulou G, Tremouli A, Lyberatos G (2011) Production of gaseous biofuels and electricity from cheese whey. *Ind Eng Chem Res* 50:639–644. doi:10.1021/ie1002262
25. Antonopoulou G, Stamatelatou K, Bebelis S, Lyberatos G (2010) Electricity generation from synthetic substrates and cheese whey using a two chamber microbial fuel cell. *Biochem Eng J* 50:10–15. doi:10.1016/j.bej.2010.02.008
26. Kassongo J, Togo C a (2010) The potential of whey in driving microbial fuel cells: a dual prospect of energy recovery and remediation. *Afr J Biotechnol* 9:7885–7890. doi:10.5897/AJB10.1066
27. Ghasemi M, Ahmad A, Jafary T, Azad AK (2016) ScienceDirect Assessment of immobilized cell reactor and microbial fuel cell for simultaneous cheese whey treatment and lactic acid/electricity production. *Int J Hydrogen Energy*:2–10. doi:10.1016/j.ijhydene.2016.04.136

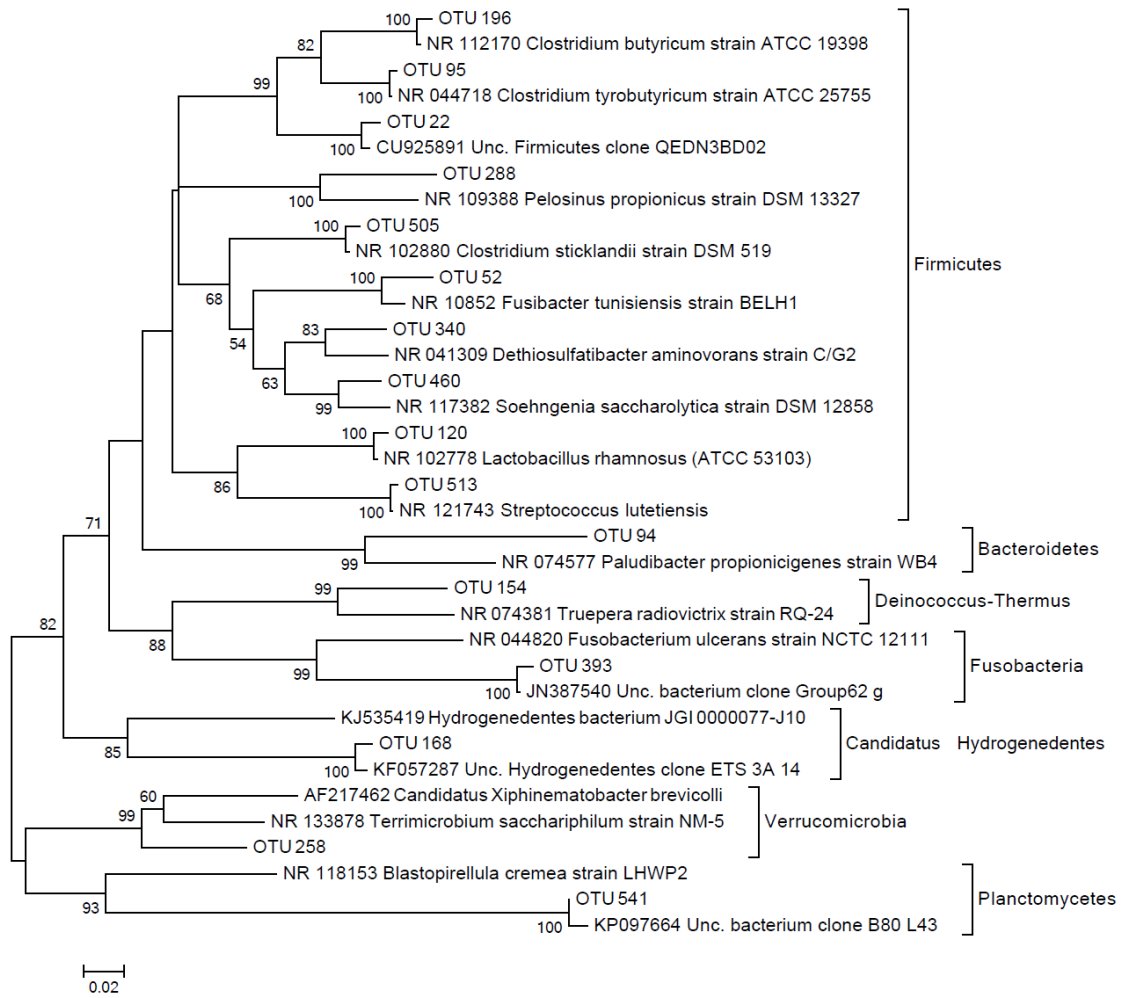
28. Liu H, Logan BE (2004) Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane. *Environ Sci Technol* 38:4040–4046
29. Cheng S, Liu H, Logan BE (2006) Increased performance of single-chamber microbial fuel cells using an improved cathode structure. *Electrochem Commun* 8:489–494. doi:10.1016/j. electrochem.2006.01.010
30. Liu H, Cheng S, Logan BE (2005) Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol* 39:658–662
31. Rice EW, Baird RB, D, Eaton LA, Clesceri LS (1995) Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed
32. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426–428
33. Logan BE, Hamelers B, Rozendal R et al (2006) Microbial fuel cells<sup>+</sup>: methodology and technology<sup>†</sup>. *Environ Sci Technol* 40:5181–5192
34. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA et al (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:4516–4522
35. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J et al (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336. doi:10.1038/nmeth0510-335
36. Wheeler Alm EW, Oerther DB, Larsen N et al (1996) The oligonucleotide probe database. The Oligonucleotide Probe Database. *Appl Environ Microbiol* 62:3557–3559
37. Tamura K, Peterson D, Peterson N et al (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121
38. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
39. Felsenstein J (1985) Phylogeny and the comparative method. *Am Nat* 125:1–15
40. Rabaey K, Boon N, Siciliano SD et al (2004) Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Appl Environ Microbiol* 70:5373–5382. doi:10.1128/AEM.70.9.5373
41. Gomes SD, Fuess LT, Mañunga T et al (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria as a hindering factor for biohydrogen production from cassava flour wastewater in a continuous multiple tube reactor. *Int J Hydrogen Energy* 41:8120–8131. doi:10.1016/j. ijhydene.2015.11.186

42. Zhang L, Li C, Ding L et al (2011) Influences of initial pH on performance and anodic microbes of fed-batch microbial fuel cells. *J Chem Technol Biotechnol* 86:1226–1232. doi:10.1002/jctb.2641
43. Bond DR, Lovley DR (2003) Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol* 69:1548–1555. doi:10.1128/AEM.69.3.1548
44. Sun D, Wang A, Cheng S et al (2014) *Geobacter anodireducens* sp. nov., an exoelectrogenic microbe in bioelectrochemical systems. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:3485–3491. doi:10.1099/ijs.0.061598-0
45. Bond DR, Holmes DE, Tender LM, Lovley DR (2002) Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295:483–485. doi:10.1126/science.1066771
46. Ma C, Yu Z, Lu Q, Zhuang L (2015) Anaerobic humus and Fe (III) reduction and electron transport pathway by a novel humus-reducing bacterium, *Thauera humireducens* SgZ-1. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:3619–3628. doi:10.1007/s00253-014-6254-x
47. Richter H, Lanthier M, Nevin KP, Lovley DR (2007) Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe (III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Appl Environ Microbiol* 73:5347–5353. doi:10.1128/AEM.00804-07
48. Kimura Z, Chung KM, Itoh H, et al (2014) *Raoultella electrica* sp. nov., isolated from anodic biofilms of a glucose-fed microbial fuel cell. 1384–1388. doi:10.1099/ijs.0.058826-0
49. Schleifer K-H (2009) Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). *Bergey's Manual® Syst Bacteriol SE-3*, vol 5, pp 19–1317. doi:10.1007/978-0-387-68489-5\_3
50. Vilas Boas J, Oliveira VB, Marcon LRC et al (2015) Effect of operating and design parameters on the performance of a microbial fuel cell with *Lactobacillus pentosus*. *Biochem Eng J* 104:34–40. doi:10.1016/j.bej.2015.05.009
51. Cogan TM, Beresford TP, Steele J et al (2007) Invited review: advances in starter cultures and cultured foods. *J Dairy Sci* 90:4005–4021. doi:10.3168/jds.2006-765
52. Hania W Ben, Fraj B, Postec A et al (2016) *Fusibacter tunisiensis* sp. nov., isolated from an anaerobic reactor used to treat olive-mill wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* 62:1365–1368. doi:10.1099/ijs.0.034603-0
53. Etchebehere C, Castelló E, Wenzel J et al (2016) Microbial communities from 20 different hydrogen-producing reactors studied by 454 pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:3371–3384. doi:10.1007/s00253-016-7325-y
54. Kim N, Choi Y, Jung S, Kim S (2000) Development of microbial fuel cells using *Proteus vulgaris*. *Bull Korean Chem Soc* 21:44–48



55. Rezaei F, Xing D, Wagner R et al (2009) Simultaneous cellulose degradation and electricity production by *Enterobacter cloacae* in a microbial fuel cell. *Appl Environ Microbiol* 75:3673–3678. doi:10.1128/AEM.02600-08
56. Feng C, Li J, Qin D et al (2014) Characterization of exoelectrogenic bacteria *Enterobacter* strains isolated from a microbial fuel cell exposed to copper shock load. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0113379
57. Xia X, Cao X, Liang P, Huang X (2010) Electricity generation from glucose by a *Klebsiella* sp. in microbial fuel cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:383–390. doi:10.1007/s00253-010-2604-5
58. Zhang L, Zhou S, Zhuang L et al (2008) Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Electrochem Commun* 10:1641–1643. doi:10.1016/j.elecom.2008.08.030
59. Zhang T, Cui C, Chen S et al (2008) The direct electrocatalysis of *Escherichia coli* through electroactivated excretion in microbial fuel cell. *Electrochem commun* 10:293–297. doi:10.1016/j.elecom.2007.12.009
60. Huang J, Zhu N, Cao Y, Peng Y (2015) Exoelectrogenic bacterium phylogenetically related to *Citrobacter freundii*, isolated from anodic biofilm of a microbial fuel cell. *Appl Biochem Biotechnol* 175:1879–1891. doi:10.1007/s12010-014-1418-9
61. Rabaey K, Boon N, Höfte M, Verstraete W (2005) Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ Sci Technol* 39:3401–3408
62. Xing D, Cheng S, Logan BE, Regan JM (2010) Isolation of the exoelectrogenic denitrifying bacterium *Comamonas denitrificans* based on dilution to extinction. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1575–1587. doi:10.1007/s00253-009-2240-0
63. Zuo Y, Xing D, Regan JM, Logan BE (2008) Isolation of the exoelectrogenic bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by using a U-tube microbial fuel cell. *Appl Environ Microbiol* 74:3130–3137. doi:10.1128/AEM.02732-07
64. Kiely PD, Call DF, Yates MD et al (2010) Anodic biofilms in microbial fuel cells harbor low numbers of higher-power-producing bacteria than abundant genera. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:371–380. doi:10.1007/s00253-010-2757-2
65. Nishio K, Kimoto Y, Song J, et al (2014) Extracellular electron transfer enhances polyhydroxybutyrate productivity in *Ralstonia eutropha*. *Environ Sci Technol Lett* 1:40–43

## Supporting information



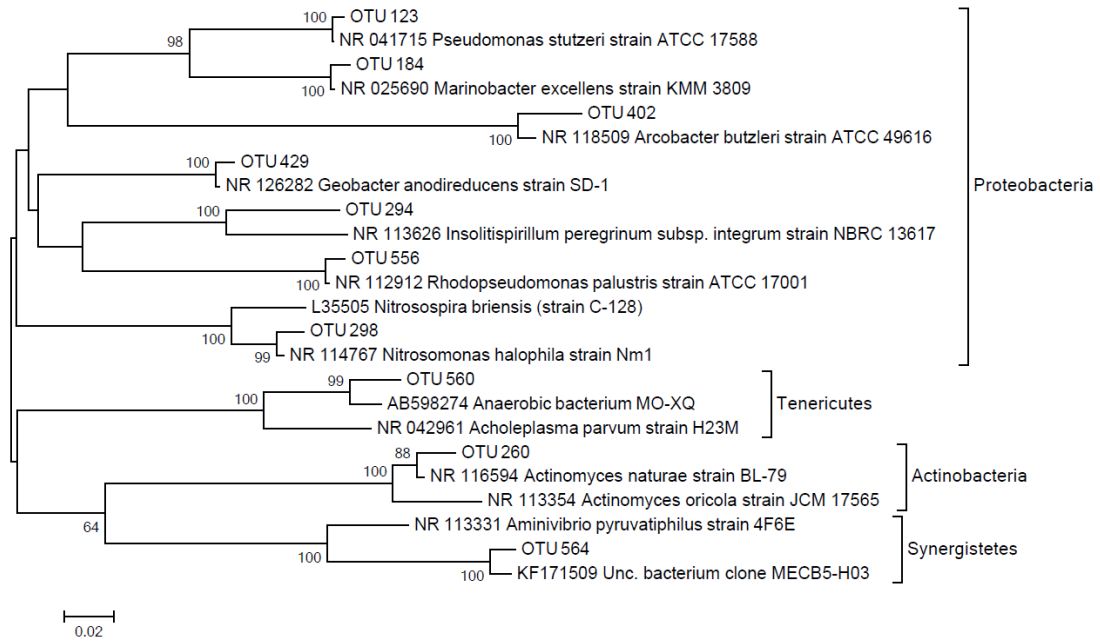


Figure S1. Phylogenetic trees constructed with sequences of predominant OTUs shown in Table 3. Bootstrap values were obtained after 1000 replicates. Only bootstrap values higher than 50% are shown. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method and the evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method. There were a total of 493 positions in the final dataset. Raw sequences were deposited at NCBI-SRA database (Accession number SRX958299).

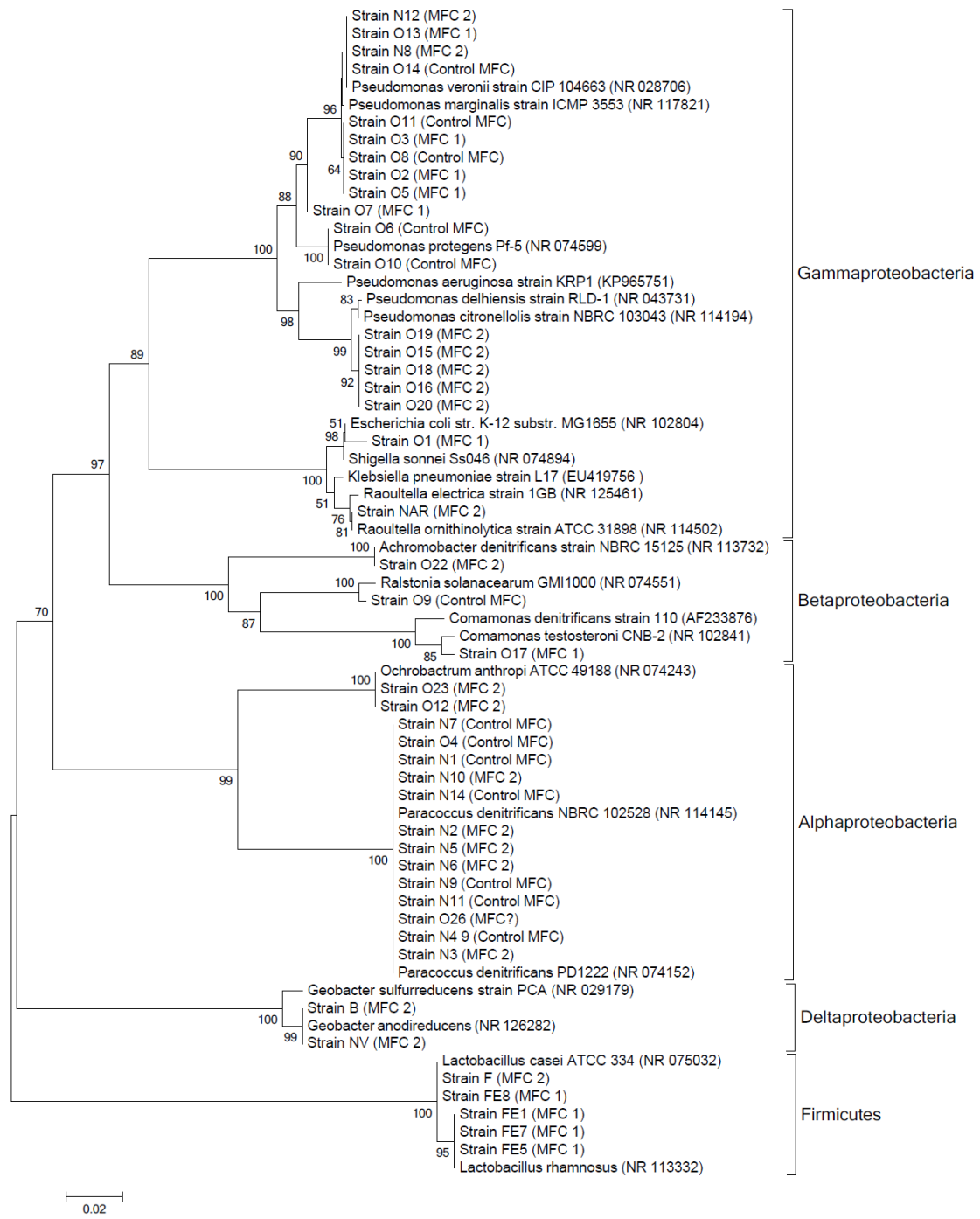


Figure S2. Phylogenetic trees constructed with sequences of isolated strains shown in Table 4. Bootstrap values were obtained after 1000 replicates. Only bootstrap values higher than 50% are shown. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method and the evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method. There were a total of 493 positions in the final dataset. Sequences were deposited at NCBI GeneBank database under the accession numbers KX898513-KX898557.

## **Trabajo 4. Taxonomy, physiology and genomics insights of a *Raoultella* strain able to produce H<sub>2</sub>, ethanol and electricity**

### **Objetivos específicos abarcados en este trabajo**

En este trabajo se responden los objetivos específicos 2 y 3 dentro del tema de Celdas de combustibles microbianas. Decidimos caracterizar el aislamiento de la cepa NAR perteneciente al género *Raoultella* ya que se había reportado una nueva especie de *Raoultella* electroactiva aislada de una celda microbiana. Se buscó profundizar en la caracterización de esta cepa aislada de una MFC operada en nuestro laboratorio y determinar cuáles serían los posibles mecanismos de electrogénesis (Resultados presentados en Fuentes et al., 2020)

### **Contribución del autor de la tesis**

La contribución del autor en este trabajo abarca toda la parte de aislamiento, técnicas bioquímicas empleadas, ensayos de electroactividad realizados, microscopía electrónica, estudio de quinonas y ácidos grasos, estudio de reducción de hierro y la búsqueda de posibles genes candidatos de la electroactividad. Para verificar la electroactividad se realizó una pasantía en el Laboratorio de Bioelectroquímica de Mar del Plata, Argentina, donde contaba con el equipamiento y la experiencia para hacer estos estudios. Esta pasantía se realizó bajo la supervisión del Dr. Juan Pablo Busalmen. Por otro lado, se decidió realizar el estudio del genoma de este aislamiento con dos objetivos: determinar su filogenia y estudiar los posibles mecanismos de transferencia de electrones. Este trabajo se realizó en colaboración con la sección de bioinformática del Instituto de Higiene, bajo la supervisión del Dr. Andrés Iriarte que realizó el ensamblado del genoma, la determinación del average nucleotide identity (ANI) y los análisis filogenéticos. Los coautores Germán Schrott y Victoria Ordoñez del grupo de investigación del Dr. Busalmen de Argentina, colaboraron con los análisis de electroactividad de la cepa. Los resultados se encuentran en el siguiente artículo que será enviado para su publicación. El trabajo fue escrito por la autora de esta tesis bajo la supervisión de la tutora.

**Taxonomy, physiology and genomics insights of a *Raoultella* strain able to produce H<sub>2</sub>, ethanol and electricity**

Laura Fuentes<sup>1</sup>, Andrés Iriarte<sup>2</sup>, Daniela Costa<sup>1</sup>, Germán Schrott<sup>3</sup>, Victoria Ordoñez<sup>3</sup>, Juan Pablo Busalmen<sup>3</sup>, Claudia Etchebehere<sup>1\*</sup>

(5) Microbial Ecology Laboratory, Clemente Estable Biological Institute, Ministry of Education, Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay.

(6) Departamento de desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, UdeLaR.

(7) Laboratorio de Bioelectroquímica, INTEMA (CONICET), Universidad de Mar del Plata.

*Paper a publicar...*

\* Correspondence to: Claudia Etchebehere, Microbial Ecology Laboratory, Clemente Estable Biological Institute, Ministry of Education, Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay; phone: +598 24871616; E-mail: [cetchebe@iibce.edu.uy](mailto:cetchebe@iibce.edu.uy); Webpage: [www.iibce.edu.uy](http://www.iibce.edu.uy)

## ABSTRACT

Electrogenesis is widely distributed in several genera of microorganisms but there are still few isolates with demonstrated electrogenic capability. Electroactivity was mainly studied in *Geobacter* and *Shewanella* members and the mechanism is not yet known in other less studied genera. Then, the aim of this work was to describe the taxonomy, physiology and genome of a new strain (Strain NAR) previously isolated from a Microbial Fuel Cell (MFC) fed with the effluent from a hydrogen-producing reactor by dark fermentation. According to 16S rRNA gene phylogenetic analysis the strain was positioned within the genus *Raoultella*, but not closely related with the only species of electrogenic microorganism described up to now within the genus (*Raoultella electrica*). Phylogenetic studies performed with the complete genome positioned the strain within the species *R. ornitholytica*, a species without any electrogenic representative described. The physiological studies showed that the strain is saccharolytic with aerobic and fermentative metabolisms and produce H<sub>2</sub>, ethanol, acetic and succinic acid as fermentation products. The production of H<sub>2</sub> and ethanol was also observed using glycerol as substrate, suggesting an important application of the strain in the production of biofuels using wastes. The strain was able to grow in an anaerobic mineral media with acetate and Fe(III) although no Fe<sup>+2</sup> was observed as product. Strain NAR produce quinones, which are probably involved in the electro-transfer as electron-shuttle. The electrogenic tests revealed a weak electrogenic activity. The genome studies showed the presence of several candidate genes involved in the electroactivity. As far as we know this is the first *R. ornitholytica* isolate with reported weak electrogenic capability and the second species within the genus *Raoultella*, suggesting that this genus may play an important role in MFC.

## 1. Introduction

Microbial fuel cells (MFCs) are bio-electrochemical devices that are able to convert a substrate into electricity through the metabolic activity of microorganisms. MFC present three components: an anaerobic chamber of the anode (it contains graphite that acts as an external electron acceptor), an aerobic chamber of the cathode and a cation exchanger (Ieropoulos et al., 2005). In MFCs, microorganism convert the organic matter into CO<sub>2</sub>, protons and electrons. For the effectiveness of the process, it is essential that bio-anode could be colonized by microorganisms capable of transferring electrons (electroactive microorganisms). These microorganisms are able to use the anode electrode as a final electron acceptor. They consume organic matter and transfer the electrons to a current collector. Electrons migrate to the cathode through an external resistor generating electric current. At the cathode, oxygen is reduced to water by using the electrons and protons produced on the anode (Rabaey and Verstraete, 2005). Electricity production depends on the difference in redox potential between the substrate degraded and the electrode (Logan, 2010).

The microbial community composition of MFC depends on the inoculum, the substrate used, the operating conditions of the cell, the design of the cell, etc. (Logan, Regan, 2006; Santoro et al., 2017).

It is important to know the metabolic characteristic of electrogenic microorganism in order to improve the efficiency and specific application of MFC given that electrogenic bacteria are able to use certain types of substrates. For example, *Shewanella oneidensis* oxidizes lactate to acetate under anaerobic conditions, while *Geobacter metallireducens* is able to oxidize acetate but not glucose. *Rhodospirillum rubrum* can oxidize acetate, lactate, and glucose but it does not degrade ethanol, another common fermentation end product (Xing et al., 2009).

Some aspect of extracellular electron transfer (EET) has been elucidated from isolated microorganism such as *Geobacter sulfurreducens* (Bond et al., 2003), *Escherichia coli*, *Shewanella putrefaciens* (Kim et al., 2002), *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum rubrum* *palustris* DX-1, and *Ochrobactrum anthropic* YZ-1 (Xing et al., 2008). The list of electrogenic bacteria also includes representatives of classes of Proteobacteria, as well as representatives of Firmicutes and Acidobacteria (Rahimnejad et al., 2015; Santoro et al., 2017).

Whole genome sequencing of different strains, such as *Geobacter* (Methe et al., 2003) and *Shewanella* (Heidelberg et al., 2002), were crucial to elucidate cell-electrode interactions and the development of a genetic system for this organism.



There are direct and indirect mechanisms described for external electron exchange in electroactive bacteria. Cytochromes, electron shuttles, nanowires have been reported in these microorganisms (Von Canstein et al., 2008). Flavins, phenazines cysteine produced by microorganisms are able to facilitate electron transfer to the electrode. Humic substrate, which are present in the environment, could also act as electron transfer. These electron shuttle (indirect mechanism) could be reduced by c-type cytochromes (direct mechanism) which are present on the outer surface of the bacteria. Nanowires, presented in some bacteria, are conductive pilus-like appendages which are able to interact directly with the electrode surface transferring electrons (Santoro et al., 2017; Logan, 2010). Table 1 shows some proteins important for electrogenic bacteria.

Table 1. Proteins reported involved in electroactive bacteria

Proteins	Identification	Role	Strain	Reference
MtrC	c-type decahemecytochromes	Nanowires	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	El-Naggar et al., 2010
MtrB, MtrA	c-type cytochrome	electron shuttle	<i>Shewanella oneidensis</i>	Sydow et al., 2014
OmcA	c-type decahemecytochromes	Nanowires	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-2	El-Naggar et al., 2010
periplasmic CymA	cellular menaquinone	electron shuttle	<i>Shewanella sp.</i>	Von Canstein et al., 2008
MacA	diheme c-type cytochrome present in Fe(III)-respiring	intermediate carrier between electron transfer components in the inner and the outer membrane	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Butler et al., 2004
OmcB	putative outer membrane-bound c-type cytochrome	contributes to electron transfer	<i>Geobacter sulfurreducens</i> , <i>Shewanella sp.</i>	Butler et al., 2004
PpcA	triheme, periplasmic c-type cytochrome	electron transfer	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Butler et al., 2004

GSU1496 and GSU1776, piliA	pilin domain proteins type IV pilins	Nanowires	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Reguera et al., 2005
OmcS	associated to the pili	Nanowires	<i>Shewanella sp.</i>	Reguera et al., 2005
GspD	functional element of the type II secretion system	crucial EET components	<i>Shewanella sp.</i>	Sydow et al., 2014
OmcX	outer membrane multi-haem c-type cytochromes lipoprotein	important proteins for EET	<i>Geobacter sp.</i>	Ishii et al., 2013
GSU3274	c- type cytochrome, 1 heme-binding site	electron transfer	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Sydow et al., 2014
OmcZ	c-type cytochrome	facilitate electron exchange at the biofilm/anode interface	<i>G. sulfurreducens</i>	Sydow et al., 2014
etfB	Electron transfer flavoprotein, beta subunit	electron shuttle	<i>G. sulfurreducens</i>	Sydow et al., 2014
OmcS and OmcE	c-type cytochrome	required for optimal Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction	<i>Shewanella oneidensis MR-1</i>	Holmes et al., 2006
omcX omcT	cytochrome outer membrane	electron shuttle	<i>Shewanella oneidensis MR-1</i>	Ishii et al., 2013
fccA	functional fumarate reductase tetraheme c type cytochrome	contributes to electron transfer	<i>Shewanella oneidensis MR-1</i>	Sydow et al., 2014
OmcS	c-type cytochrome	contributes to the electron transfer to Fe(III) oxides	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Sydow et al., 2014
<b>Other compounds</b>				

flavin mononucleotide (FMN) and riboflavin	electronic transference in redox reactions	electron shuttle	<i>Shewanella sp.</i>	Marsili et al., 2008
2,6-DTBBQ	Quinone	electron shuttle	<i>K pneumoniae L17</i>	Deng et al., 2010
pyocyanine	Pigment	electron shuttle	<i>Pseudomonas aeruginosa KRP1</i>	Rabaey et al., 2005
phenazine-1-carboxamide	aromatic compound	electron shuttle	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rabaey et al., 2005
1,2-dihydroxynaphthalene	quinines compounds	electron shuttle	<i>Sphingomonas xenophaga BN6</i>	Keck et al., 2002

In our laboratory, several strains were isolated from a MFC (Wenzel et al., 2017). We decided to focus in the strain NAR which was classified within the genus *Raoultella*, Enterobacteriaceae family, according to the 16S rRNA gene sequence analysis (Wenzel et al., 2017). Within this genus, Kimura et al. (2014) reported the isolation of a novel species named *Raoultella electrica*, which has the capability to produce electricity. In the same genus, Sklodowska, (2018) reported the isolation of another strain, *Raoultella SM1*, which was able to reduce Fe (III) and U (VI). *Raoultella SM1* is characterized by presented a wide metabolic versatility. It is reported to produce ethanol and H<sub>2</sub> using glycerol as carbon source. Therefore, the aim of this study was to characterize the isolate (strain NAR) in order to determine its taxonomy, physiology and possible role in MFC. For that, a series of biochemical and physiological studies were performed including the electrogenic capability. The complete genome was sequenced and a phylogenetic analysis was performed using the whole genome. Moreover, the genes candidates to be involved in the electrogenic capability were studied in the genome.

## 2. Material and methods

### 2.1 Isolation

This strain was isolated from a MFC operated in our laboratory. This MFC was initially operated with M9 medium with acetate as substrate and subsequently fed with effluent from a hydrogen (H<sub>2</sub>) producing reactor using cheese whey as substrate (Wenzel et al., 2017). Isolation was made

using medium DSMZ 579, with some modifications, in order to growth *Geobacter*. Briefly, the medium contain per liter:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.6 g,  $\text{KCl}$  0.1 g, Na-acetate 0.82 g, trace element solution 10 mL,  $\text{NaHCO}_3$  2.5 g, Fe(III) citrate 4.9 g. Trace element solution contains per liter: Nitrilotriacetic acid 1.5 g,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  3 g,  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{NaCl}$  1 g  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  0.18 g,  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  0.18 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  0.02 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.01 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  0.01 g,  $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  0.03 g,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  0.3 mg,  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  0.4 g.

All the cultures were incubated at 30 °C (Wenzel et al., 2017). DNA extraction and 16S rRNA gene sequence analysis was described in Wenzel et al., 2017.

## 2.2 Biochemical tests

Biochemical tests were performed using API 20E (Biomeriux, France) and BBL Enterotube II (BD, USA). The optimal growth temperature was determined at different temperatures (5 °C, 10 °C, 30 °C, 37°C, 41 °C, 50 °C) in liquid Peptone Yeast Extract Glucose medium (PYG). PYG medium were prepared per liter: with 10 g glucose (DIU, Uruguay), 5 g yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 5 g peptone (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), and 5 g meat extract (Frigonal, Uruguay), the pH was set to 6.8 and the vials with the medium were sparged with  $\text{N}_2$  (The Linde Group, Montevideo, Uruguay) as was described in Perna et al., 2013.

Identification of respiratory quinones analysis and fatty acid analysis was carried out by the Identification Service and Dr. Brian Tindall from DSMZ, Braunschweig, Germany. The cultures were pre-grown in PYG anaerobic media at 30 °C. Fatty acid determination was made according to the method of Miller (1982) and Kuykendall et al., (1988). Analysis of Respiratory Quinones was performed according to Tindall (1990a; 1990b)

Bacteria growth was tested in four different media conditions at 30 °C for one week. Each test was performed by triplicate in 25 mL vials with 10 mL of: **1)** M9 media using 10  $\text{gL}^{-1}$  glucose substrate (DIU, Uruguay); **2)** M9 with 0.82  $\text{gL}^{-1}$  acetate (Sigma-Aldrich, MO, USA) and 20 mM ferric citrate substrates (Sigma-Aldrich, MO, USA); **3)** M9 and 0.82  $\text{gL}^{-1}$  acetate; **4)** M9 media with 10  $\text{gL}^{-1}$  glucose and 20 mM ferric citrate substrate; **5)** M9 mineral media using crude glycerol as carbon source (2% v/v). In this last case, the media was prepared according to Loaces et al., 2016. Before use, crude glycerol (50 % v/v) was neutralized to pH 7 with 1 % HCl. After that, it was filtered through filter paper and sterilized by autoclaving (Loaces et al., 2016).

The production of  $\text{H}_2$  and organic acids and alcohols were tested in these conditions. Media were prepared under anaerobic conditions by sparging the head space with  $\text{N}_2$  gas (99.9% Linde) as

was previously described (Castelló et al., 2011). All the media were sterilized by standard cycle autoclave (15 min, 121 °C) previous to be used.

### *2.3 Analysis of fermentation products*

Biogas volume was determined by water displacement and H<sub>2</sub> concentration was determined by gas chromatography (Chromatograph SRI 310C) equipped with a 6' Hayesep-D column (SRI Instruments, CA, USA) and a TCD detector. The column temperature was set to 30°C. Glucose was determined by the technique of Miller (DNS) in samples taken from the liquid media (Miller, 1959).

The concentration and composition of organic acids was determined in liquid samples by HPLC (Waters) with Rezex ROA- Organic Acid H+ (8 %) (300\*7.8 mm) column with diode array (Waters 2998) detector, binary bomb (Waters 1525) and automatic injector (Waters 717 plus). Mobile phase was H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.015 M), flow rate 0.3 mLmin<sup>-1</sup> and isocratic mode. Empower 2 was the software used for analysis. These analyses were made at the analytical platform from the Clemente Estable Biological Research Institute.

Glycerol and ethanol were determined in by GC-FID Shimadzu with Aminex 87-H column at 35 °C, 0.6 mLmin<sup>-1</sup>, at the analytical platform from Engineering Faculty- UdelaR.

### *2.4 Fe (III) reduction capacity*

A colorimetric technique, which evidences the presence of Fe (II), was used. For this colorimetric detection of ferrous ion, a ferrozine solution was used (Lovley and Philips 1986). This solution was prepared with ferrozine 0.1 % (v/v) (Sigma-Aldrich, MO, USA) in 50 mM HEPES-buffer and pH adjusted to 7 by adding NaOH. Then, 0.1 mL of the pure culture was taken and 0.1 mL of 0.5 N HCl was added. After incubating 15 min at room temperature, 20 µL of the treated culture was transferred to a 2 mL spectrophotometer cuvette and 200 µL of ferrozine reagent was added. Finally, 1.5 mL of ultra-pure milliQ water (Simplicity 185, Millipore) was added. The ferrous ion forms a colored complex with ferrozine which allows its quantification by spectrophotometry at 562 nm using Shimadzu UV- 1800 Series spectrophotometer. A calibration curve was prepared using Mohr's Salt (FeSO<sub>4</sub>·(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O) (Carlo Erba, France) in 0.5 M HCl using standards between 2.5 mM and 20 mM (Achnich et al., 1995)

### *2.5 Electron microscopy*

The morphology of the strain was observed using the electron microscopy service of Faculty of Sciences (UdelaR, Montevideo, Uruguay). Contrast was made with aqueous 2 % uranyl acetate.

The grids used were made of copper covered with a formvar/carbon film, 200 mesh. The observation was made by transmission electron microscope Jeol brand JEM 1010 model operating 100 kb and the images were recorded by a Hamamatsu camera model c4742-95.

### 2.6 DNA extraction and genome sequencing

DNA was extracted from cells previously grown in PYG liquid culture using the kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Sequencing of the whole genome of the strain was performed by Macrogen Inc. service (Seoul, Korea) using Illumina HiSeq 2000 100bp paired-end reads, 1 Gigabase.

### 2.7 Genome analysis

De novo assembly was performed with SPADES Assembler v.3.1.0 using a pre-assembly approach with Velvet. Open-reading frames (ORFs) and genome analysis were predicted using RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) server database 2.0. BLAST v.2.0 software was utilized to confirm the predictions (Almuzara et al., 2017, Agaras et al., 2018).

The ANI score between Shew256 and closely related genomes was estimated. The ANI score is used to delineate species using genome sequence data. Two-way ANI (reciprocal best hits-based comparison) was computed among all closely related genomes of NAR strain by means of the ani.rb script available at [enveomics.blogspot.com](http://enveomics.blogspot.com) (Almuzara et al., 2017). As ANI score is a result from a whole genome comparison, ANI index is used to delineate species from genomes sequence data. Therefore, if two genomes display an ANI value of 95% or higher, both strains belong to the same species. Phylogenetic analysis was used to support ANI results (Agaras et al., 2018). A total of 1830 orthologous genes were identified. The 1830 groups of orthologous genes were aligned using Muscle. Poorly aligned positions were eliminated using Gblock software with default parameters and subsequently concatenated for sequence distance estimation. Genomes displaying a 99 % or more similarity in these conserved genes were clustered (Agaras et al., 2018). The search for candidate genes involved in the electron transfer was also performed. Amino acid sequences of genes found in reference strains of *Shewanella* and *Geobacter* (Table 1) were download from National Center for Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). With these sequences, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was applied to the genomic sequence of the NAR strain deposited in the RAST.

## 2.8 Study of the electrogenic capacity

To test the electrogenic capability of the strain, microbial fuel cells were operated inoculated using a pure culture of the strain. The microbial fuel cells were previously sterilized with the graphite carbon bars and the pipes. Two carbon rods were used per cell in order to increase the contact surface. In addition, 2 L of 579 DSMZ medium without Fe (III) was prepared. They were all sterilized in autoclave 121 °C, 20 min. Graphite C bars were used as working electrode (WE) and Pt was used as counter electrode (CE). Pt was sterilized by burning into fire.

Ag/AgCl reference electrodes were also sterilized. For this, an Ag/AgCl wires were prepared by immersion of the Ag wires in 0.1 M HCl and a current of 7.4 mA was applied for the accumulation of AgCl on the Ag wire surface. Then, Ag/AgCl wires were submerged in 1.2 % of agar with 3 M NaCl as it acts as a conductor into the tube compartment.

Strain NAR electroactivity tests were performed at polarized electrode at 0.4 V respecting to the working electrode (Ag/AgCl) using an 8-channel potentiostat (CHI1030B CH Instruments). 10 % of NAR strain enriched culture was inoculated, in 826 DSMZ media with 0.82 gL<sup>-1</sup> acetate (electron donor) and 8 gL<sup>-1</sup> fumarate (electron acceptor), with a syringe into anaerobic cells. The experiments were performed under permanent magnetic stirring and N<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub> gas flushing into the reactors. The system was batch operated for the first 25 h before turning on circulation of the feeding medium at 0.2 mL/min for continuous mode and current evolution was recorded over time. Temperature was controlled at 30 °C during all the experiment. For cyclic voltammetry, the potential was scanned between 0.8 and -0.8 V starting from 0 V. The scan rate was 0.005 Vs<sup>-1</sup>. Chronoamperometry was performed at the selected applied potential and acquiring 10 points per second (Schrott et al., 2011).

## 3. Results

### 3.1 Characterization of strain NAR

Strain NAR was previously isolated from a MFC operated initially with acetate and M9 and subsequently effluent output from a H<sub>2</sub> production reactor using cheese whey as substrate (Wenzel et al., 2017). The strain was isolated using a medium specific for *Geobacter* (medium DSMZ 579) with acetate as substrate and Fe (III) as electron acceptor. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene placed the strain NAR within the genus *Raoultella*. The closely-related sequence found in the GenBank according to BLAST search was *Raoultella ornithinolytica* strain ATCC 31898 (99 % similarity for the 16S rRNA gene) (ACC number NR114502) (Wenzel et al., 2017).

Strain NAR cells were rod shaped, non-motile, Gram-negative, the size according to the electron microscopy was 0.413 - 0.664  $\mu\text{m}$  wide and 1.19 - 3.04  $\mu\text{m}$  long (Figure 1). The presence of flagellated cells were not observed.

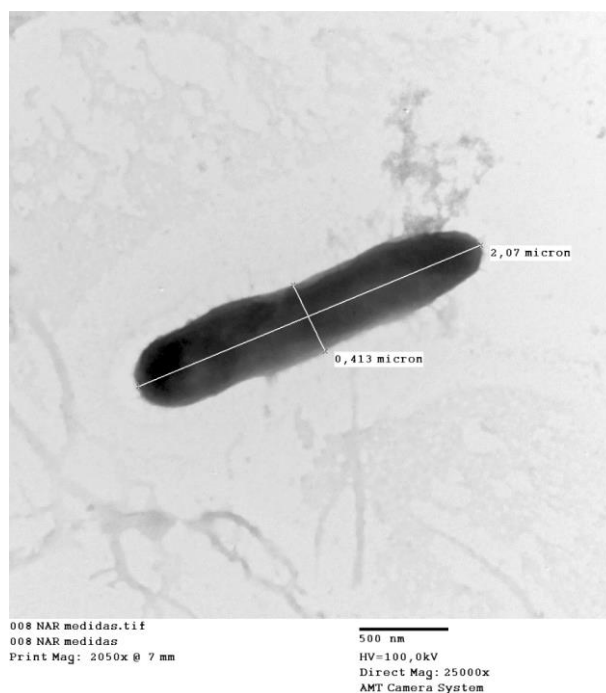


Figure 1. Electron microphotography showing one cell of the Strain NAR using negative staining.

The results of analysis of extracellular quinones indicate a composition of Q7 (14 %), Q8 (86 %) and MK8 (100 %).

The major fatty acids present in strain NAR cellular membrane were C16: 0, C14: 0 and summed feature 2 (iso-C16: 1 I and / or C14: 0 3-OH) (Table 5).

Strain NAR presented both types, respiratory and fermentative metabolism, using different sugars and other simple organic compounds as carbon and energy sources. The following compounds were utilized as carbon sources according to API tests: D-glucose, D-mannitol, D-sorbitol, L-arabinose, D-melibiose, D-ribose, D-xylose, D-adonitol, lactose, D-arabitol, esculin, citrate and, L-rhamnose, D-sucrose, D-tagatose. Voges–Proskauer reaction was positive. H<sub>2</sub>S and indole were not produced. Lysine decarboxylase was present. Fermentation-oxidation amygdaline was present. Ornithine decarboxylase is absent. It also produced H<sub>2</sub> in anaerobic conditions. Strain NAR was able to grow at temperatures between 10 - 41 °C (optimum at 37 °C achieving an OD of 0.45).



### 3.2 Fermentation products

When strain NAR was grown in minimal medium M9 with glucose as substrate, the glucose was totally consumed and acetic, succinic acid, H<sub>2</sub> and ethanol were produced. H<sub>2</sub> yield was  $2.3 \pm 0.8$  mole<sub>H<sub>2</sub></sub>/mole<sub>reducing sugars</sub>. No growth was evidenced in the same medium using acetate as substrate and without electron acceptor neither using glucose as substrate and Fe (III) as electron acceptor (Table 2). While when using acetate as substrate and Fe (III) as electron acceptor, growth was evidenced with succinate production and acetate consumption. The strain also grown in medium M9 with glycerol as substrate producing H<sub>2</sub> and ethanol as fermentation products. Under these conditions, the H<sub>2</sub> yield was  $(2.0 \pm 0.7)E-02$  mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>total glycerol</sub>. Ethanol yield was 0.76 mol<sub>EtoH</sub>/mol<sub>total glycerol</sub>

Table 2. Capability to growth and fermentation products of the Strain NAR using different conditions.

Medium	Growth	Products
M9+Glu	+	H <sub>2</sub> , acetic,succinic
M9+Glu+Fe(III)	-	-
M9+Ac+Fe(III)	+	H <sub>2</sub> , succinic
M9+Ac	-	
M9+Glycerol	+	H <sub>2</sub> , ethanol

+ Indicate detection of growth by observation of turbidity in the culture. – Indicate no detection of turbidity in the culture.

### 3.3 Electroactivity tests

To test the electroactivity of the strain NAR, a culture was performed in a MFC using as inoculum a pure culture of the strain and a medium with acetate in anaerobic conditions. After 70 hours of incubation, an increase in the current was observed, which then declined indication a weak electroactivity (Fig. 2). To determine the electrochemical characterization of biofilms developed on the anode a cyclic voltammetry (CV) was performed at approximately 138 hs, obtaining the result in Figure 3. Two peaks are observed corresponding to redox compounds.

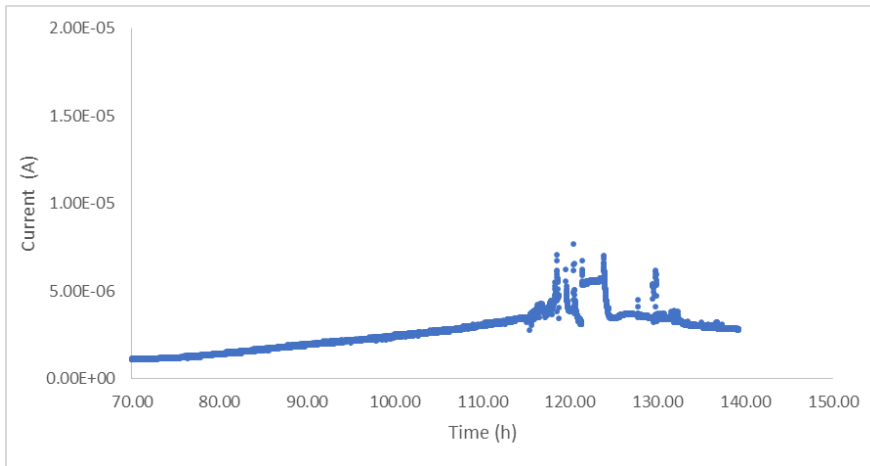


Figure 2. Chronoamperometry performed in the culture of strain NAR in a MFC with the electrode polarized at 400 mV.

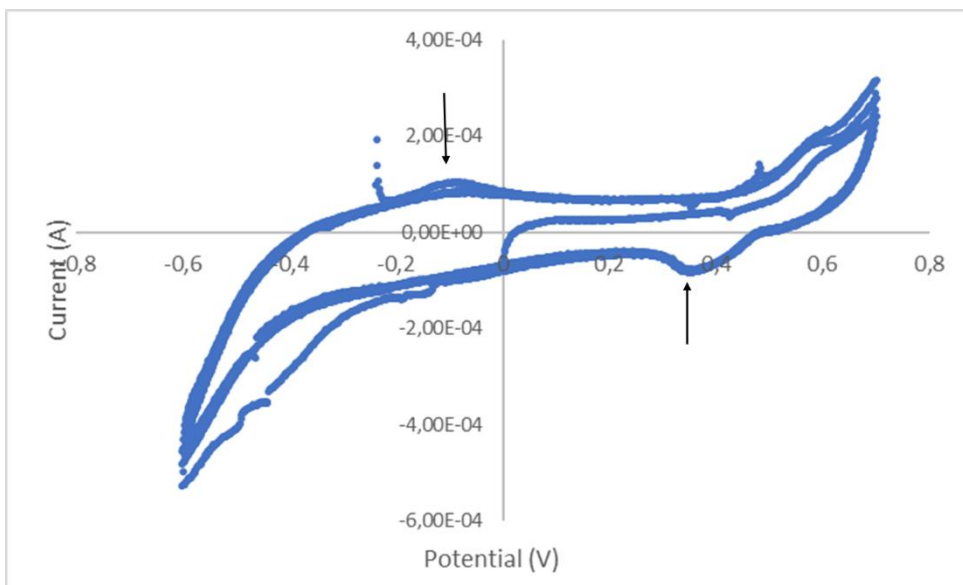


Figure 3. Cyclic voltammetry 5 mV/s at after 138 hours testing. Redox pairs are indicate by the black arrows

### 3.4 Genomic analysis of strain NAR

According to the results obtained of strain NAR genomic analysis, the genome is a single circular chromosome of 5,793,605 base pairs (bp) with a total of 5,501 of coding sequences. GC content was 55.5%. Table 3 indicates the characteristics of the genome.

The results of the phylogeny carried out using 18,000 genes with 125,000 variable sites and furthermore ANI indicates that NAR strain belongs to *Raoultella ornithinolitica* (Figure. 4). *Raoultella* genus belongs to Enterobacteriaceae family within Gamma-Proteobacteria.

Table 3. Genome characteristics

Features	Chromosome
Total number of base pairs	5,793,605
G+C content (%)	55.5
Number of coding sequences	5501
Number of RNAs	95
minimum contig length (N50)	195741
length of the smallest contig/scaffold (L50)	9

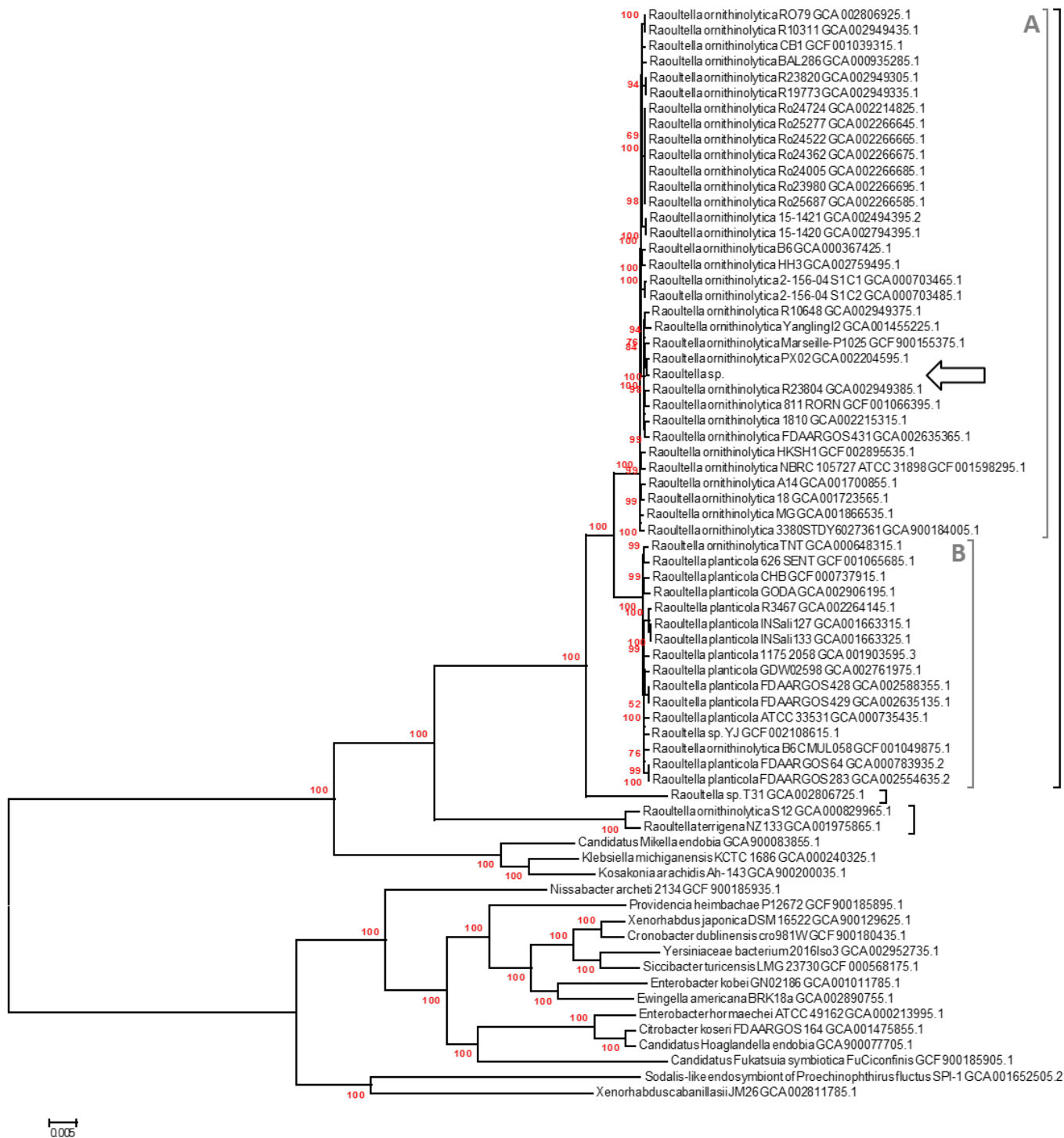


Figure 4. Phylogenetic tree of the nucleotides of NAR strain based on 1830 putative orthologous genes. The tree was inferred using Fast Tree version 2.1. Genomes from the same species based on two-way ANI score (> 95 %) were indicated with black brackets. The arrow indicates the position of NAR strain.

On the other hand, the amino acid sequences of genes found in the reference electroactive strains (*Geobacter* and *Shewanella*) were searched in the NCBI database. Sequences from candidate genes reported to be involved in electrogenesis (Table 1) were downloaded from

GenBank and the amino acid sequences of the encoding proteins were searched in strain NAR genome using tBLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). The results indicate the presence of sequences with homology with 5 genes reported to be involved in electrogenesis, which were detected in strain NAR genome (Table 4).

Table 4. Possible genes candidates found in strain NAR that would play a role in electroactivity

Reference protein	Identification	Role	Reference strain	Identification in NAR strain	% de identity
PILT (ANA41441.1 type IV pili twitching motility protein PilT)	pilin domain proteins type IV pilins	nanowires	<i>Geobacter anodireducens</i>	fig 1259973.3.PEG.4377 Twitching motility protein PILT	43 %
GspD (WP_037416417.1 MULTISPECIES: type II secretion system secretin GspD)	functional element of the type II secretion system	Crucial component in electron transfer	<i>Shewanella sp.</i>	fig 1259973.3.peg.902 General secretion pathway protein D	52 %
etfB (AAN56145.1 electron transfer flavoprotein beta subunit EtfB)	Electron transfer flavoprotein, beta subunit	electron shuttle	<i>Shewanella oneidensis MR-1</i>	fig 1259973.3.peg.5035 Electron transfer flavoprotein, beta subunit	64 %
fccA (AAN54044.1 periplasmic fumarate reductase FccA)	functional fumarate reductase tetraheme c type cytochrome	Contributes to electron transfer	<i>Shewanella oneidensis MR-1</i>	fig 1259973.3.PEG.48 Fumarate reductase flavoprotein subunit (EC 1.3.99.1)	43 %

#### 4. Discussion

##### 4.1 Phylogenetic position of strain NAR based on the genome

According to genome analysis, strain NAR was positioned within the *Raoultella* genus. This genus was formerly designated as *Klebsiella* (Drancourt et al., 2001) and it has initially three classified species: *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola* and *Raoultella terrigena*, which have been isolated from different environments and characterized by a broad spectrum of physiological activity. Some of them have the capacity to degrade different organic compounds

and some of them are able to eliminate inorganic compounds such as nitrogen, phosphorus (Xie et al., 2012), heavy metals (Sklodowska et al., 2016). Later, Kimura et al., 2014 reported a new strain isolated from anodic biofilms of a glucose-fed MFC that was named *Raoultella electrica* and it is able to produce electricity. On the other hand, Sklodowska et al (2016) reported the isolation of another *Raoultella* sp. SM1 which is able to reduce Fe (III) and uses various carbon sources in aerobic conditions. Strain SM1 can also use glycerol. It is presented as an alternative to the genus of *Shewanella* and *Geobacter* due to its specific and extensive metabolism. Physiological analysis also showed that this strain may be involved in the removal of uranium from contaminated water and sediments (Sklodowska et al., 2016).

The result of the elaboration of ANI were not in accordance with the previous classification of *Raoultella* species. *Raoultella* genus appears as a monophyletic group. This is composed by 53 genomes (the NAR strain and 52 genomes from the gene-bank). Within the *Raoultella* genus there are four well-defined lineages. An external group, *Raoultella* T31, and then two large groups composed by *Raoultella ornithinolytica* (where the NAR strain was positioned, indicated as group A) and *Raoultella planticola* (indicated as group B). In the fourth groups appears a strain classified as *R. ornithinolytica* but it could be misclassified. On the other hand, the ANI values indicated that the species of *R. ornithinolytica* and *R. planticola* would be of the same species (ANI value of 96 % indicated in the Figure in gray). The black bracket indicates that they are species with the strict criteria of 95 %. Group A and B form two independent lineages that could be in the process of speciation. They are two groups that are separating which differ by 96%. According to the genomic criteria, they would be subspecies.

#### 4.2 Strain NAR characteristics and physiology compared with other species from the genus *Raoultella*

According to the culture analysis, strain NAR had a fermentative metabolism able to ferment glucose, other sugars and glycerol. From glucose, the strain produced acetic, succinic, ethanol and H<sub>2</sub> as products, a typical acid mixture fermentation profile. The strain can also grow with acetate and citrate-Fe (III). The degradation of acetate is fundamental since it is an organic compound intermediate of the degradation of organic matter in anoxic environments (Fedorovich et al., 2009). However, Fe (II) was not detected with the method used in this condition. Probably NAR strain ferments the citrate releasing the Fe (III). Fe (III), when released, is able to generate the characteristic coppery color of ferric chloride. When dissolved in water, ferric chloride forms a colloidal solution, which has that typical brownish-brown color that all salts in iron III solution possess. On the other hand, the fact that it cannot reduce Fe(III) does not

necessarily indicate a lack of electroactivity. Another explanation is the lost of the ability to reduce Fe (III) because of its storage in non-selective medium (Yee et al., 2020). The strain also can produce H<sub>2</sub> an ethanol using glycerol as carbon source. Glycerol is the main by-product obtained during the transesterification of vegetable oils and animal fats. 0.89 mol<sub>H<sub>2</sub></sub>/ mol<sub>glycerol</sub> and ethanol at 1.0 mol/ mol<sub>glycerol</sub> with *E. aerogenes* is reported in a synthetic medium containing biodiesel waste with glycerol at 80 mM. In our experiment, 0.8 mol ethanol/ mol glycerol was achieved using 217 mM glycerol (2 %). The ethanol yield of glycerol fermentation described is low compared to the literature (Da Silva et al., 2009). On the other hand, strain NAR tolerate higher concentrations of glycerol.

When a comparison of biochemical tests results was performed including all the known species of the *Raoultella* genus (table 5) it can be noted that there are some differences with those species of *R. electrica* (strain 1 GB), *R. ornithinolytica* (NBRC 105727), *R. planticola* (NBRC 14939) and *R. terrigena* (NBRC 14941) listed by Kimura et al. (2014).

Table 5. Comparison of the results of the biochemistry tests and growth at different temperatures including representative strains of the different species within the genus *Raoultella* (Information extracted from Kimura et al., 2014 and this work)

Characteristics	<i>R. electrica</i> 1GT	<i>R. ornithinolytica</i> NBRC 105727	<i>R. planticola</i> NBRC 14939	<i>R. terrigena</i> NBRC 14941	NAR strain
<b>Growth at:</b>					
5°C	-	+	+	+	-
10°C	+	+	+	+	+
41 °C	+	+	+	-	+
50°C	-	-	-	-	-
hydrolyzed urea	+	+	+	-	+
L-ornithine decarboxilase	-	+	-	-	-
<b>Consume of:</b>					
L-Arabinose	+	+	-	+	+
L-Ramnose	-	+	+	+	+
Glucose	+	+	-	-	+
Citrate	+	+	+	-	+
GC content in DNA (mol%)	55.4	57-58	55.4	56.7	55.5

The major fatty acids present in strain NAR were C16: 0, C14: 0 and summed feature 2 (iso-C16: 1 I and / or C14: 0 3-OH). This fatty acid profile varies in comparison with the others *Raoultella* species (Table 6)

Table 6. Fatty acid analysis (Information extracted from Kimura et al., 2014)

Fatty acid	<i>R. electrica</i> 1GBT	<i>R. ornithinolytica</i> NBRC 105727	<i>R. planticola</i> NBRC 14939T	<i>R. terrigena</i> NBRC 14941	Nar
<b>Straight-chain</b>					
C10 : 0	-	0.1	0.1	-	0.06
C11 : 0	-	-	0.1	-	-
C12 : 0	3.2	3.1	3	2.5	3.59
C13 : 0	-	0.4	0.5	-	-
C14 : 0	6.9	5.7	5.5	5.2	<b>14.74</b>
C15 : 0	-	2.4	3	-	-
C16 : 0	28.4	21.3	21.5	27	<b>33.99</b>
C17 : 0	0.1	2	2.4	-	0.15
C18 : 0	-	0.2	0.2	0.2	0.28
C19 : 0	-	-	-	-	-
<b>Unsaturated</b>					
C15 : 1v8c	-	-	0.1	-	-
C16 : 1v5c	0.2	0.2	0.3	0.2	0.17
C17 : 1v6c	-	-	-	-	-
C17 : 1v8c	-	0.4	0.6	-	-
C18 : 1v5c	-	-	-	-	-
C18 : 1v7c	20.8	26.2	24.8	24.6	<b>6.5</b>
<b>Hydroxy</b>					
C12 : 0 3-OH	0.03	0.04	-	-	-
C15 : 0 3-OH	-	0.12	-	-	-
<b>Cyclopropane fatty acids</b>					
Cyclo-C17 : 0	4.2	6.5	6.7	12.9	<b>22.37</b>
Cyclo-C19 : 0v8c	0.1	0.2	0.1	0.5	<b>8.07</b>
<b>Summed features*</b>					
1	-	0.4	0.5	-	-
2	7.1	7.8	7.1	8.2	8.59
3	27.7	21.4	21.7	16.5	<b>1.5</b>

The results of analysis of extracellular quinones indicate Q7 (14 %), Q8 (86 %) and MK8 (100 %) composition in PYG media. This composition was different from the reported for *Raoultella electrica* with Q8 (64.3 %), Menaquinone-8 (MK8) (32.2 %) and dimethylmenanquinone (DMK-8) (3.4 %) (Kimura et al., 2014).

These ubiquinones may play a role in being an extracellular electron shuttle (Kimura et al., 2014). It has been previously reported the production of 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone by *Klebsiella pneumoniae* strain L17 as the electron shuttle (Deng et al., 2010). The capacity of oxidation of the reduced species depends on the microorganisms present in the cell. This species could be the quinones presented in strain NAR. Table 7 shows some possible candidate genes involve in electrogenesis, which include menaquinones genes.



Table 7. Possible genes candidates found in strain NAR that would play a role in electroactivity

NAR strain gene	Genes Rol	Possible role in electrogenesis
piliA	Encodes pilin protein of type IV	nanowires
menF, menD, menH, menC, menE, menB, menA,ubiE	Encode enzymes involved in the synthesis of Menaquinones	electron shuttle
CobA, CobD, CbiP, CbiB, CobU, CobU2, CobT, CobC	Synthesis of cobalamin, redox mediator	electron shuttle
CcmA, CcmB, CcmC, CcmE, CcmD, CcmF, CcmL, CcmH, CcmG, DsbA, DsbB, DsbD/ccdA,	Cytochrome synthesis type c	nanowires
Feo family genes, Fbp, OMR1, TPD, Piu, FUR	Transport and iron metabolism	The reduction capacity of Fe + 3 to Fe + 2 is characteristic of some electrogenic bacteria

#### 4.3 Electroactivity in the Microbial fuel cell

The production of current was observed (maximum 0.00771 mA) however it was lower in comparison with the current reported for *G. sulfurreducens* (1.4 mA reported by Bond et al., 2003). In another publication is reported a current of 0.19 mA for *Klebsiella pneumoniae* L17 (Kim et al., 2019) which is also considered electroactive. The presence of the peaks in CV could indicate the existence of redox pair compound produced by NAR strain that could be responsible for the electron transference to the anode.

Although the production of current was observed during growth in the MFC, it is difficult to assign the electroactivity capacity to strain NAR since there is neither a fix definition of electroactivity nor the genetic marker nor a standard (Koch and Harnisch, 2016). Doyle et al., 2018 added the concept of weak electricigens. These microorganisms could be considered electroactive under certain conditions producing weak current as in the case of *Shewanella*. Weak electrogens are associated with facultative anaerobic microorganism with a diverse metabolism, with a wide metabolic capacity through the anaerobic-aerobic interface and small current. *Raoultella* complies with these characteristics, therefore it could be suggested to be considered as a weak electricigens. While the role of strong electricigens as *Geobacter* is has been thoroughly explored, the relevance of weak electricigens has not yet been assessed. Doyle et al., 2018 suggested that these microorganisms could play a role in oxygen scavenging for anaerobic strong electricigens, and utilize EET only as a survival strategy in times of metabolic emergency (Doyle et al., 2018).

On the other hand, it was reported that electroactivity testing and subsequent biotechnology applications depends on the maintenance of strains isolated on soluble substrates. It was

reported that the electroactive strains isolated and maintained in soluble substrates adapt to a non-selective metabolism by decreasing the expression of certain genes. Electroactive microorganisms can lose their capabilities when grown under non-specific conditions in the laboratory. Enrichment of biotechnologically relevant and effective electroactive microorganisms requires an electrochemical isolation approach. This could explain the low current levels observed in chronometry and the decrease in the growth of the NAR strain under anaerobic conditions after growing in non-selective electroactive metabolism (Yee et al., 2020).

#### 4.4 Metabolic insights from the genome

Using RAST online platform (<http://rast.nmpdr.org/>) specific genes that would indicate electroactivity in strain NAR genome were searched. In order to do this, bibliographic search was made to find genes reported to be present and specific of electrogenic microorganism (Table 1).

Two mechanism of electron transfer based on either direct contact by outer membrane cytochromes or use of excreted mediators (also known as shuttles) or nanowires were previously reported. Conductive pili was also reported as possible players (Sydow et al., 2014). Studies have been centered in *Geobacter* and *Shewanella* strains.

*Shewanella* present direct electron transfer by specific cytochromes and it has also conductive nanowires. Flavins are produced by *S. oneidensis* which could act as electron shuttles. The lack of genes coding for cytochromes MtrC and OmcA in this strain were associated with nonconductive filaments. MtrB, MtrA, and CymA were also reported to play a special role on anode reduction (Table 1). The functions of MtrA, MtrB, and MtrC from *S. oneidensis* could be substituted to some extent by their sequence homologues MtrD, MtrE, and MtrF (Malvankar et al., 2014; Gorby et al., 2005; El-Naggar et al., 2010)

On the other hand, *G. sulfurreducens* present nanowires of type IV pili (Butler et al., 2004) Conductivity of *G. sulfurreducens* pili can be attributed to the passage of electrons through the pili to the cytochromes associated to it, similar to nanowires in *S. oniedensis*. The periplasmic cytochrome PpcA is reported to play a role in *G. sulfurreducens* anode biofilms being the most abundant cytochrome in this strain. The outer surface cytochrome OmcZ facilitate electron exchange at the biofilm/anode interface. OmcS/OmcT, OmcE, OmcB play a role in anode reduction. GSU3274 participate in its cathode oxidation. Some c-type cytochromes OmcB and OmcC, OmcG and OmcH are the result of gene duplications. GspD is an element of the type II

secretion system (GspD) used for the extracellular translocation of cytochromes for *S. oneidensis* and pili for *G. sulfurreducens* (Sydow et al., 2014; Malvankar et al., 2014).

With regard to the sequences mentioned in table 1, only sequences related to the synthesis of pili (PILT), GspD, etfB and fccA were found in strain NAR genome. However, the identity percentages were very low. Previous studies on transcriptome analyses in *Klebsiella pneumoniae* L17 have shown that the expression of the redox-related genes of electrochemically active strains was clearly responsive to the import or export of the respiratory electrons (Kim et al., 2019). As for electroactivity, it may not be a characteristic of the species but may be a polymorphism. That is, to acquire the capacity, they should acquire the gene cluster. The acquisition of these genes could depend on the genomic context presented in the microorganism in order to acquire the electrogenic capacity.

## 5. Conclusions

Several approaches have been applied for the characterization of the NAR strain isolated from a MFC. According to the genomics analysis the strain was classified within the species *Raoultella onithinolyca*. Strain NAR is able to consume a wide variety of carbohydrates. It produces ethanol and H<sub>2</sub> from 2 % glycerol, suggesting an important application of the strain in the production of biofuels using wastes. Based on the electroactivity studies and the search for possible electroactive genes, it could be suggested that present a weak electroactivity and part of this electroactivity could have been lost due to successive non-selective enrichments. Strain NAR produce quinones, which are probably involved in the electro-transfer as electron-shuttle. This is the first report of electrogenesis in the species *Raoultella onithinolyca* and the second report in the genus. More studies are necessary to confirm the role of the genus *Raoultella* in MFCs as well as the electrogenesis mechanism.

## Acknowledgments

The electroactivity tests were carried out in collaboration with Laboratorio de Bioelectroquímica, INTEMA (CONICET), Mar del Plata University. HPLC analysis was performed in Engineering Faculty, UdelaR. We want to thanks to Eloísa Rochón for providing GC-FID platform in Engineering Faculty, UdelaR

## REFERENCES

Acht nich, C., Schuhmann, A., Wind, T., & Conrad, R. (1995). Role of interspecies H<sub>2</sub> transfer to sulfate and ferric iron-reducing bacteria in acetate consumption in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(1), 61-69.

- Agaras, B. C., Iriarte, A., & Valverde, C. F. (2018). Genomic insights into the broad antifungal activity, plant-probiotic properties, and their regulation, in *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6. *PloS one*, 13(3), e0194088.
- Almuzara, M., Montaña, S., Lazzaro, T., Uong, S., Di Noto, G. P., Traglia, G., ... & Ramirez, M. S. (2017). Genetic analysis of a PER-2-producing *Shewanella* sp. strain harbouring a variety of mobile genetic elements and antibiotic resistance determinants. *Journal of global antimicrobial resistance*, 11, 81-86.
- Butler, J. E., Kaufmann, F., Coppi, M. V., Núñez, C., & Lovley, D. R. (2004). MacA, a diheme c-type cytochrome involved in Fe (III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of bacteriology*, 186(12), 4042-4045.
- 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.
- Da Silva, G. P., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances*, 27(1), 30-39.
- Deng, L., Li, F., Zhou, S., Huang, D., & Ni, J. (2010). A study of electron-shuttle mechanism in *Klebsiella pneumoniae* based-microbial fuel cells. *Chinese Science Bulletin*, 55(1), 99-104.
- Doyle, L. E., & Marsili, E. (2018). Weak electricigens: A new avenue for bioelectrochemical research. *Bioresource technology*, 258, 354-364.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 925-932.
- El-Naggar, M. Y., Wanger, G., Leung, K. M., Yuzvinsky, T. D., Southam, G., Yang, J., ... & Gorby, Y. A. (2010). Electrical transport along bacterial nanowires from *Shewanella oneidensis* MR-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18127-18131.
- Fedorovich, V., Varfolomeev, S. D., Sizov, A., & Goryanin, I. (2009). Multi-electrode microbial fuel cell with horizontal liquid flow. *Water Science and Technology*, 60(2), 347-355.
- Gorby, Y., Biju, V., Pan, D., McLean, J., Saffarini, D., Fredrickson, J., & Lu, H. P. (2005). Display and retraction of outer membrane cytochromes by *Shewanella oneidensis* in response to electron acceptor availability. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69, A671-A671.

- Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Gaidos, E. J., Nelson, W. C., Read, T. D., ... & Clayton, R. A. (2002). Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature biotechnology*, 20(11), 1118-1123.
- Holmes, D. E., Chaudhuri, S. K., Nevin, K. P., Mehta, T., Methé, B. A., Liu, A., ... & Lovley, D. R. (2006). Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Microbiology*, 8(10), 1805-1815.
- Ieropoulos IA, Greenman J, Melhuish C, Hart J. (2005). Comparative study of three types of microbial fuel cell. *Enzyme Microb Technol*;37: 238–45.
- Ishii, S. I., Suzuki, S., Norden-Krichmar, T. M., Wu, A., Yamanaka, Y., Neelson, K. H., & Bretschger, O. (2013). Identifying the microbial communities and operational conditions for optimized wastewater treatment in microbial fuel cells. *Water research*, 47(19), 7120-7130.
- Keck, A., Rau, J., Reemtsma, T., Mattes, R., Stolz, A., & Klein, J. (2002). Identification of quinoide redox mediators that are formed during the degradation of naphthalene-2-sulfonate by *Sphingomonas xenophaga* BN6. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4341-4349.
- Kimura Z, Chung KM, Itoh H, et al (2014) *Raoultella electrica* sp. nov., isolated from anodic biofilms of a glucose-fed microbial fuel cell. 1384–1388. doi:10.1099/ijs.0.058826-0
- Kim, M. Y., Kim, C., Ainala, S. K., Bae, H., Jeon, B. H., Park, S., & Kim, J. R. (2019). Metabolic shift of *Klebsiella pneumoniae* L17 by electrode-based electron transfer using glycerol in a microbial fuel cell. *Bioelectrochemistry*, 125, 1-7.
- Koch, C., & Harnisch, F. (2016). Is there a specific ecological niche for electroactive microorganisms?. *ChemElectroChem*, 3(9), 1282-1295.
- Kuykendall, L.D., Roy, M.A., O'Neill, J.J., Devine, T.E. 1988. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38:358-361.
- Loaces, I., Rodríguez, C., Amarelle, V., Fabiano, E., & Noya, F. (2016). Improved glycerol to ethanol conversion by *E. coli* using a metagenomic fragment isolated from an anaerobic reactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(10), 1405-1416.
- Logan, B. E. (2010). Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(6), 1665-1671.
- Logan, B.E. y Regan, J.M. (2006). Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *Trends in microbiology* 14, 512–518.

- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. (1986). Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Applied and environmental microbiology*, 51(4), 683-689.
- Malvankar, N. S., & Lovley, D. R. (2012). Microbial nanowires: a new paradigm for biological electron transfer and bioelectronics. *ChemSusChem*, 5(6), 1039-1046.
- Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., & Bond, D. R. (2008). *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3968-3973.
- Methe, B. A., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Paulsen, I. T., Nelson, W., Heidelberg, J. F., ... & Dodson, R. J. (2003). Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science*, 302(5652), 1967-1969.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Urbana-Champaign, v. 31, p. 426, 1959
- Miller, L.T. 1982. A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology* 16:584-586.
- Perna V, Castelló E, Wenzel J et al (2013) Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. *Int J Hydrogen Energy* 38:54–62. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.10.022
- Rabaey, K., Ossieur, W., Verhaege, M., & Verstraete, W. (2005). Continuous microbial fuel cells convert carbohydratesto electricity. *Water Science and Technology*, 52(1-2), 515-523.
- Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*, 23(6), 291-298.
- Rahimnejad, M., Adhami, A., Darvari, S., Zirepour, A., & Oh, S. E. (2015). Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: a review. *Alexandria Engineering Journal*, 54(3), 745-756.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098-1101.
- Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., & Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: from fundamentals to applications. A review. *Journal of power sources*, 356, 225-244.
- Sklodowska, A., Mielnicki, S., & Drewniak, L. (2018). *Raoultella* sp. SM1, a novel iron-reducing and uranium-precipitating strain. *Chemosphere*, 195, 722-726.
- Schrott, G. D., Bonanni, P. S., Robuschi, L., Esteve-Nuñez, A., & Busalmen, J. P. (2011). Electrochemical insight into the mechanism of electron transport in biofilms of *Geobacter sulfurreducens*. *Electrochimica acta*, 56(28), 10791-10795

- Sydow, A., Krieg, T., Mayer, F., Schrader, J., & Holtmann, D. (2014). Electroactive bacteria—molecular mechanisms and genetic tools. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(20), 8481-8495.
- Tindall, B.J. (1990a). A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 13, 128-130
- Tindall, B.J. (1990b). Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol. Letts.* 66, 199-202
- Von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S., & Lloyd, J. R. (2008). Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and environmental microbiology*, 74(3), 615-623.
- Xing, D., Cheng, S., Regan, J. M., & Logan, B. E. (2009). Change in microbial communities in acetate-and glucose-fed microbial fuel cells in the presence of light. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(1), 105-111.
- Wenzel, J., Fuentes, L., Cabezas, A., & Etchebehere, C. (2017). Microbial fuel cell coupled to biohydrogen reactor: a feasible technology to increase energy yield from cheese whey. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(6), 807-819.
- Yee, M. O., Deutzmann, J., Spormann, A., & Rotaru, A. E. (2020). Cultivating electroactive microbes—from field to bench. *Nanotechnology*, 31(17), 174003.

## Capítulo 4



## 1. Introducción

### 1.1. Electrofermentación como forma de aumentar la producción de H<sub>2</sub>

El proceso de fermentación se considera una de las plataformas versátiles y potenciales que puede producir una gran variedad de productos de base biológica, incluidos combustibles y productos químicos a partir de materias primas basadas en desechos de manera sostenible. En los últimos años, los sistemas electroquímicos microbianos (MES) han atraído una atención significativa debido a su potencial aplicación (Mohan et al., 2014). La integración de fermentación y MES conduce a un bioproceso híbrido denominado electrofermentación (EF) que toma las características ventajosas de ambos procesos con la capacidad de dirigir el metabolismo hacia la producción selectiva (Sraavan et al., 2018).

La fermentación tradicional implica la utilización de diversas formas de materia prima (sea sintética o el uso de desechos) para producir productos de base biológica como ácidos carboxílicos de cadena corta (ácido acético, ácido butírico, ácido propiónico, etc.), hidrógeno, metano, solventes (etanol, butanol, propanol y acetona) entre otros. Sin embargo, las reacciones de fermentación tienen varias limitaciones termodinámicas que limitan las productividades y los rendimientos globales (Schievano et al., 2016; Kiely et al., 2011). El desarrollo de innovaciones para obtener mayores rendimientos para los procesos de fermentación convencionales con beneficios económicos se considera una prioridad en la bioeconomía (Sraavan et al., 2018).

La EF es un proceso que permite controlar electroquímicamente el metabolismo de la fermentación microbiana utilizando electrodos para mejorar la producción de metabolitos de interés (Schievano et al., 2016). Combina los conceptos de fermentación convencional y electromicrobiología. En este caso, los microorganismos interactúan con un electrodo polarizado a través de mecanismos de transferencia de electrones extracelulares directos DIET (en inglés "direct electron transference") o indirectos MIET ("mediated electron transference") (Rabaey y Rozendal, 2010; Creasey et al., 2018). El proceso DIET ha sido ampliamente estudiado en microorganismos modelo como *Geobacter sulfurreducens* y *Shewanella oneidensis*. El proceso consiste en la transferencia de electrones a través de pili o citocromos (Hirose et al., 2018; Lovley y Walker, 2019). Por otro lado, MIET implica el uso de mediadores de electrones producidos por células (por ejemplo, fenazinas, flavinas, H<sub>2</sub>, formiato, entre otros) o añadidos artificialmente (por ejemplo, sustancias húmicas, rojo neutro) (Thrash y Coates, 2008; Creasey et al., 2018).

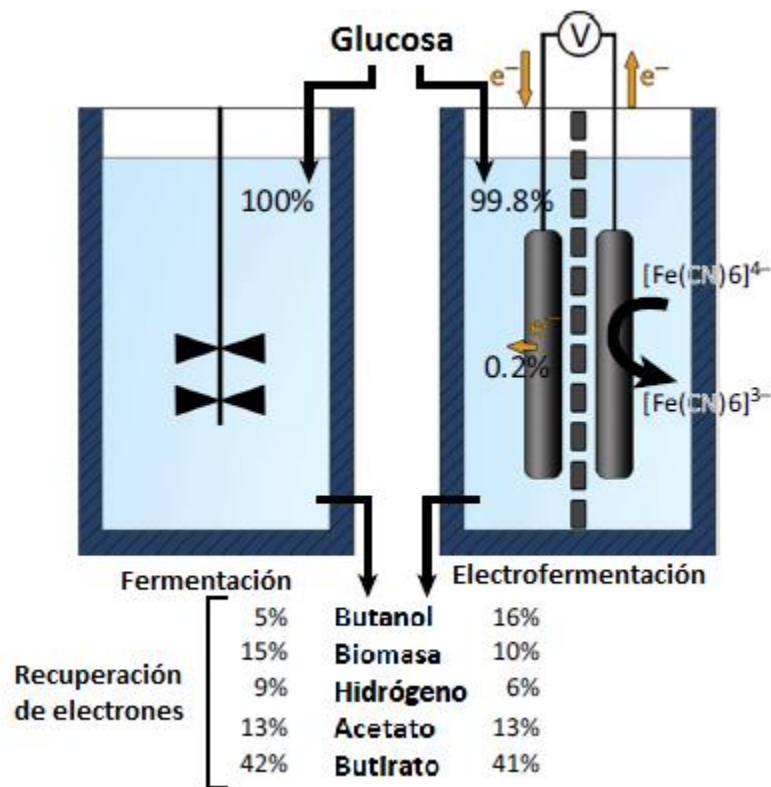


Figura 1. Comparación entre una fermentación clásica y una electrofermentación. Los valores en porcentaje representan la contribución inicial de electrones (sustratos) o la recuperación de electrones (productos) obtenidos durante los experimentos realizado por Choi et al., 2012. Adaptado de Moscoviz et al., 2016.

En el estudio realizado por Sravan et al., 2018 se demostró que la estimulación electroquímica con el uso de electrodos influye en la cinética de las velocidades de reacción al aumentar sus capacidades bio-electrocatalíticas y al regular el flujo de electrones hacia la biosíntesis del producto. Esta estimulación externa también influyó en las composiciones de perfiles de ácido carboxílico (C2-C4) y biogás ( $H_2$ ,  $CH_4$ ). El perfil metagenómico evidenció el enriquecimiento de bacterias muy específicas de la actividad acidogénica. La EF utilizando desechos de alimentos como sustrato dio lugar a diversos productos metabólicos de alto valor comercial junto con la remediación de desechos (Sravan et al., 2018).

La EF se ha aplicado tanto en cultivos puros como mixtos. La EF se ha utilizado para aumentar la producción de butanol o  $H_2$  a partir de glucosa (Choi et al., 2014; Toledo-Alarcón et al., 2019). La EF también se ha aplicado para la fermentación de glicerol dado su alto contenido de electrones (4,7 moles de electrones por mol de carbono en comparación con cuatro moles de electrones por mol de carbono para glucosa) y, además, es un efluente industrial. En este caso, el glicerol está tan reducido que incluso la síntesis de biomasa genera un exceso de portadores

de electrones intracelulares (es decir, NADH, NADPH). La mayoría de los productos finales de fermentación (por ejemplo, etanol, acetato, butirato y lactato) también están asociados con la generación neta de NADH, cuando se producen a partir de glicerol. De hecho, solo unas pocas vías que tienen un consumo neto de NADH están disponibles en la fermentación de glicerol. En estas vías se produce H<sub>2</sub> o el glicerol se convierte en 1,3-propanodiol (PDO). El H<sub>2</sub> tiene interés como biocombustible. El PDO es un producto de interés industrial que puede usarse para la producción de resinas, cosméticos, solventes y polímeros (Zeng y Sabra, 2011), y su producción ha sido el foco de numerosos estudios científicos (Almeida et al., 2012; Moscoviz et al., 2017).

### 1.2 Electrosíntesis microbiana

El término "electrosíntesis microbiana" fue introducido por primera vez en 2010 por Nevin et al. En su estudio utilizan *Sporomusa ovata* capaz de aceptar electrones de un cátodo y reducir el CO<sub>2</sub> a ácido acético. Ellos definieron la electrosíntesis microbiana como la reducción de dióxido de carbono a compuestos de carbono más complejos mediante el uso de electrones donados de un electrodo (Nevin et al., 2010). Poco después, en una revisión exhaustiva publicada por Rabaey y Rozendal se discutió muy a fondo los principios, desafíos y oportunidades de los MES. En esa revisión, también introdujo la EF como un proceso electroquímico para controlar las vías de fermentación usando corriente eléctrica (Rabaey y Rozendal, 2010). La aplicación de la corriente eléctrica a la fermentación se remonta a un estudio publicado en 1940, en el que se demostró que la corriente eléctrica reducía el tiempo de proceso y mejoraba la preparación y el sabor del té durante un estudio de su fermentación (Lominadze, 1940). El uso de MES y EF aplicado al tratamiento de desechos orgánicos tiene un gran potencial ya que estos procesos pueden capturar electrones de fuentes solares, eólicas, de biomasa o renovables y almacenar la energía formando enlaces químicos covalentes (Jiang et al., 2019).

Tanto MES como EF utilizan mecanismos electroquímicos para influir en las actividades metabólicas microbianas y producir bioproductos específicos. Los primeros estudios tendieron a incluir EF en el concepto amplio de MES (Rabaey y Rozendal, 2010), sin embargo, estudios recientes separaron la EF porque tiene propiedades únicas con respecto a los principios de reacción y especificidades operativas, que son diferentes de definición tradicional de MES (Moscoviz et al., 2016; Schievano et al., 2016). En comparación con MES que presenta intercambio de electrones entre electrodos y células microbianas, la EF pretende estimular el metabolismo microbiano mediante la modificación electroquímica del estado redox intracelular y, por lo tanto, no prefiere el contacto directo. La corriente eléctrica suministrada por los electrodos en la EF no es la única fuente de electrones, sino que influye en el flujo de la

fermentación autónoma regulando el potencial de oxidación- reducción (ORP) y la relación NAD/NADH. Sin embargo, los mecanismos involucrados en EF aún no se entienden completamente por lo que es necesario estudiar este proceso (Jiang et al., 2019).

Los electrodos pueden actuar como una fuente o sumidero de electrones (Kumar et al., 2018). En este contexto la EF puede ser anódica o catódica. Cuando el producto final de interés está más oxidado que el sustrato (por ejemplo, etanol a partir de glicerol), el electrodo de trabajo (WE) funciona como un ánodo y se utiliza para disipar el exceso de electrones en electrofermentación anódica (AEF). En un EF anódico, el electrodo sólido sirve como un aceptador de electrones, por lo que los microorganismos pueden suministrar electrones a la degradación de sustratos orgánicos (Jiang et al., 2019). La producción mejorada de etanol a partir de glicerol se ha estudiado en EF anódica.

### 1.3 Microorganismos involucrados

En un estudio realizado por Flynn et al., (2010) se utilizó una cepa *Shewanella oneidensis* diseñada genéticamente para la obtención de etanol utilizando el electrodo para poder eliminar el exceso de electrones (Flynn et al., 2010). Otro estudio informó el uso de una cepa de *Escherichia coli* diseñada con el agregado de cadenas respiratorias de 3 citocromos (CymA, MtrA y STC) dando lugar a más productos oxidados (etanol y ácido acético) a partir de glicerol (Sturm-Richter et al., 2015). También se han realizado ensayos en cocultivo de *Geobacter sulfurreducens* y *Clostridium cellobioparum* donde se reportó que podrían formarse relaciones sinérgicas con el fermentador para convertir el glicerol en etanol mientras *Geobacter* eliminaba los subproductos fermentativos (Speers et al., 2014). En otro estudio de Bursac et al., 2017 se utilizó una cepa de *S. oneidensis* genéticamente modificada en la EF anódica para producir acetoína de alto rendimiento a partir de lactato. Esta cepa presentaba delección de los genes de acetato quinasa y fosfotransacetilasa. El mutante pudo alcanzar hasta el 86% de la acetoína máxima teórica del lactato (Bursac et al., 2017). Esto amplió los sustratos que pueden ser utilizados por *S. oneidensis*. En otro estudio se utilizó una *E. coli* mutante con la inserción de citocromos de tipo c de *S. oneidensis* logrando mejorar el rendimiento de acetoína al 79% del máximo teórico de la glucosa. En este caso además se usó azul de metileno como mediador de electrones (Förster et al., 2017). También con la EF se logró que *Ralstonia eutropha* pudiera producir un 60% más de polihidroxitirato (PHB) con un potencial de trabajo de 0.6 V en comparación con el control (Nishio et al., 2014). La EF anódica tiene la ventaja de una mayor carga de biomasa en comparación con la EF catódica porque el bajo potencial de electrodo en la EF catódica inevitablemente restringe la ganancia de energía (Vassilev et al., 2018a)

Por otro lado, si el producto final de interés es reducido (por ejemplo, butanol a partir de glucosa), el electrodo suministra electrones funcionando como cátodo en electrofermentación catódica (CEF) (Moscoviz et al., 2016). En este caso, el electrodo de trabajo sirve como donante de electrones, que puede ser utilizado por los microorganismos para sintetizar diferentes productos dependiendo del potencial redox. En este caso, se han producido compuestos orgánicos como butanol, acetato, lactato, butirato PDO, lisina y polihidroxicanoatos (PHA). Los estudios han demostrado que al usar los electrones suministrados directamente por el electrodo, la formación de NADH podría alterarse como en el caso de *Clostridium tyrobutyricum* BAS 7, donde se estimuló la producción de ácido butírico y butanol a partir de sacarosa (Choi et al., 2012). Del mismo modo, dicha regulación desencadenó un cambio metabólico en *Clostridium pasteurianum* hacia la producción de butanol a partir de la glucosa que consume NADH (Choi et al., 2014; Mostafazadeh et al., 2016).

La EF catódica también se ha utilizado para estimular la producción de PDO. Se observó en *Clostridium pasteurianum* que aplicando un potencial de trabajo de 0,045 V se generó un cambio metabólico de glicerol a la producción del metabolito PDO que consume NADH (Choi et al., 2014). La EF catódica proporciona un nuevo enfoque para regular las vías de fermentación al proporcionar un poder reductor alternativo para obtener compuestos más reducidos para la inhibición causada por la acumulación de ácidos grasos volátiles, H<sub>2</sub>S y otros compuestos (De Vrieze et al., 2018).

La transferencia de electrones entre los electrodos y los microorganismos puede ser bidireccional. Además se descubrió que las interacciones sintróficas entre las bacterias fermentativas y las bacterias electroactivas desempeñan funciones esenciales en los reactores de EF, principalmente debido a la degradación de sustratos orgánicos poliméricos complejos (Jiang et al., 2019).

#### *1.4 Efecto de la densidad de corriente en la EF*

El proceso de EF es una fermentación espontánea influenciada electroquímicamente, por lo que la densidad de corriente en EF (0.001-10 Am<sup>-2</sup>) (Moscoviz et al., 2018; Sturm-Richter et al., 2015), es generalmente menor que la corriente medida en MES (0.01-200 Am<sup>-2</sup>) (Jourdin et al., 2016; Nevin et al., 2011). Por ejemplo, un estudio catódico de EF informó que solo el 0.2% de los aportes de electrones catódicos se utilizaron para la producción de butanol, mientras que el 99.8% de los electrones se originaron en el sustrato de glucosa (Choi et al., 2014). Por otro lado, la mayoría de las MES dependen únicamente de la potencia de derivación proporcionada por el electrodo, por lo que sus reacciones no son espontáneas sin la fuerza impulsora externa

(Bajracharya et al., 2017a). Un parámetro útil para diferenciar MES y EF se denomina coeficiente de EF, que se utiliza para calcular la contribución de la carga transferida a través del circuito externo a la carga total en los productos finales (Moscoviz et al., 2016). Mediante este cálculo, el valor del coeficiente de EF en EF varía entre 0 y 1 (Choi et al., 2014). En contraste, el coeficiente de MES es  $> 1$ , debido al hecho de que el electrodo se usa como la única fuente de poder reductor (Jiang et al., 2019).

### *1.5 Mecanismos involucrados en EF*

Un proceso de fermentación corresponde a una cascada de reacciones de oxidación y reducción que deben mantenerse en equilibrio. Uno de los parámetros relevantes es el potencial de ORP del medio de fermentación, también conocido como ORP extracelular, que controla el metabolismo microbiano. El pH es una medida de la actividad protónica, el ORP extracelular corresponde a la actividad de los electrones presentes en el medio. Se ve afectado principalmente por la temperatura, la composición química del medio y el grado de reducción de los metabolitos producidos por la fermentación. El ORP extracelular es particularmente importante porque puede afectar el ORP intracelular a través del equilibrio oxidación-reducción de NAD (NADH/ NAD<sup>+</sup>). El ORP intracelular representa el estado redox dentro de una célula y puede estimarse a partir de la relación NADH/ NAD<sup>+</sup>. Se sabe que controla la expresión génica y la síntesis de enzimas, lo que impacta en todo el proceso metabólico y puede modificar las vías metabólicas (Schievano et al., 2016).

El control químico de la ORP extracelular se puede implementar para mejorar la producción de metabolitos. Se postula que los electrodos en la EF generan una modificación del potencial de oxidación-reducción a través de la disipación de los electrones en exceso emitidos por la fermentación o un pequeño suministro de electrones adicionales al medio de fermentación. Como se mencionó anteriormente, a diferencia de otros dispositivos bioelectroquímicos como las celdas de combustible microbianas, la corriente eléctrica no es el producto de interés ni la principal fuente de energía, sino que es un disparador que permite que el proceso de fermentación se produzca en condiciones de desequilibrio (Moscoviz et al., 2016)

En cuanto a la comunidad microbiana, se postula la interacción sintrófica entre bacterias fermentativas y electroactivas. Aquí, un microorganismo fermentativo proporciona un co-substrato a las bacterias electroactivas que, a cambio, hace que la fermentación sea termodinámicamente favorable al eliminar los productos finales inhibidores (Moscoviz et al., 2016, 2017)

Finalmente, algunos autores también evidenciaron que los electrodos polarizados generan cambios en la estructura celular y en el potencial zeta de membrana en *Clostridium pasteurianum* que pueden generar cambios metabólicos (Choi et al., 2014). En la figura 2 se indican los mecanismos hipotéticos de AEF. En la figura 2c se observa las interacciones sintróficas que ocurren por un fenómeno denominado transferencia de electrones interespecies (IET). Según la ley del equilibrio químico, el consumo de metabolitos excretados por los microorganismos receptores puede acelerar el metabolismo de los microorganismos donantes. Este es el concepto de sintrofia, que es un tipo de mutualismo y gobierna el metabolismo y el crecimiento de diversos microorganismos en ecosistemas naturales. Un ejemplo de esto se encuentra en las comunidades metanogénicas, donde los equivalentes reductores, por ejemplo, hidrógeno y formiato, se transfieren entre socios sintróficos. Los estudios han revelado que los microorganismos involucrados en la sintrofia han desarrollado mecanismos moleculares para establecer asociaciones específicas y comunicación interespecies, lo que resulta en una cooperación metabólica eficiente. Además, estudios recientes han proporcionado evidencia que sugiere que la transferencia interespecies de equivalentes reductores también se produce como corriente eléctrica a través de conductos eléctricos bióticos (el uso de los pili) y abióticos (mediante partículas conductoras de minerales y carbono por ejemplo). Estas interacciones tienen roles fundamentales en la configuración de la estructura y la actividad de las comunidades microbianas y es la IET (Kouzuma et al., 2015).

#### 1.6 Efecto de la EF en la producción de H<sub>2</sub>

La producción convencional de H<sub>2</sub> por fermentación oscura implica la actividad de microorganismos anaerobios a través de vías de fermentación. Durante la fermentación, las células buscan eliminar sus electrones en exceso y regenerar ferredoxina y NADH a través de la producción de H<sub>2</sub> y otros metabolitos solubles. Las condiciones operativas del sistema influyen en el metabolismo celular de las bacterias fermentativas, así como también en la selección de una comunidad microbiana específica (Liu et al., 2013). Los altos rendimientos de H<sub>2</sub> están asociados con altas producciones de butirato y acetato. En general, cuando *Clostridium* es abundante o dominante se observan mayores rendimientos en H<sub>2</sub> y butirato (Castelló et al., 2020).

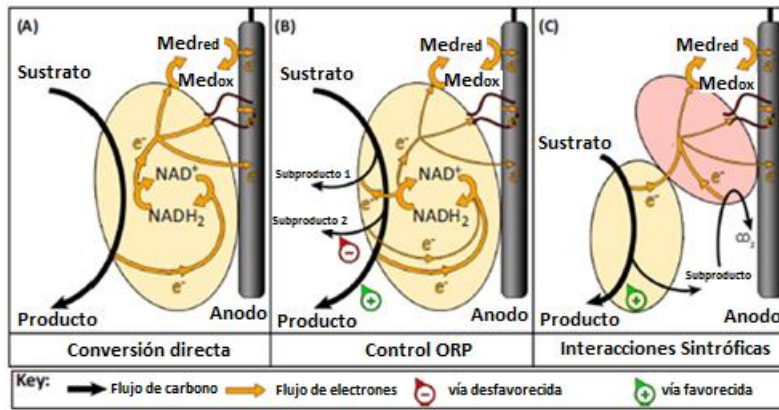


Figura 2. Esquema de los diferentes mecanismos postulados de electrofermentación **(A)** El sustrato se convierte directamente en el producto, y el exceso de electrones se disipa completamente en el ánodo. **(B)** Con el control de ORP, el exceso de electrones generado durante la formación de productos oxidados no se disipa completamente en el ánodo sino que se usa para obtener determinado sustrato. La disipación de electrones en el ánodo tiende a disminuir la relación  $NADH / NAD^+$ , lo que da como resultado una regulación celular compensatoria que favorece las vías para regenerar  $NADH$ . **(C)** El microorganismo fermentativo (amarillo) consume el sustrato pero no puede interactuar con el ánodo. El microorganismo electroactivo (rojo) actúa como un mediador entre el microorganismo fermentativo y el ánodo a través de mecanismos de transferencia de electrones interespecies (IET). El microorganismo electroactivo también consume subproductos de la fermentación del sustrato, lo que favorece el proceso general de fermentación. Abreviaturas:  $Med_{ox}$ , mediador oxidado;  $Med_{red}$ , mediador reducido; ORP, potencial de oxidación-reducción. Imagen tomada y modificada de Moscoviz et al., 2016.

El uso de la EF anódica para estimular la producción de  $H_2$  puede considerarse como un sistema híbrido de fermentación y electrólisis microbiana. El  $H_2$  se genera comúnmente a partir de fermentaciones de compuestos orgánicos o de manera química por electrólisis de agua. En la fermentación oscura, los microorganismos acidogénicos producen  $H_2$  y AGV durante la fermentación, mientras que las bacterias electroactivas pueden utilizar esos AGV para mejorar los rendimientos (Nikhil et al., 2015). Otros estudios informaron que la producción de  $H_2$  estaba influenciada por el potencial anódico mientras que una disminución en la caída del pH causada por la acumulación de AGV condujo a una disminución en el rendimiento (Chandrasekhar et al., 2015). Por otro lado, el hidrógeno puede ser consumido por bacterias electroactivas como la *G. sulfurreducens* o metanogénicas, y se han hecho esfuerzos para minimizar dicha pérdida mediante el uso de inhibidores químicos o controles operativos. La modificación genética de las bacterias electroactivas también se ha investigado para prevenir el consumo de  $H_2$  y mejorar la oxidación de VFA (Awate et al., 2017)



La EF podría considerarse como una herramienta de control del proceso de fermentación oscura para la producción de H<sub>2</sub>. En un estudio realizado por Toledo-Alarcón et al., (2019) se utilizaron electrodos polarizados en la fermentación de glucosa para evaluar su influencia en la producción de H<sub>2</sub>, con un enfoque especial en cómo se ven afectadas las poblaciones bacterianas. Los resultados indicaron una mayor producción de H<sub>2</sub> en comparación con la fermentación convencional con una fuerte selección de *Clostridium* sp. demostrando el potencial de la EF como un nuevo tipo de control para los bioprocesos en cultivos mixtos con efectos significativos de los electrodos polarizados en la fermentación de glucosa. El mayor rendimiento de H<sub>2</sub> fue  $1,81 \pm 0,32 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosa}}$  y se alcanzó a los potenciales aplicados de -0,4 V y +0,9 V. El rendimiento máximo de H<sub>2</sub> obtenido en este estudio es comparable al reportado para la fermentación oscura de glucosa en la operación en batch usando cultivos mixtos como inóculos ( $2,5 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosa}}$ ). Sin embargo, dependiendo de la fuente del inóculo y el pretratamiento empleado, los rendimientos de H<sub>2</sub> podrían estar entre 0,1 y 3,0  $\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosa}}$ . En los ensayos realizados se observó la selección de bacterias productoras de H<sub>2</sub> con un aumento de sus abundancias relativas, y más especialmente miembros de las familias Enterobacteriaceae y Clostridiaceae. Ese artículo evidencia el claro efecto que tienen los electrodos polarizados tanto en las rutas metabólicas como en la estructura de la comunidad microbiana en la fermentación oscura (Toledo-Alarcón et al., 2019).

### 1.7 Desarrollo de inóculos electroactivos

Para que se produzca la EF es necesario una comunidad que sea enriquecida en microorganismos fermentadores y en microorganismos capaces de transferir electrones (electroactivos) (Figura 3). Por lo tanto, un punto clave en el proceso es el inóculo utilizado. Los microorganismos electroactivos se encuentran en diversos ecosistemas y muchos de ellos son capaces de reducir hierro. Por lo tanto, una manera de obtener enriquecimientos de estos microorganismos es a partir de fuentes ambientales como sedimentos marinos, lodo anaeróbico, lodo aerobio de plantas de tratamiento de aguas, entre otros (Miceli et al., 2012). En estos ambientes, estos microorganismos usan una variedad de aceptores de electrones extracelulares como el hierro y el manganeso.

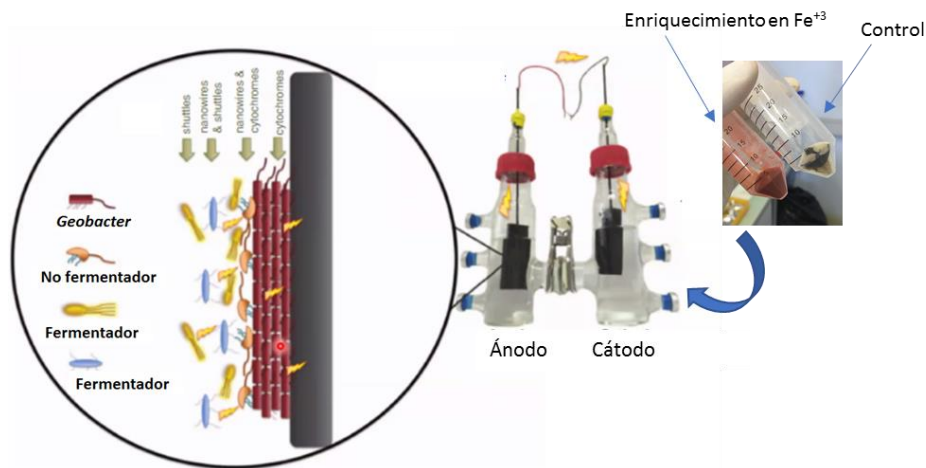


Figura 3. Microorganismos claves en la EF. Adaptado de Toledo-Alarcón, 2020.

Una de las estrategias para obtener un inóculo enriquecido con estos microorganismos es mediante el enriquecimiento en un medio de cultivo anaerobio con Fe (III) como aceptor de electrones. Zhang et al., (2014) obtuvieron enriquecimientos de estos microorganismos al agregar Fe (III) en la solución electrolítica de los experimentos en sistemas bioelectroquímicos. Esta estrategia ha permitido seleccionar bacterias reductoras de Fe (III) de sistemas de tratamiento de aguas residuales mientras se oxida anaeróbicamente materia orgánica.

Posteriormente, Pierra et al., (2015) evaluaron si el procedimiento de enriquecimiento de estos microorganismos con hierro estaba necesariamente relacionado con la presencia de bacterias respiradoras de ánodos (ARB, en inglés anode-respiring bacteria). Ellos desarrollaron un método de enriquecimiento con hierro para seleccionar específicamente estos microorganismos y posteriormente lo utilizaron para colonizar el electrodo de un sistema de EF. El método consiste en realizar sucesivas etapas de cultivo en presencia de Fe (III). Se realizaron tres cultivos sucesivos de enriquecimiento. Asimismo, cada enriquecimiento se utilizó como inóculo para la EF. Los resultados revelaron que ya con el primer enriquecimiento se obtuvieron bacterias electroactivas que, junto a las fermentadoras permitió obtener buenos rendimientos en la EF. El primer paso de enriquecimiento reveló una selección exitosa de ARB, *Geoalkalibacter subterraneus* reportado como electroactivo. Los siguientes enriquecimientos (enriquecimiento secundario y terciario) mostraron una divergencia significativa con un impacto en la electroactividad del biofilm (Pierra et al., 2015).

En este trabajo de Tesis, se estudió la EF como mecanismo para la mejora de la producción de hidrógeno, para ello se llevó a cabo una pasantía en Francia donde se realizaron

enriquecimientos de bacterias electroactivas para la producción de hidrógeno mediante EF en un medio sintético con glucosa como sustrato.

## 2. *Objetivo*

Estudiar el efecto del agregado de microorganismos electroactivos en la producción de hidrógeno por fermentación oscura y por EF.

Este trabajo se realizó en el marco de una pasantía en el LBE del INRA, localizado en Narbona, Francia bajo la dirección del Dr. Eric Trably y de la Dra. Javiera Toledo-Alarcón. El objetivo fue formarse en el tema de EF. Durante el trabajo de pasantía se realizaron ensayos de enriquecimientos de bacterias electroactivas, a partir de varios inóculos, utilizando medio mineral con óxido de Fe (III). Se realizaron luego ensayos de fermentación y de EF utilizando los enriquecimientos como inóculo y mezclas de los inóculos enriquecidos con inóculos sin enriquecer. Parte de los resultados se publicaron recientemente en el trabajo de Toledo-Alarcón et al., (2020).

## 3. *Materiales y métodos*

### 3.1 *Desarrollo de inóculos enriquecidos en bacterias electroactivas*

Los enriquecimientos se realizaron en medio mineral con acetato y Fe (III) a pH 7 para favorecer el crecimiento de bacterias electroactivas. Se realizaron tres enriquecimientos utilizando el medio de cultivo reportado por Pierra et al., 2015 con modificaciones. Los ensayos se realizaron en botellas de 500 mL con 250 mL de medio de cultivo y una concentración de inóculo de 20% v/v. La solución contenía tampón MES (100 mM) y medio mineral Starkey modificado: 5 g/L  $K_2HPO_4$ , 2 g/L  $NH_4Cl$ , 0,2 g/L extracto de levadura, 55 mg/L  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 7 mg/L  $FeSO_4(NH_4)2SO_4 \cdot 6H_2O$ , 1 mg/L  $ZnCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1,2 mg/L  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 0,4 mg/L  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 1,3 mg/L  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,1 mg/L  $BO_3H_3$ , 1 mg/L  $Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \cdot 4H_2O$ , 0,05 mg/L  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,01 mg/L  $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ , 60 mg/L  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . Se añadió óxido de Fe (III) (100 mM) como aceptor de electrones y acetato (10 mM) como donador de electrones. El pH inicial se ajustó a 7 usando NaOH (1 M). Para garantizar condiciones anaeróbicas, cada botella se gaseó con  $N_2$  de alta pureza durante 30 minutos después de la inoculación.

Se utilizaron tres inóculos: lodo anaerobio (obtenido de un reactor de residuos sólidos), lodo aerobio (obtenido de una planta de tratamiento aerobia de aguas residuales domésticas), lodo acidogénico (obtenido de un reactor de laboratorio de producción de  $H_2$  alimentado con glucosa

Toledo-Alarcón, 2019) (Tabla 1). Los enriquecimientos se realizaron por cuadruplicado a 37°C (Figura 4).



Figura 4. Ensayos de enriquecimiento en medio con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  con los distintos inóculos.

En los enriquecimientos se determinó el consumo del acetato mediante cromatografía gaseosa (GC-FID). Una vez consumido el acetato se realizó un segundo y tercer enriquecimiento en serie (Figura 6). Para ello se tomó un 20% v/v de biomasa del enriquecimiento inicial y se cultivó en el mismo medio de cultivo. Una vez finalizado cada enriquecimiento se tomaron muestras para medir la biomasa (sólidos suspendidos volátiles, SSV). También se tomaron muestras iniciales y a lo largo del tiempo y se determinó la concentración de acetato. Se tomaron 2 mL de muestra, se centrifugaron (10 min, 13.000 rpm) y los sobrenadantes se utilizaron para medir el consumo de acetato. El pellet se conservó a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para extracción de ADN que fue posteriormente utilizado para realizar los análisis de comunidades microbianas.

Tabla 1. Esquema de los ensayos de enriquecimiento.

Enriquecimiento	Inóculo	Medio de cultivo	Enriquecimiento sucesivos
<b>Ae</b>	Lodo aerobio	Acetato + Fe (III)	E Ae1, E Ae2, E Ae3
<b>An</b>	Lodo anaerobio	Acetato + Fe (III)	No se realizaron enriquecimientos sucesivos
<b>Aci</b>	Lodo acidogénico	Acetato + Fe (III)	No se realizaron enriquecimientos sucesivos

### 3.2 Ensayos de fermentación

De cada enriquecimiento se realizaron ensayos de fermentación en medio mineral adaptado de Rafrafi et al., (2013) compuesto por 5 g/L de glucosa y otros compuestos (2 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,0086 g/L  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 19,5 g/L buffer MES (100 mM) y 1 mL/L de solución de oligoelementos. La solución de oligoelementos tenía la siguiente composición: 60 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 55 g/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 7 g/L  $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,3 g/L  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,2 g/L  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L  $\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 g/L  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/L  $\text{BO}_3\text{H}_3$ , 0,05 g/L  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 46 mL/L HCl 37%.

Se midió la composición del gas generado mediante GC cromatografía gaseosa (GC-TCD) en muestras tomadas del espacio de cabeza de los frascos a las 24 y 48 hs. Se tomaron muestras para determinar los ácidos orgánicos y alcoholes mediante GC y HPLC en el sobrenadante. El pellet se conservó a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  para realizar los análisis de comunidades microbianas. Asimismo, se tomaron muestras para determinar la concentración de biomasa mediante la medida de SSV. Los ensayos fueron realizados por triplicado a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

Los ensayos de fermentación se realizaron utilizando los inóculos y sustratos según se indica en la Tabla 2. Debido a que en los enriquecimientos realizados con el lodo anaerobio y acidogénico no se observó el consumo de acetato, no se realizaron ensayos de fermentación ni de EF para estos enriquecimientos. En los ensayos 1 a 5 se utilizó una concentración de biomasa del inóculo de 0,5 gSSV/L. Posteriormente con los enriquecimientos secundarios y terciarios (EAe2 y EAe3) (ensayos 6 a 9) se utilizó una concentración menor de inóculo (0,25 gSSV/L) debido a que no se generó suficiente biomasa. En la tabla 2 se indica el esquema con los ensayos de fermentación realizados. El agregado de acetato se debe a la hipótesis de que el acetato podría impulsar el crecimiento de bacterias como *Geobacter*, que junto con *Clostridium* favorecerían la producción de  $\text{H}_2$  por las interacciones sintróficas.

Tabla 2-Esquema de los ensayos de fermentación realizados con los diferentes inóculos y mezclas de inóculos.

Ensayo	Inóculo	Sustrato
1 (AeG)	Lodo aerobio (0,5 gSSV/L)	Glucosa (5g/L)
2 (Ae1G)	Inóculo enriquecido EAe1 (0,5 gSSV/L)	Glucosa (5g/L)

<b>3</b> <b>(Ae:Ae1G)</b>	Mezcla lodo aerobio + EAe1 (1:1) (0,25 gSSV/L: 0,25 gSSV/L)	Glucosa (5g/L)
<b>4</b> <b>(AeGA)</b>	Lodo aerobio (0,5 gSSV/L)	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)
<b>5</b> <b>(Ae1GA)</b>	Inóculo enriquecido EAe1 (0,5 gSSV/L)	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)
<b>6</b> <b>(Ae:Ae1GA)</b>	Mezcla lodo aerobio + EAe1 (1:1) (0,25 gSSV/L: 0,25 gSSV/L)	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)
<b>7</b> <b>(Ae2GA)</b>	Inóculo enriquecido EAe2 (0,25 gSSV/L)	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)
<b>8</b> <b>(Ae:Ae2GA)</b>	Mezcla lodo aerobio + EAe2 (1:1) (0,125 gSSV/L: 0,125 gSSV/L)	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)
<b>9</b> <b>(Ae3GA)</b>	Inóculo enriquecido EAe3 (0,25 gSSV/L)	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)
<b>10</b> <b>(Ae:Ae3GA)</b>	Mezcla lodo aerobio + EAe3 (1:1) (0,125 gSSV/L: 0,125 gSSV/L)	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)

### 3.3. Ensayos de EF

Los ensayos de EF se realizaron en reactores de dos cámaras separados con una membrana de intercambio iónico (Fig. 2). En la cámara anódica se colocó el inóculo (0,5 g SSV/L) con el medio utilizado en la fermentación, se colocó el electrodo de trabajo de platino (ánodo) y un electrodo de referencia de Calomel. En la otra cámara se colocó el medio de cultivo sin fuente carbonada con un contraelectrodo de platino (cátodo). Se aplicó un potencial de +0,4 V respecto al electrodo de referencia (Calomel). El potencial se controló con un potenciostato (VSP Bio-Logic SA). Se extrajo muestra del líquido para la medición de ácidos orgánicos, del gas para la concentración de hidrógeno y metano y de la biomasa para extracción de ADN. Los ensayos se realizaron por duplicado. Los electrodos de trabajo y contraelectrodo consistieron en una rejilla de platino eridio (90% / 10%) (Heraeus) que se limpió con etanol calentando con una llama azul previo a su uso. Los experimentos en batch se llevaron a cabo a 37 ° C usando un baño de agua y una agitación de 250 rpm, durante un máximo de 24 hs. El pH inicial se ajustó a 6,0 con NaOH 2 M. En la cámara de electrodo de trabajo, se añadió el medio de fermentación e inóculo, mientras que en la cámara de contraelectrodo solo se añadió medio de fermentación libre de glucosa (Figura 5). Se realizaron controles en batch de fermentación convencionales utilizando un reactor de cámara única y en ausencia de electrodos polarizados. En la figura 6 se resumen los ensayos realizados.

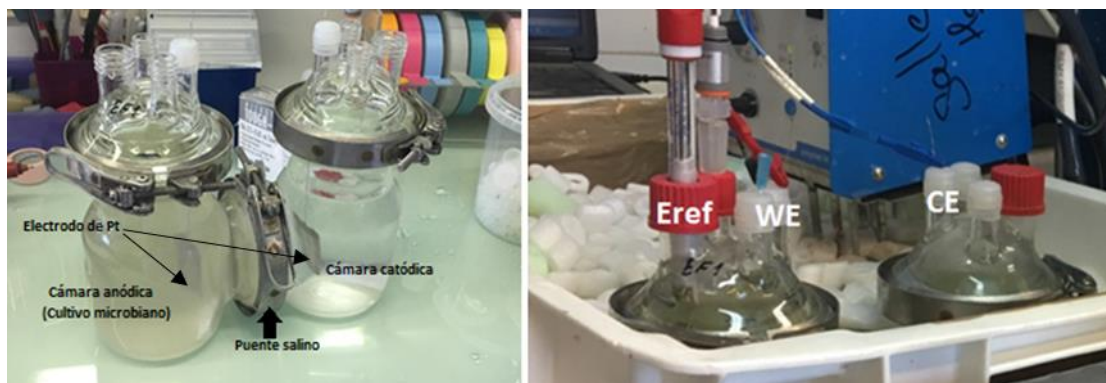


Figura 5. Celda de EF utilizada, doble cámara. CE: contraelectrodo, Eref: electrodo de referencia, WE: electrodo de trabajo.

Tabla 3- Ensayos de EF

Ensayo	Inóculo	Fermentación/ Electrofermentación	Sustrato
<b>11</b> <b>F(Ae)</b>	Lodo aerobio	Fermentación	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)
<b>12</b> <b>F(Ae:Ae1)</b>	Mezcla lodo aerobio + EAe1 (1:1)	Fermentación	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)
<b>13</b> <b>EF(Ae)</b>	Lodo aerobio	Electrofermentación	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)
<b>14</b> <b>EF(Ae:Ae1)</b>	Mezcla lodo aerobio + EAe1 (1:1)	Electrofermentación	Glucosa (5g/L) + acetato (0.82g/L)

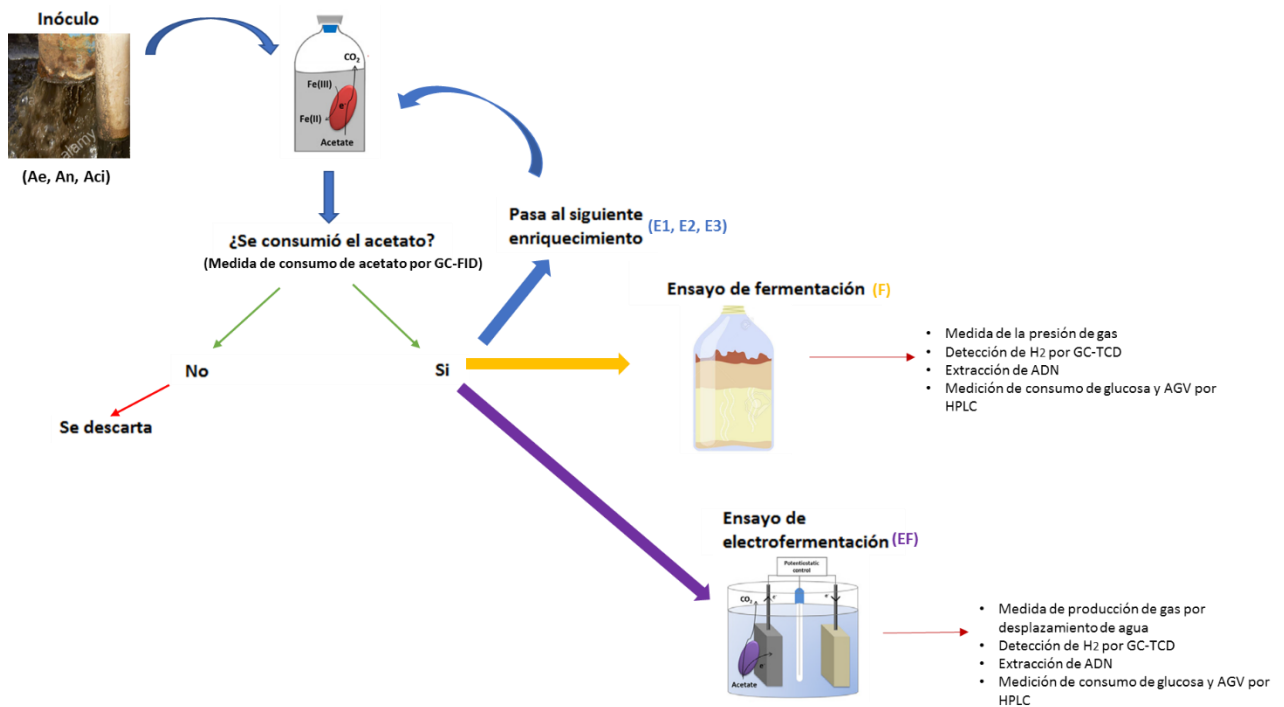


Figura 6. Esquema de los ensayos realizados.

### 3.4 Análisis de las comunidades microbianas

El ADN se extrajo a partir de 150 mg de biomasa utilizando el kit Fast DNA™ SPIN Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (MP Biomedical; Santa Ana, California - EE. UU.). Se midió la concentración de ADN usando Infinite 200 PRO NanoQuant (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza). Se amplificó la región V3 - V4 del gen ARNr de 16S por PCR de acuerdo con Carmona-Martínez et al., (2015). Se realizó la secuenciación de los amplicones utilizando MiSeq v3 (Illumina) con lecturas de 2x300 pb en pares en la plataforma GenoToul (<http://www.genotoul.fr>). Se recuperaron las secuencias después de la demultiplexación, limpieza y afiliación de las secuencias en bruto utilizando Mothur v1.39.5. Para la clasificación se utilizó la base de datos de SILVA 132. Para la construcción de heatmap se incluyeron aquellos microorganismos con abundancias relativas mayores al 1 % en al menos una muestra.

### 3.5 Análisis químicos

El consumo de acetato en los enriquecimientos se midió por cromatografía gaseosa equipada con un detector de ionización en flama (GC FID-3900 Varian). Para las fermentaciones y EF se utilizó HPLC acoplado a un detector de índice de refracción (Waters R410) para determinar las concentraciones de glucosa, alcoholes y ácidos orgánicos. Los análisis de HPLC se realizaron en



una columna Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad) a una temperatura de 35 °C, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 mM) como fase móvil a una velocidad de flujo de 0.3 mL.min<sup>-1</sup>. Las muestras se prepararon por centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos y luego el sobrenadante se filtró con filtros de jeringa de 0,2 µm. La producción de biogás se monitoreó continuamente durante la operación utilizando un sistema de desplazamiento de líquido. Los porcentajes de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> en el biogás se cuantificaron por cromatografía de gases (Clarus 580 GC, Perkin Elmer) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) fueron determinados por el método estándar APHA/ AWWA/ WEF.

### *3.6 Análisis estadísticos*

Para determinar las diferencias significativas entre los valores de los rendimientos de H<sub>2</sub> se aplicó One way-ANOVA y el análisis de Tukey's pairwise utilizando el software PAST (Hammer et al. 2001). Para los estudios de diversidad microbiana se calcularon los índices de Shannon y Chao1 utilizando el mismo paquete de programas.

## *4. Resultados y discusión*

### *4.1 Enriquecimientos de microorganismos electroactivos*

De los enriquecimientos se observó el consumo de acetato en todas las muestras del ensayo inoculado con lodo aerobio (EAe1, EAe2, EAe3) y en una de las réplicas del ensayo inoculado con el lodo acidogénico. En el enriquecimiento inoculado con lodo anaerobio no se observó consumo de acetato. En algunos casos los valores de concentración de biomasa (medida en SSV) fueron muy bajos por lo cual se decidió realizar un segundo enriquecimiento como fue el en caso del enriquecimiento secundario del ensayo inoculado con muestra del lodo acidogénico que consumió el acetato. Sin embargo, los resultados siguientes de consumo de acetato no fueron reproducibles. Los enriquecimientos realizados con el lodo aerobio fueron los únicos que mostraron consumo total de acetato en todos los enriquecimientos. Debido a esto se decidió estudiar la composición de las comunidades microbianas de las muestras extraídas de los enriquecimientos realizados con el lodo aerobio. Se analizaron las muestras de los cuadruplicados de los enriquecimientos sucesivos EAe1, EAe2 y EAe3 (tomadas a los 10 días) y de la muestra del lodo aerobio inicial (Ae tiempo 0).

Los resultados de las comunidades microbianas indicaron un aumento de las abundancias relativas de los géneros *Paraclostridium*, *Proteiniclasticum*, *Acetoanaerobium*, *Clostridium*,

*Macellibacteroides*, *Gottschalkia*, *Dechloromonas*, *Proteocatella*, *Syntrophomonas*, *Sedimentibacter*, *Petrimonas*. Además, se observó un aumento *Defluviicoccus* en el primer enriquecimiento. Se detectó un aumento de microorganismos de los géneros *Desulfovibrio* y *Geobacter* llegando al 6 % y 3 % en el tercer enriquecimiento. Se pudo detectar también una disminución de la diversidad de las comunidades microbianas en los sucesivos enriquecimientos. Esto se puede observar en la tabla 4 donde se indican los índices de Shannon y Chao1 donde se observa una disminución de estos índices a medida en los sucesivos enriquecimientos. Este resultado indica una especialización de la comunidad microbiana durante los enriquecimientos.

De los géneros detectados en las comunidades microbianas de los enriquecimientos se pudo observar tanto microorganismos electroactivos (o reportados en sistemas bioelectroquímicos) como fermentadores (Tabla 5 y 6).

Tabla 4. Índices de diversidad de los diferentes enriquecimientos

	Shannon_H	Chao-1
E Ae1 (1) t0	5,608	583
E Ae1 (2) t0	5,567	573
E Ae1 (3) t0	5,473	535
E Ae1 (4) t0	5,49	525
E Ae1 (1) t10	5,009	428
E Ae1 (2) t10	4,985	364
E Ae1 (3) t10	5,055	440
E Ae1 (4) t10	5,156	442
E Ae2 (1) t10	3,585	209
E Ae2 (2) t10	4,008	259
E Ae2 (3) t10	4,033	274
E Ae2 (4) t10	3,898	255
E Ae3 (1) t10	2,962	162
E Ae3 (2) t10	3,051	169
E Ae3 (3) t10	3,045	128
E Ae3 (4) t10	3,081	157

Dentro de los microorganismos electroactivos reportados en sistemas bioelectroquímicos, además de detectarse un aumento de la abundancia relativa de *Geobacter*, se detectó un marcado aumento de los géneros *Desulfovibrio* y *Proteiniclasticum*. *Desulfovibrio* es descrito como un género de bacterias reductoras de sulfato (SRB), anaerobias y reductoras de metales pesados. Se pueden encontrar en entornos anaerobios diversos en la naturaleza, como suelos, sedimentos marinos o incluso intestinos de animales (Matias et al., 2005). En el metabolismo

del género *Desulfovibrio*, el hidrógeno puede usarse como poder reductor complementando la respiración de sulfato o puede producirse en ausencia de sulfato. En un trabajo de Cordas et al., se evidencia que los biofilms de *D. desulfuricans* tienen la capacidad de intercambiar electrones directamente con diferentes materiales de electrodos como acero inoxidable y grafito (Cordas et al., 2008). Además, *D. desulfuricans* es capaz de producir filamentos o nano-pili permitiendo la unión de ésta a los electrodos en MFC formado biofilms capaces de mejorar la producción de corriente en el MFC. Estos nano-pilis facilitan la transferencia de electrones al ánodo (Eaktasang et al., 2013).

Por otro lado, el género *Proteinclasticum* se caracteriza por ser proteolítico y no utilizar carbohidratos. Utilizan peptona de soja, triptona y aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno. Los principales productos de fermentación en medio PY son acetato, propionato e isobutirato. La especie tipo es *Proteinclasticum ruminis* (Zhang et al., 2010). Su presencia fue reportada en celdas de electrosíntesis microbiana para la producción de hidrógeno en condiciones alcalinas (Rago et al., 2016). En un trabajo de Yin et al., sugieren que este microorganismo puede estar involucrado en la transferencia directa de electrones interespecies (Yin et al., 2016). En ese estudio, se eligió  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  como material conductor en un reactor anaeróbico de tratamiento de aguas residuales alimentado con carbono orgánico mixto para ver sus efectos sobre el rendimiento del sistema y la comunidad microbiana. *Proteinclasticum* y *Kosmotoga* fueron dominantes tras la adición de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y fueron responsables de la degradación de las proteínas (Yin et al., 2016). Este microorganismo podría cumplir un rol como electroactivo.

También se detectó un aumento de microorganismos no fermentadores del género *Dechloromonas* que puede consumir propionato, así como también succinato en presencia de un aceptor de electrones como nitrato (Horn et al., 2005). Este microorganismo ha sido estudiado por su capacidad de reducción de clorato, es un microorganismo estrictamente respiratorio que oxida el acetato con  $\text{O}_2$ ,  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  o  $\text{NO}_3^-$  como aceptores de electrones alternativos. No reduce Fe (III). El  $\text{ClO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  se reducen completamente a  $\text{Cl}^-$ . Las células contienen citocromo de tipo c (Achenbach et al., 2001). Recientemente se reportó experimentalmente su capacidad de reducción bioelectroquímica del clorato con el desarrollo de biofilms sobre los electrodos, la producción de corriente catódica y la eliminación de clorato a lo largo del tiempo (Torres-Rojas et al., 2020). Así que también podría tener un rol como microorganismo electroactivo.

Dentro de los microorganismos fermentadores, se detectó un aumento progresivo de la abundancia relativa del género *Paraclostridium* entre los enriquecimientos EAe 1, 2 y 3. Este

género pertenece a la familia Clostridiaceae. Tiene la capacidad de producir H<sub>2</sub> a partir de sustratos orgánicos. Sus principales productos de fermentación son acético y butírico. Se ha reportado que cepas de este género son celulolíticas y fermentativas (Rabelo et al., 2020). Por lo tanto, este microorganismo podría tener un rol en la fermentación de carbohidratos.

*Macellibacteroides* y *Gottschalkia* están reportados como microorganismos fermentadores (Jabari et al., 2012; Poehlein et al., 2017). En particular *Gottschalkia* es un fermentador que requiere purinas para su crecimiento, pero no utiliza carbohidratos ni la mayoría de los aminoácidos. También puede utilizar ácido úrico como fuente de carbono y energía. Los principales productos del metabolismo son acetato, formiato, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> (Poehlein et al., 2017). Dado que no consume acetato ni glucosa, este microorganismo podría alimentarse de los restos celulares.

En cuanto al rol de los microorganismos del género *Acetoanaerobium* cuya abundancia relativa aumentó en cada enriquecimiento, se ha reportado que microorganismos de este género mostraron una notable capacidad para consumir un alto flujo de H<sub>2</sub> en celdas de electrosíntesis microbianas (Jourdin et al., 2016). Por lo cual este microorganismo puede no ser beneficioso para el proceso de producción de H<sub>2</sub>.

Por lo tanto, de acuerdo con la bibliografía consultada, la composición taxonómica de las comunidades microbianas de los enriquecimientos muestra que se aumentó la abundancia de microorganismos con la capacidad de fermentar y producir hidrógeno y con potencial capacidad electrogénica. De esto se podría concluir que el medio de enriquecimiento utilizado fue útil para la selección de microorganismos de interés ya que encontramos microorganismos fermentadores productores de hidrógeno (principalmente *Proteinclasticum*, *Clostridium*) y reductores de metales (potenciales electrogénicos) del género *Desulfovibrio* y *Geobacter*. Por otro lado también se enriquecieron microorganismos consumidores de H<sub>2</sub> como en el caso de *Acetoanaerobium*. En la tabla 6 se resumen los posibles roles de los microorganismos encontrados en los enriquecidos.

Tabla 5. Heatmap mostrando las abundancias relativas de los diferentes organismos presentes en los enriquecimientos primarios (Ae1) realizados en cuadruplicado (1-4) en tiempo 0 (Ae1 t0) y a los 10 días (E1 t10), enriquecimientos secundarios realizado a los 10 días (Ae2 t10), enriquecimientos terciarios a los 10 días (Ae3 t10). Las abundancias relativas se determinaron de acuerdo al análisis del gen del ARNr de 16S mediante secuenciación masiva. Se muestra la afiliación a nivel de género de aquellos microorganismos con una abundancia relativa mayor a 1 % en al menos una de las muestras.

Género	E Ae1 (1) t0	E Ae1 (2) t0	E Ae1 (3) t0	E Ae1 (4) t0	E Ae1 (1) t10	E Ae1 (2) t10	E Ae1 (3) t10	E Ae1 (4) t10	E Ae2 (1) t10	E Ae2 (2) t10	E Ae2 (3) t10	E Ae2 (4) t10	E Ae3 (1) t10	E Ae3 (2) t10	E Ae3 (3) t10	E Ae3 (4) t10
Paraclostridium	1%	1%	1%	0%	1%	2%	2%	2%	12%	10%	11%	11%	26%	26%	24%	24%
Proteiniaciastum	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	8%	8%	6%	8%	16%	13%	16%	15%
Acetoanaerobium	0%	0%	0%	0%	2%	2%	3%	3%	10%	9%	11%	8%	9%	10%	8%	10%
Defluvicoccus	3%	6%	7%	6%	10%	8%	10%	7%	1%	5%	3%	3%	0%	0%	0%	0%
Clostridium_sensu_stricto_13	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	8%	7%	9%	8%	2%	3%	2%	2%
Macellibacteroides	0%	0%	0%	0%	3%	4%	3%	4%	9%	7%	4%	7%	3%	2%	3%	2%
Gottschalkia	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	2%	4%	5%	5%	5%	5%	7%	5%
Desulfovibrio	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	4%	1%	1%	1%	6%	5%	5%	5%
ST-12K33_ge	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	2%	5%	2%
Porphyromonadaceae_unclassified	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	4%	3%	2%	3%	1%	1%	1%	1%
Clostridium_sensu_stricto_13	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	0%	2%	2%	2%	3%	2%	3%	2%	4%
Dechloromonas	1%	1%	2%	1%	3%	3%	3%	3%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
Proteocatella	0%	0%	0%	0%	3%	2%	2%	1%	1%	2%	2%	2%	0%	0%	0%	0%
Geobacter	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	0%	1%	2%	2%	1%	3%
Clostridium_sensu_stricto_1	1%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	1%	1%	2%	1%	3%
Family_XIII_unclassified	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	1%	3%	1%	1%	1%	2%	2%	2%	1%
Denitratisoma	2%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
uncultured	2%	2%	2%	2%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Syntrophomonas	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	2%	1%	2%	2%	2%	2%	2%
Sedimentibacter	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	1%	2%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%
vadinBC27_wastewater-sludge_group	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	2%	1%
Rhodocyclaceae_unclassified	1%	2%	2%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Gracilibacter	0%	0%	0%	0%	2%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Petrimonas	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	1%	1%	1%	2%	1%
Escherichia-Shigella	0%	0%	0%	0%	1%	2%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Syntrophomonas	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	1%	2%	2%
Bacteria_unclassified	2%	2%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Terrimonas	2%	2%	2%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
B1-7B5_ge	1%	1%	1%	1%	2%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Syntrophomonas	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Actinobacteria_unclassified	0%	1%	1%	2%	2%	1%	1%	1%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
PeM15_ge	0%	1%	1%	1%	2%	0%	1%	1%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Defluvicoccus	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%
uncultured	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	0%
Aeromonas	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
SRB2_ge	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%
Novosphingobium	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Bacteroides_vadinHA17_ge	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	0%	1%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
Chitinivorax	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
uncultured	0%	0%	0%	0%	1%	0%	1%	1%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
Desulfomicrobium	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%
Chromatiaceae_unclassified	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Gracilibacter	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	1%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
uncultured	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Ruminococcus_1	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Methylococcaceae_unclassified	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
uncultured_ge	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Candidatus_Microthrix	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Rhizobiales_unclassified	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Arcobacter	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Run-SP154_ge	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Blni28_wastewater-sludge_group	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
uncultured	1%	1%	1%	1%	0%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Peptostreptococcaceae_unclassified	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Halicomonabacter	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
uncultured_ge	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Dechlorobacter	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%
Nitrospira	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
uncultured	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Lutispora	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%
Run-SP154_ge	1%	1%	1%	1%	0%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Morganelia	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Klebsiella	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%
Saccharibacteria_ge	1%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Proteiniaciastum	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Trichococcus	1%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Galicola	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabla 6. Principales grupos de microorganismos presentes en los enriquecimientos y su posible rol.

Género enriquecido	Posible rol	Referencia
Paraclostridium	fermentador, productor de H <sub>2</sub>	Rabelo et al., 2020
Proteiniclasticum	fermentador, productor de H <sub>2</sub> , electroactivo	Zhang et al., 2010, Yin et al., 2016
Acetoanaerobium	homoacetogénico	Jourdin et al., 2016
Defluviicoccus	fermentador	Nabu, 2013
Clostridium_sensu_stricto	fermentador, productor de H <sub>2</sub>	Yang et al., 2019
Macellibacteroides	fermentador	Jabari et al., 2012
Gottschalkia	fermenta purinas	Poehlein et al., 2017
Desulfovibrio	electroactivo	Eaktasang et al., 2013
Porphyromonadaceae	fermentador	Jabari et al., 2012
Dechloromonas	electroactiva	Torres-Rojas et al., 2020
Proteocatella	fermentador	Pikuta et al., 2009
Geobacter	electroactivo	Bond et al., 2003
Syntrophomonas	fermentador, productor de H <sub>2</sub>	Zhang et al., 2004
Sedimentibacter	fermentador	Breitenstein et al., 2002
Petrimonas	fermentador, productor de H <sub>2</sub>	Grabowski et al., 2005

## 4.2 Fermentaciones

### 4.2.1 Rendimientos de H<sub>2</sub>

Con el lodo aerobio enriquecido (EAe1, EAe2 y EAe3) se realizaron ensayos de fermentación para determinar el efecto del inóculo enriquecido en bacterias electrogénicas en la producción de hidrógeno.

Se observó que los mayores rendimientos de H<sub>2</sub> se obtuvieron a partir del primer enriquecimiento con glucosa y acetato (Figura 7). No hubo grandes variaciones en los enriquecimientos sucesivos en cuanto a la producción de H<sub>2</sub>. No se detectó metano en ninguno de los casos, y a glucosa se consumió a las 48 horas en todos los casos. De los análisis estadísticos se observó que hay una diferencia entre el enriquecimiento primario alimentado con glucosa y glucosa y acetato. Asimismo hay una diferencia significativa entre el enriquecimiento primario con los enriquecimientos secundarios y terciarios.

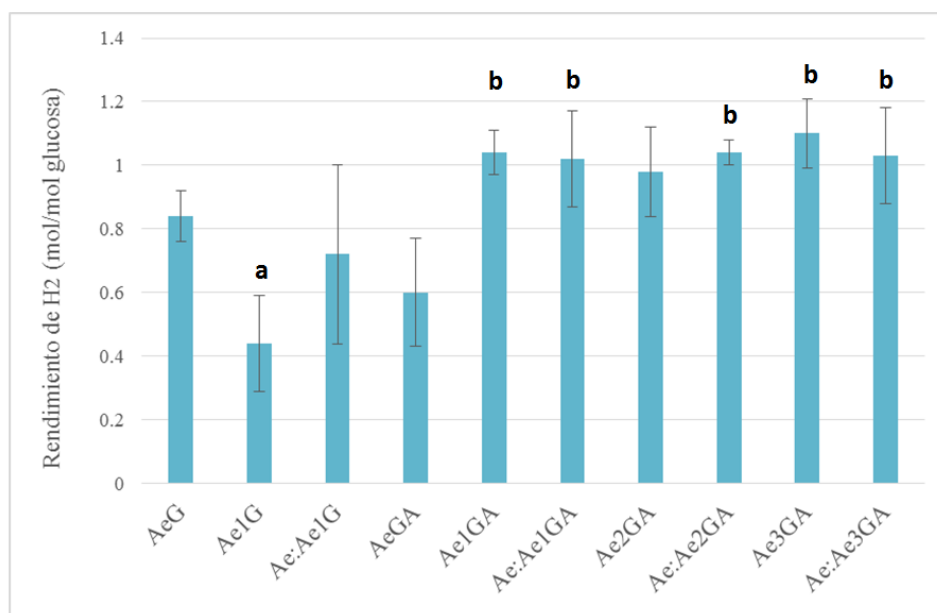


Figura 7. Rendimiento de producción de hidrógeno usando distintas variaciones de inóculo. La fermentación se realizó utilizando glucosa como fuente de carbono o con glucosa y acetato según se indica en la Tabla 2. Los valores marcados con una letra diferente difieren significativamente ( $P < 0.05$ ) según el análisis estadístico ANOVA.

Esto podría indicar que en la fermentación utilizando únicamente el enriquecimiento primario con glucosa no necesariamente favorecería la producción de H<sub>2</sub>. Sin embargo, si se observó una mejora en la producción de hidrógeno en la fermentación con los enriquecimientos adicionando acetato como sustrato. Además, se observó menor variación entre los valores obtenidos para las réplicas en estas condiciones. Este resultado sugiere que la adición de acetato podría impulsar en un inicio el crecimiento de microorganismos electrogénicos como *Geobacter* ya que estos utilizan acetato y no glucosa como fuente de carbono (Bond y Lovley, 2003).

#### 4.2.2 Estudio de los productos de fermentación en los diferentes ensayos

Se detectó presencia de acetato en todas las condiciones estudiadas. En la fermentación con glucosa (Ae1G) (Figura 8A) la presencia de acetato junto con la menor producción de H<sub>2</sub> podría indicar presencia de homoacetogénesis (Hugenholtz y Ljungdahl, 1990). En todas las muestras alimentadas con glucosa se detectaron altas concentraciones de propionato y etanol. Esto podría indicar producción de H<sub>2</sub> mediante la vía ácido mixta que es una característica de las enterobacterias. Aunque la producción de etanol podría estar vinculada a la fermentación solventogénica por algunas especies del género *Clostridium*, los resultados sugieren que algunas especies de la familia Enterobacteriaceae también producen H<sub>2</sub> con la coproducción de etanol (Nakashimada et al., 2002; Wietzke y Bahl, 2012; Palomo-Briones et al., 2017). Aunque el etanol

es una molécula más reducida que la glucosa y su producción permite liberar el exceso de electrones mediante la regeneración directa de NAD<sup>+</sup>, el etanol también está asociado con la producción de H<sub>2</sub> (Moscoviz et al., 2016). Por otro lado, algunas especies microbianas pueden consumir lactato y producir propionato como producto final, y eso podría explicar la variabilidad de estos dos metabolitos en los duplicados alimentados con glucosa debido a la aparición de consumidores de lactato en las comunidades microbianas (Hoelzle et al., 2014).

En las fermentaciones con glucosa y acetato se observó un patrón de productos de fermentación muy diferente, con una mayor producción de butirato (Figura 8B). Los controles (inóculo sin enriquecer, AeGA) presentaron más de un 50 % de producción de butirato. El acetato fue detectado a las 24 h y luego hubo una disminución a las 48 h. En los enriquecimientos (Ae1GA) el butirato producido fue mucho menor alcanzándose valores de acetato hasta el 94 % a las 24 h (Figura 8B). Posteriormente disminuyó, pero no tanto en comparación con el control. La producción de butirato puede indicar la producción de H<sub>2</sub> por *Clostridium* por esta vía. Esto es consistente con la literatura, ya que la producción de butirato es un producto metabólico típico de los miembros de la familia Clostridiaceae pero no para los organismos de la familia Enterobacteriaceae (Ghimire et al., 2015). Los altos rendimientos de H<sub>2</sub> se asocian comúnmente con miembros de la familia Clostridiaceae (Lee et al., 2008; Cabrol et al., 2017).

En todos los casos se detectó producción de lactato a las 24 h y en algunos casos se consumió totalmente a las 48 h (Figura 8A y B). La mayor concentración ocurrió en la fermentación utilizando el lodo aerobio como inóculo (AeG y AeGA). La producción de lactato se asocia comúnmente a menores rendimientos de H<sub>2</sub> porque la reoxidación de NADH en la vía del lactato conduce a una menor liberación de electrones en exceso en forma de H<sub>2</sub>, en particular por especies de *Clostridium* (Chatellard et al., 2016).

Los rendimientos máximos de H<sub>2</sub> se podrían asociar con un aumento de butirato y una disminución de lactato. Esto es consistente con los datos de la literatura que informaron mayores rendimientos de H<sub>2</sub> cuando el butirato y el acetato son los metabolitos más importantes (Lee et al., 2008; Palomo-Briones et al., 2018).



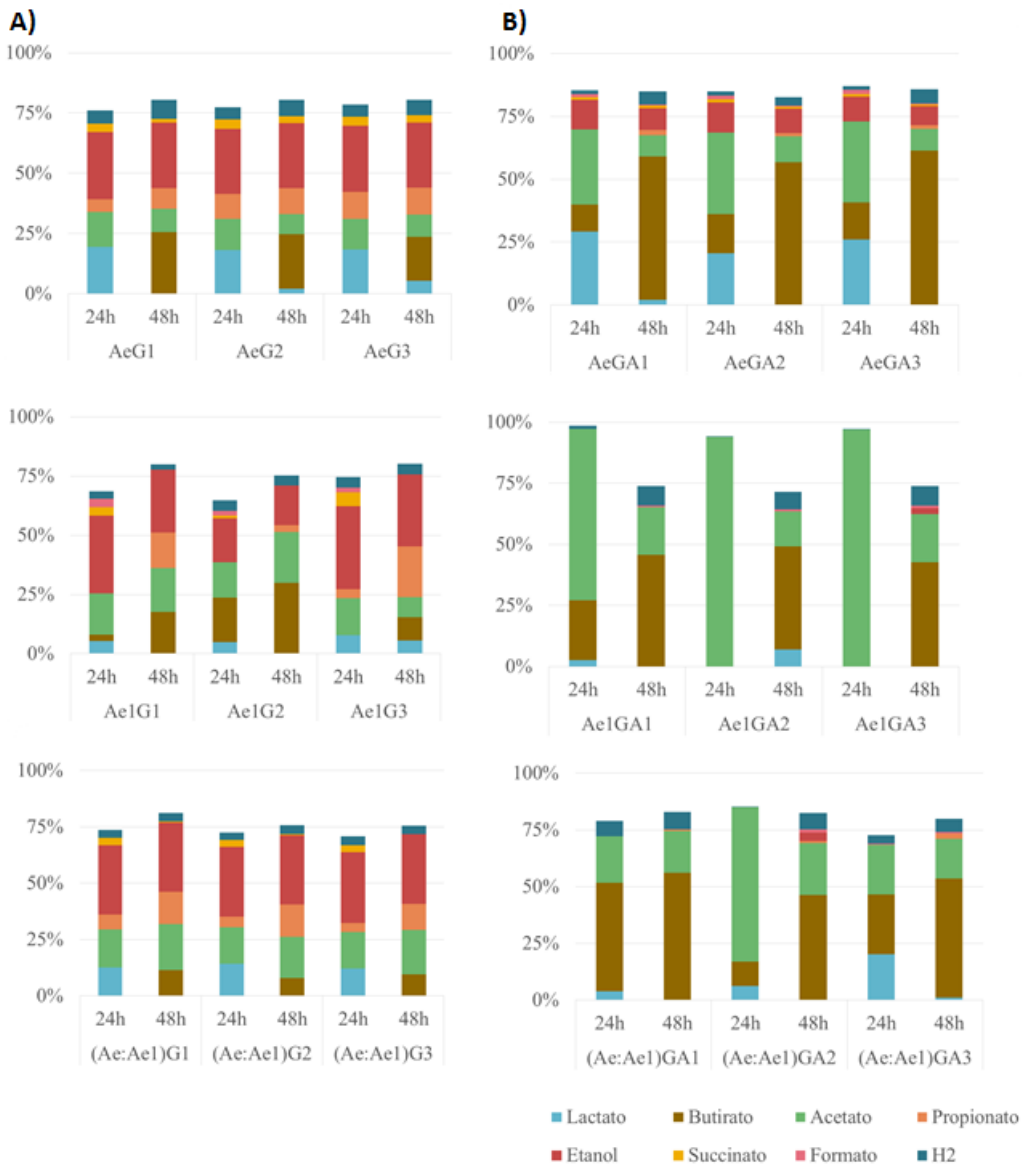


Figura 8. A) Perfil de productos de fermentación obtenidos en los ensayos de fermentación con glucosa utilizando el inóculo sin enriquecer (AeG), el inóculo enriquecido (Ae1G) y mezcla 1:1 del inóculo enriquecido y sin enriquecer (Ae:Ae1G). B) Análisis de los productos de fermentación en los ensayos de fermentación utilizando glucosa y acetato como sustratos y utilizando el inóculo sin enriquecer (AeGA), el inóculo enriquecido (Ae1GA) y mezcla 1:1 del inóculo enriquecido y sin enriquecer ((Ae:Ae1)GA). Los estudios se realizaron por triplicado y los productos de fermentación se determinaron a las 24 y 48 h.

En el segundo y tercer enriquecimiento (Figura 9), los resultados de la composición de los ácidos orgánicos producidos, mostraron que se produjo fundamentalmente acetato y butirato en ambos ensayos, pero en las muestras tomadas a las 24 hs del ensayo realizado con el enriquecimiento Ae2GA y Ae3GA se observó una predominancia de acetato que no se mantuvo

a lo largo del ensayo. La presencia de estos ácidos orgánicos podrían explicar los mejores rendimientos de H<sub>2</sub>. Se detectó presencia de láctico en todas las condiciones siendo mayor en Ae:Ae3. Este láctico parecería no tener un efecto en la producción de H<sub>2</sub>. Esto podría deberse a la presencia de microorganismos consumidores de lactato. Algunos microorganismos del género *Clostridium* son capaces de fermentar el lactato y producir acético mediante fermentación homoacética (Tang et al., 1989).

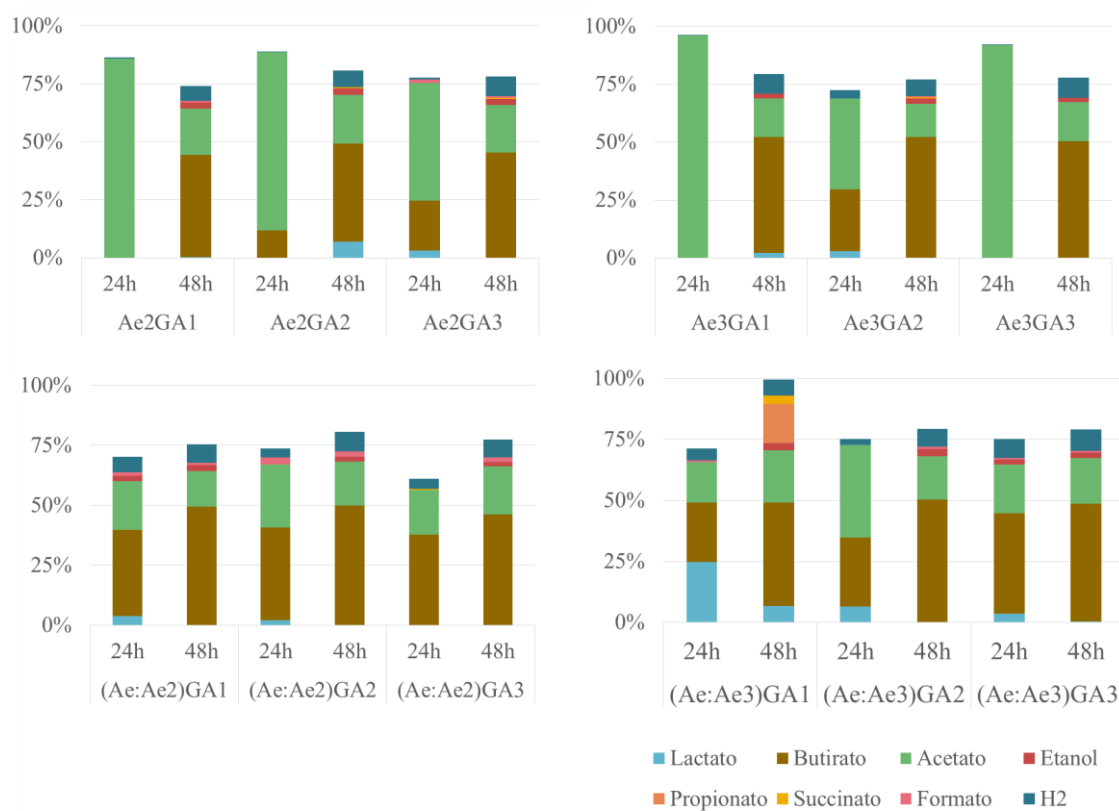


Figura 9. Análisis de ácidos orgánicos de la fermentación de glucosa y acetato utilizando el enriquecimiento secundario (Ae2GA) y mezcla 1:1 del inóculo enriquecido y sin enriquecer ((Ae:Ae2)GA), enriquecimiento terciario (Ae3.GA) y mezcla 1:1 del inóculo enriquecido y sin enriquecer ((Ae:Ae3)GA). Los estudios se realizaron por triplicado y se midió a las 24 y 48h.

#### 4.2.3 Composición de las comunidades microbianas en los ensayos de fermentación

Los resultados del análisis de las comunidades microbianas en las muestras tomadas al final de las fermentaciones muestran que, en todos los casos, se observó una disminución de la diversidad. En todas las muestras, las comunidades microbianas al final de la operación

estuvieron dominadas por organismos del género *Clostridium* (Tablas 7, 8, 9 y 10). En el caso de los ensayos realizados con glucosa únicamente se observó una alta abundancia relativa de microorganismos del género *Klebsiella*. Este género está reportado como microorganismo productor de H<sub>2</sub> (Minnan et al., 2005). La presencia de etanol en estas muestras podría indicar que la producción de H<sub>2</sub> se podría estar dando por la vía ácido-mixta. En estos casos también se observó la presencia de los géneros *Escherichia-Shigella*, *Tolomonas* y *Aeromonas* (Tabla 6). Los productos finales de fermentación de la glucosa por *Tolomonas* son acetato, etanol, formiato y/o lactato (Caldwell et al., 2011). Además, cepas de este género están reportados como electroactivos en MFC. En un trabajo de Luo et al., 2013 aislaron una cepa (designada como P2-A-1) identificada como *Tolomonas osonensis* que puede utilizar una amplia variedad de sustratos para la producción de energía, lo que la hace valiosa valioso para la aplicación en MFC (Fischer-Romero et al., 1996). La misma fue aislada de una MFC inoculada con lodo de una planta de tratamiento de aguas residuales (Luo et al., 2013).

Microorganismos del género *Aeromonas* también han sido reportados como electroactivos y aislados de MFC. También se reporta su presencia en reactores de producción de H<sub>2</sub>. Particularmente, en un trabajo de Pham et al., 2003 aislaron un microorganismo anaerobio facultativo designado como PA3 que se identificó como una cepa de *Aeromonas hydrophila*. Este microorganismo utiliza glucosa, glicerol, piruvato e hidrógeno para reducir Fe (III), nitrato y sulfato. La voltametría cíclica indicó que esta cepa era electroquímicamente activa (Pham et al., 2003). Microorganismos de este género también están reportados como productores de H<sub>2</sub>. Además produce etanol, acetato a partir de glucosa (Oh et al., 2003) lo que podría también explicar la presencia de estos productos de fermentación en las muestras.

Por otro lado en todos los ensayos de fermentación realizados con glucosa y acetato (Tabla 8, 9 y 10) se observó una predominancia de microorganismos del género *Clostridium*. La presencia de *Clostridium* podría explicar el aumento en la producción de H<sub>2</sub> y butirato. La detección de butirato podría indicar la producción de hidrógeno por esta vía.

La producción de lactato en estas muestras se puede correlacionar con la presencia de microorganismos del género *Streptococcus* ya que son bacterias ácido lácticas y se informan comúnmente en reactores de producción de H<sub>2</sub> (Cabrol et al., 2017; Castelló et al., 2018). En general se los asocia en reactores de baja producción de H<sub>2</sub> (Cabrol et al., 2017).

Tabla 7. Heatmap que muestra la abundancia relativa de los microorganismos presentes en los ensayos de: fermentación utilizando el inóculo sin enriquecer (Ae) realizados en triplicado (Ae (1)- Ae (3)) en muestras tomadas a tiempo 0 (t0) y 48 h (t48); fermentación utilizando el inóculo enriquecido (Ae1)

realizados en triplicado (Ae1 (1)- Ae1 (3)) en muestras tomadas a tiempo 0 (t0) y 48 hs (t48). Las abundancias relativas se determinaron de acuerdo al análisis del gen del ARNr de 16S mediante secuenciación masiva. Se muestra la afiliación a nivel de género de aquellos microorganismos con una abundancia relativa mayor al 1 % en al menos una de las muestras.

Genus	Ae1G (1) t0	Ae1G (1) t48	Ae1G (2) t0	Ae1G (2) t48	Ae1G (3) t0	Ae1G (3) t48	AeG (1) t0	AeG (1) t48	AeG (2) t0	AeG (2) t48	AeG (3) t0	AeG (3) t48
Klebsiella	1.2%	12.4%	1.6%	36.4%	1.0%	45.3%	0.1%	55.4%	0.9%	48.8%	1.1%	48.6%
Clostridium_sensu_stricto_1	0.1%	55.7%	0.0%	8.1%	0.5%	16.7%	0.0%	22.7%	0.1%	22.4%	0.5%	24.7%
Escherichia-Shigella	1.3%	6.1%	2.2%	10.1%	1.3%	24.4%	0.0%	5.8%	0.0%	4.5%	0.0%	4.9%
Aeromonas	0.8%	0.0%	1.3%	0.1%	1.1%	0.0%	0.2%	9.2%	0.3%	17.7%	0.2%	16.6%
Tolumonas	0.4%	1.6%	0.0%	17.9%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%
Clostridium_sensu_stricto_1	1.0%	6.1%	0.7%	0.0%	1.2%	0.0%	0.4%	0.0%	0.3%	0.1%	0.7%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_5	0.2%	0.6%	0.0%	5.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_12	0.1%	7.3%	0.0%	13.3%	0.1%	3.3%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Defluviococcus	5.1%	0.1%	7.9%	0.2%	5.0%	0.1%	2.7%	0.1%	2.9%	0.1%	3.3%	0.1%
Dechloromonas	2.3%	0.0%	2.0%	0.0%	1.9%	0.0%	7.0%	0.0%	6.6%	0.1%	7.1%	0.1%
Macelibacteroides	4.6%	3.4%	3.0%	0.2%	6.8%	0.3%	0.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.3%	0.0%
Aeromonas	0.0%	1.0%	0.0%	1.8%	0.0%	0.2%	0.0%	0.8%	0.0%	1.3%	0.0%	0.7%
Aeromonas	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.3%	0.0%	2.2%	0.0%	1.1%
Tolumonas	0.1%	0.0%	0.0%	2.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	0.0%	0.5%	0.0%	0.3%
Bacteroidetes_vadinHA17_ge	2.8%	0.1%	2.0%	0.1%	2.9%	0.1%	0.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%
Acetoanaerobium	2.5%	0.1%	2.3%	0.1%	2.6%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_3	0.0%	0.5%	0.0%	1.5%	0.0%	2.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
uncultured	0.4%	0.0%	0.6%	0.0%	0.5%	0.0%	2.2%	0.0%	1.9%	0.1%	1.7%	0.0%
Porphyromonadaceae_unclassified	1.5%	0.1%	1.0%	0.0%	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Proteocatella	1.8%	0.0%	1.9%	0.0%	2.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Denitratisona	1.5%	0.0%	1.6%	0.0%	1.4%	0.0%	1.7%	0.0%	1.9%	0.0%	1.7%	0.0%
Paraclostridium	1.5%	0.0%	1.3%	0.0%	1.8%	0.1%	0.6%	0.0%	0.3%	0.0%	0.4%	0.0%
Terrimonas	1.0%	0.0%	1.0%	0.0%	1.3%	0.1%	1.8%	0.0%	1.5%	0.0%	1.8%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_13	1.6%	0.0%	1.4%	0.0%	1.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Desulfomicrobium	1.3%	0.0%	1.6%	0.0%	1.5%	0.0%	0.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%
B1-7BS_ge	1.5%	0.0%	1.6%	0.0%	1.0%	0.0%	1.3%	0.1%	1.0%	0.0%	1.2%	0.0%
Bacteria_unclassified	0.3%	0.0%	0.2%	0.0%	0.4%	0.0%	1.5%	0.0%	1.4%	0.0%	1.6%	0.0%
Rhodocyclaceae_unclassified	0.3%	0.0%	0.3%	0.0%	0.3%	0.0%	1.6%	0.0%	1.4%	0.0%	1.5%	0.0%
Haliscomenobacter	0.2%	0.0%	0.2%	0.0%	0.3%	0.0%	1.1%	0.0%	1.5%	0.0%	1.3%	0.0%
uncultured	0.4%	0.0%	0.4%	0.0%	0.6%	0.0%	1.0%	0.0%	1.4%	0.0%	0.9%	0.0%
Chitinivorax	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	1.4%	0.0%	0.9%	0.0%
Gottschalkia	1.1%	0.0%	1.0%	0.0%	1.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Clostridiaceae_1_unclassified	0.0%	0.3%	0.1%	0.2%	0.0%	1.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
uncultured	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.7%	0.0%	1.2%	0.0%	1.4%	0.0%
Chromatiaceae_unclassified	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.9%	0.0%	1.3%	0.0%	1.0%	0.0%
Nitrospira	0.6%	0.0%	0.6%	0.0%	0.7%	0.0%	1.2%	0.0%	0.8%	0.0%	0.9%	0.0%
PHOS-HE36_ge	0.8%	0.0%	0.7%	0.0%	1.0%	0.0%	1.0%	0.0%	1.2%	0.0%	1.0%	0.0%
Nitrospira	0.9%	0.0%	0.5%	0.0%	1.1%	0.0%	1.2%	0.0%	0.5%	0.0%	0.9%	0.0%
uncultured	0.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	1.1%	0.0%	1.1%	0.0%	0.8%	0.0%
Zymomonas	0.2%	0.0%	0.5%	0.0%	0.4%	0.0%	1.1%	0.0%	1.1%	0.0%	1.0%	0.0%
Streptococcus	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.1%	1.1%
Novosphingobium	0.8%	0.0%	0.8%	0.0%	0.9%	0.0%	1.1%	0.0%	0.9%	0.0%	1.1%	0.0%
Actinobacteria_unclassified	0.5%	0.0%	1.1%	0.0%	0.5%	0.0%	0.4%	0.0%	0.3%	0.0%	0.5%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_12	0.0%	0.5%	0.0%	0.4%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Tabla 8. Heatmap de comunidades microbianas presentes en: la fermentación del inóculo sin enriquecer (AeGA) realizados en triplicado (AeGA (1)-AeGA (3)) en tiempo 0 (t0) y 48 hs (t48); fermentación con el inóculo enriquecido (Ae1GA) realizados en triplicado (Ae1GA(1)- Ae1GA(3)) en tiempo 0 (t0) y 48 hs (t48). Las abundancias relativas se determinaron de acuerdo al análisis del gen del ARNr de 16S mediante secuenciación masiva. Se muestra la afiliación a nivel de género de aquellos microorganismos con una abundancia relativa mayor a 1 % en al menos una de las muestras.

Genus	AeGA(1) t0	AeGA(1) t48	AeGA(2) t0	AeGA(2) t48	AeGA(3) t0	AeGA(3) t48	Ae1GA(1) ) t0	Ae1GA (1) t48	Ae1GA (2) t0	Ae1GA (2) t48	Ae1GA (3) t0	Ae1GA (3) t48
Clostridium_sensu_stricto_1	0.8%	48.3%	0.7%	56.1%	0.1%	57.0%	1.0%	72.1%	0.2%	64.7%	2.3%	81.7%
Streptococcus	0.2%	36.4%	0.3%	18.3%	0.0%	26.0%	0.0%	0.3%	0.1%	27.4%	0.2%	0.1%
Clostridium_sensu_stricto_12	0.1%	1.9%	0.0%	3.1%	0.0%	1.9%	0.2%	20.9%	0.0%	6.5%	1.6%	16.3%
Defluvicoccus	3.8%	0.2%	3.5%	0.2%	10.2%	0.3%	12.0%	0.5%	12.2%	0.3%	11.2%	0.4%
Klebsiella	0.1%	7.8%	0.3%	11.6%	0.0%	8.2%	0.5%	0.0%	0.6%	0.0%	0.6%	0.0%
Dechloromonas	4.5%	0.2%	5.8%	0.3%	5.4%	0.2%	2.2%	0.0%	2.1%	0.0%	2.2%	0.1%
Macellibacteroides	0.2%	0.0%	0.1%	0.1%	0.2%	0.0%	3.0%	0.1%	4.0%	0.0%	3.8%	0.1%
Bifidobacterium	0.0%	0.7%	0.0%	3.0%	0.0%	1.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_5	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Acetoanaerobium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.5%	0.1%	2.1%	0.0%	2.6%	0.0%
Escherichia-Shigella	0.0%	1.7%	0.0%	2.5%	0.0%	1.9%	0.8%	0.0%	1.1%	0.0%	1.2%	0.0%
Bacteroidetes_vadinHA17_ge	0.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.2%	0.0%	2.5%	0.0%	2.3%	0.0%	1.9%	0.0%
uncultured	2.2%	0.1%	2.1%	0.0%	1.5%	0.0%	0.5%	0.0%	0.3%	0.0%	0.2%	0.0%
Rhodocyclaceae_unclassified	1.1%	0.0%	1.9%	0.0%	0.9%	0.0%	0.3%	0.0%	0.4%	0.0%	0.2%	0.0%
Terrimonas	1.7%	0.0%	1.8%	0.0%	1.7%	0.0%	1.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.9%	0.0%
Denitratisona	1.2%	0.0%	1.7%	0.0%	1.4%	0.0%	1.7%	0.1%	1.6%	0.0%	1.2%	0.0%
B1-7BS_ge	1.3%	0.0%	1.7%	0.0%	0.5%	0.0%	0.5%	0.0%	0.6%	0.0%	0.4%	0.0%
Actinobacteria_unclassified	0.3%	0.0%	0.3%	0.0%	1.7%	0.0%	1.5%	0.0%	1.6%	0.0%	1.3%	0.0%
Nitrospira	1.7%	0.0%	1.2%	0.0%	0.5%	0.0%	0.3%	0.0%	0.3%	0.0%	0.6%	0.0%
Bacteria_unclassified	1.7%	0.0%	1.2%	0.0%	1.2%	0.0%	0.5%	0.0%	0.1%	0.0%	0.2%	0.0%
Enterococcus	0.0%	0.5%	0.0%	1.6%	0.0%	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_13	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	0.0%	1.6%	0.0%	0.6%	0.0%
uncultured	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	1.2%	0.0%	1.1%	0.0%	1.5%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_3	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
Desulfomicrobium	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%	0.0%	1.5%	0.0%	1.1%	0.0%
Novosphingobium	1.1%	0.0%	0.8%	0.0%	1.5%	0.0%	1.3%	0.0%	1.2%	0.0%	1.4%	0.0%
PHOS-HE36_ge	1.4%	0.0%	1.2%	0.0%	1.3%	0.0%	0.6%	0.0%	0.6%	0.0%	0.5%	0.0%
Halscomenobacter	1.2%	0.0%	1.4%	0.0%	0.9%	0.0%	0.4%	0.0%	0.3%	0.0%	0.1%	0.0%
Rhizobiales_unclassified	0.4%	0.0%	0.4%	0.0%	0.9%	0.0%	1.0%	0.0%	1.1%	0.0%	1.4%	0.0%
Paraclostridium	0.4%	0.0%	0.4%	0.0%	0.6%	0.0%	1.2%	0.0%	1.3%	0.0%	1.1%	0.0%
uncultured	1.3%	0.0%	0.9%	0.0%	1.2%	0.0%	0.4%	0.0%	0.4%	0.0%	0.3%	0.0%
uncultured_ge	1.2%	0.0%	1.0%	0.0%	1.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%
Nitrospira	1.2%	0.0%	1.2%	0.0%	0.3%	0.0%	0.3%	0.0%	0.4%	0.0%	0.2%	0.0%
Comamonadaceae_unclassified	0.7%	0.0%	0.4%	0.0%	0.8%	0.1%	0.7%	0.0%	1.2%	0.0%	0.8%	0.0%
PeM15_ge	0.3%	0.0%	0.2%	0.0%	1.0%	0.0%	1.2%	0.0%	0.8%	0.0%	0.9%	0.0%
Proteocatella	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.9%	0.0%	1.0%	0.0%	1.2%	0.0%
Chitinivorax	0.9%	0.0%	1.1%	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Defluvicoccus	0.6%	0.0%	0.4%	0.0%	1.0%	0.0%	1.1%	0.0%	1.1%	0.0%	0.8%	0.0%
Candidatus_Microthrix	0.4%	0.0%	0.3%	0.0%	0.7%	0.0%	1.1%	0.0%	1.0%	0.1%	0.9%	0.0%
Zymomonas	1.0%	0.0%	0.8%	0.0%	0.9%	0.0%	0.5%	0.0%	0.3%	0.0%	0.3%	0.0%
Aquabacterium	0.2%	0.0%	1.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.2%	0.0%	0.1%	0.0%
uncultured	1.0%	0.0%	0.9%	0.0%	0.7%	0.0%	0.2%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%

En el caso del ensayo realizado con los enriquecimientos secundarios y terciarios y la mezcla de los inóculos se observó una co-dominancia de los géneros *Streptococcus* y *Paraclostridium* aunque con una abundancia relativa bastante menor que el género *Clostridium*.

Microorganismos del género *Paraclostridium* han sido reportados en reactores de fermentación oscura (Detman et al., 2020). En particular la cepa *Paraclostridium* CR4 ha sido aislada del bagazo de la caña de azúcar y esta reportada como productora de H<sub>2</sub> y ácido butírico (Rabelo et al., 2020).

En estos enriquecimientos se detectó también la presencia de *Acetoanaerobium*. Microorganismos de este género están reportados como homoacetogénicos. Este

microorganismo crece con H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>, glucosa y maltosa y produce acetato como único producto (Schink y Bomar, 1992). La presencia de este microorganismo podría explicar la alta concentración de acetato obtenida en las fermentaciones con el segundo y tercer enriquecimiento.

Tabla 9. Heatmap que muestra la abundancia relativa de los microorganismos presentes en muestras tomadas del ensayo de: fermentación con el inóculo enriquecido Ae2 realizados en triplicado (Ae2 (1) - Ae2 (3)) a tiempo 0 (t0) y 48 hs (t48); fermentación utilizando la mezcla 1:1 de inóculos enriquecido (Ae2) y sin enriquecer (Ae) realizados en triplicado (Ae:Ae2 (1) – Ae:Ae2 (3)) en muestras tomadas a tiempo 0 (t0) y 48 hs (t48). Las abundancias relativas se determinaron de acuerdo al análisis del gen del ARNr de 16S mediante secuenciación masiva. Se muestra la afiliación a nivel de género de aquellos microorganismos con una abundancia relativa mayor a 1 % en al menos una de las muestras.

Genus	Ae:Ae2 GA(1) t0	Ae:Ae2 GA(1) t48	Ae:Ae2 GA(2) t0	Ae:Ae2 GA(2) t48	Ae:Ae2 GA(3) t0	Ae:Ae2 GA(3) t48	Ae2 GA(1) t0	Ae2 GA(1) t48	Ae2 GA(2) t0	Ae2 GA(2) t48	Ae2 GA(3) t0	Ae2 GA(3) t48
Clostridium_sensu_stricto_1	0.6%	85.6%	1.1%	84.6%	1.3%	82.3%	0.1%	93.5%	0.1%	88.0%	0.4%	90.2%
Streptococcus	0.0%	3.8%	0.0%	5.9%	0.2%	11.9%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Paraclostridium	6.9%	0.0%	6.9%	0.0%	8.5%	0.0%	9.0%	0.3%	9.4%	0.5%	10.0%	0.3%
Acetoanaerobium	9.0%	0.1%	8.0%	0.1%	6.9%	0.1%	9.2%	0.2%	9.6%	0.4%	9.7%	0.2%
Clostridium_sensu_stricto_3	0.0%	8.7%	0.0%	7.1%	0.1%	3.0%	0.0%	0.0%	0.0%	4.2%	0.0%	0.2%
Clostridium_sensu_stricto_13	6.7%	0.0%	6.7%	0.0%	6.5%	0.0%	6.4%	0.2%	7.3%	0.2%	7.9%	0.2%
Proteinclasticum	7.0%	0.1%	6.1%	0.1%	4.8%	0.1%	6.8%	0.4%	7.0%	0.5%	7.1%	0.2%
Defluviococcus	5.2%	0.0%	5.9%	0.0%	5.3%	0.1%	5.7%	0.1%	5.1%	0.3%	5.0%	0.1%
Macellibacteroides	4.7%	0.1%	5.0%	0.1%	4.7%	0.2%	5.2%	0.9%	4.7%	0.6%	5.6%	0.5%
Gottschalkia	4.0%	0.0%	4.3%	0.0%	4.7%	0.0%	4.8%	0.1%	4.8%	0.2%	4.4%	0.1%
Clostridium_sensu_stricto_12	0.0%	0.1%	0.0%	0.2%	0.0%	0.4%	0.0%	0.4%	0.0%	0.4%	0.0%	4.2%
Pseudomonas	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Escherichia-Shigella	0.1%	0.0%	0.1%	0.3%	0.0%	0.2%	0.1%	2.3%	0.2%	0.1%	0.1%	2.3%
Clostridium_sensu_stricto_13	2.0%	0.0%	1.9%	0.0%	1.6%	0.0%	2.3%	0.0%	2.1%	0.1%	2.1%	0.1%
Porphyromonadaceae_unclassified	1.9%	0.0%	1.4%	0.0%	1.9%	0.0%	2.1%	0.0%	1.5%	0.3%	2.1%	0.1%
Syntrophomonas	1.7%	0.0%	1.7%	0.0%	1.6%	0.0%	1.2%	0.0%	1.6%	0.0%	1.9%	0.1%
Dechloromonas	1.4%	0.0%	1.8%	0.0%	1.5%	0.0%	0.3%	0.0%	0.2%	0.0%	0.3%	0.0%
Proteocatella	1.2%	0.0%	1.0%	0.0%	0.9%	0.0%	1.4%	0.0%	1.6%	0.1%	1.7%	0.1%
Desulfovibrio	0.8%	0.0%	0.9%	0.0%	0.8%	0.0%	0.7%	0.1%	1.1%	0.1%	1.5%	0.0%
Family_XIII_unclassified	1.1%	0.0%	1.1%	0.0%	1.2%	0.0%	0.9%	0.0%	1.3%	0.1%	1.3%	0.0%
Rhizobiales_unclassified	0.9%	0.0%	0.8%	0.0%	0.7%	0.0%	1.2%	0.0%	1.1%	0.1%	0.8%	0.0%
Actinobacteria_unclassified	1.2%	0.0%	0.8%	0.0%	1.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.8%	0.1%	0.5%	0.0%
Desulfomicrobium	0.8%	0.0%	0.6%	0.0%	0.7%	0.0%	1.0%	0.0%	1.1%	0.1%	0.9%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_1	1.0%	0.3%	0.9%	0.0%	0.9%	0.6%	1.0%	0.0%	0.9%	0.1%	1.1%	0.0%
Blvii28_wastewater-sludge_group	0.7%	0.0%	0.6%	0.0%	0.3%	0.0%	1.1%	0.0%	0.9%	0.1%	0.7%	0.0%
SRB2_ge	0.7%	0.0%	0.6%	0.0%	0.4%	0.0%	0.9%	0.0%	1.1%	0.0%	1.0%	0.0%
uncultured	0.8%	0.0%	0.5%	0.0%	0.3%	0.0%	1.1%	0.0%	0.7%	0.0%	0.7%	0.0%
Klebsiella	0.2%	0.0%	0.2%	0.4%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%	1.1%	0.0%	0.0%
Defluviococcus	0.5%	0.0%	1.0%	0.0%	0.8%	0.0%	0.8%	0.0%	1.0%	0.1%	0.7%	0.0%
Bacteroidetes_vadinHA17_ge	0.6%	0.0%	0.5%	0.0%	0.6%	0.0%	1.0%	0.1%	0.7%	0.1%	1.0%	0.0%
uncultured	0.9%	0.0%	0.6%	0.0%	0.5%	0.0%	1.0%	0.0%	0.5%	0.1%	0.6%	0.0%
Sedimentibacter	0.8%	0.0%	0.6%	0.0%	0.7%	0.0%	0.7%	0.0%	0.8%	0.0%	1.0%	0.1%

En particular en las fermentaciones realizadas con el inóculo Ae3 con glucosa y acetato (Ae3GA) se observó, la presencia de *Proteinclasticum*, microorganismo que se ha reportado como productor de propionato. Como se mencionó anteriormente, este microorganismo podría estar involucrado en la transferencia de electrones interespecie. Además, en esa misma muestra se detectó mayor abundancia relativa de *Dechloromonas* que podría tener un rol como microorganismo electroactivo. Este microorganismo puede consumir el propionato y succinato (Horn et al., 2005) y se podría sugerir que utiliza el ánodo como aceptor de electrones.

En cuanto a los microorganismos reportados como electrogénicos, se observaron microorganismos del género *Defluviococcus* en todas las fermentaciones. Secuencias de este

microorganismo han sido detectadas en la superficie de electrodos colocados en sedimentos marinos para la remoción de petróleo (Maturro et al., 2017).

Tabla 10. Heatmap que muestra la abundancia relativa de los microorganismos presentes en muestras tomadas de los ensayos de fermentación con el tercer enriquecimiento (Ae3 1- Ae3 2) a tiempo 0 (t0) y a las 48 h (t48); fermentación de la mezcla 1:1 de Ae3 con Ae (Ae:Ae3 1- Ae:Ae3 2) en tiempo 0 (t0) y 48 hs (t48). Las abundancias relativas se determinaron de acuerdo al análisis del gen del ARNr de 16S mediante secuenciación masiva. Se muestra la afiliación a nivel de género de aquellos microorganismos con una abundancia relativa mayor a 1 % en al menos una de las muestras.

Genus	Ae3 GA(1) t0	Ae3 GA(1) t48	Ae3 GA(2) t0	Ae3 GA(2) t48	Ae:Ae3 GA(1) t0	Ae:Ae3 GA(1) t48	Ae:Ae3 GA(2) t0	Ae:Ae3 GA(2) t48
Clostridium_sensu_stricto_1	0.4%	81.1%	0.4%	94.9%	0.2%	66.7%	0.4%	86.7%
Streptococcus	0.0%	8.1%	0.0%	0.0%	0.1%	32.0%	0.0%	10.6%
Paraclostridium	19.2%	0.2%	23.1%	0.5%	10.3%	0.0%	8.2%	0.1%
Proteiniclasticum	15.7%	0.1%	14.0%	0.3%	6.8%	0.0%	7.3%	0.1%
Acetoanaerobium	8.8%	0.0%	6.8%	0.1%	4.2%	0.0%	4.5%	0.0%
Gottschalkia	5.8%	0.0%	7.4%	0.1%	3.1%	0.0%	2.6%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_3	0.0%	7.0%	0.0%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Desulfovibrio	4.6%	0.1%	6.2%	0.1%	3.1%	0.0%	3.0%	0.0%
Dechloromonas	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	4.6%	0.0%	5.2%	0.0%
Syntrophomonas	4.4%	0.0%	3.2%	0.0%	1.5%	0.0%	2.1%	0.0%
ST-12K33_ge	2.8%	0.0%	4.3%	0.1%	1.3%	0.0%	1.3%	0.0%
Defluviicoccus	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	4.2%	0.0%	4.1%	0.1%
Geobacter	3.3%	0.1%	1.9%	0.1%	1.8%	0.0%	1.7%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_13	2.6%	0.0%	1.9%	0.0%	1.0%	0.0%	1.2%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_12	0.0%	2.3%	0.0%	0.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Macellibacteroides	1.2%	0.0%	2.3%	0.1%	0.6%	0.0%	0.6%	0.0%
Petrimonas	2.2%	0.0%	2.0%	0.1%	0.8%	0.0%	0.8%	0.0%
Limnochordaceae_ge	1.6%	0.1%	1.3%	0.1%	1.0%	0.0%	1.6%	0.0%
Syntrophomonas	1.6%	0.0%	1.4%	0.0%	0.5%	0.0%	1.0%	0.0%
Bifidobacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.6%
Lentimicrobium	1.5%	0.0%	0.7%	0.0%	0.5%	0.0%	0.6%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_13	1.2%	0.0%	1.5%	0.0%	0.9%	0.0%	0.6%	0.0%
Clostridium_sensu_stricto_1	1.4%	0.0%	0.8%	0.0%	1.0%	0.1%	1.0%	0.0%
Escherichia-Shigella	0.1%	0.4%	0.2%	1.4%	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%
OPB56_ge	1.3%	0.0%	0.8%	0.0%	0.3%	0.0%	0.5%	0.0%
adinBC27_wastewater-sludge_group	0.9%	0.0%	1.3%	0.0%	0.4%	0.0%	0.5%	0.0%
Family_XIII_unclassified	1.2%	0.0%	1.1%	0.0%	0.6%	0.0%	0.6%	0.0%
Actinobacteria_unclassified	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.9%	0.0%	1.2%	0.0%
Proteiniclasticum	1.1%	0.0%	0.6%	0.0%	0.4%	0.0%	0.4%	0.0%
Denitratisoma	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.9%	0.0%	1.1%	0.0%
Dechlorobacter	0.1%	0.0%	1.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%

En la fermentación con el tercer enriquecimiento se observó la presencia de microorganismos del género *Desulfovibrio* que también han sido reportados como electroactivos (Eaktasang et al., 2013).

#### 4.3 Ensayos de electrofermentación

##### 4.3.1 Rendimiento de H<sub>2</sub>

En los ensayos de electrofermentación realizados se observó una mejora de la producción de hidrógeno cuando se utilizó una mezcla de inóculo sin enriquecer (Ae) con el inóculo enriquecido (Ae1) en proporción 1:1 (E(Ae:Ae1)). El rendimiento obtenido fue de  $1,60 \pm 0,76 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosa}}$ , aunque este presentó una gran variación entre las réplicas (figura 10). Esto podría indicar que el

agregado de bacterias electroactivas estaría favoreciendo la producción de hidrógeno por electrofermentación, aunque el proceso no fue muy reproducible. Si bien se observó el máximo valor en la EF, el haber mucha variación las diferencias no son significativas según el análisis de Tukey's pairwise.

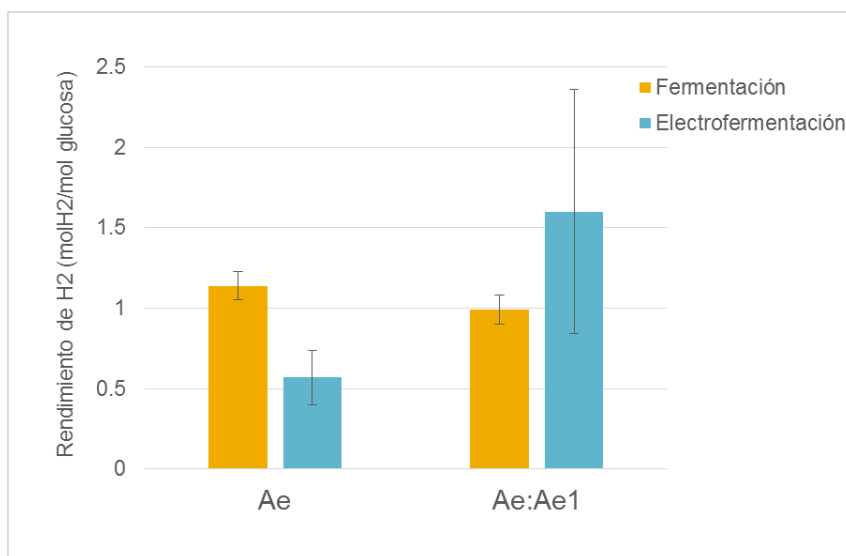


Figura 10. Resultados del ensayo de electrofermentación. La gráfica de barras muestra el promedio y la desviación estándar del rendimiento en hidrógeno para los ensayos realizados por triplicado. El medio de cultivo utilizado contenía glucosa y acetato como sustratos.

#### 4.3.2 Estudio de los productos de EF

Utilizando el inóculo sin enriquecer (Ae) se observó una mayor producción de lactato tanto en las fermentaciones como en las electrofermentaciones (Figura 11A). Los ensayos de electrofermentación (EFAe) presentaron mayor concentración de lactato así como una menor cantidad de butirato. Asimismo, se observó mayor cantidad de propionato en el ensayo EF(Ae)2 (Figura 11A). La presencia de propionato también podrían explicar los menores rendimientos de H<sub>2</sub> obtenidos en los ensayos de EF (Sivagurunathan et al., 2014). Hay algunos grupos de *Clostridium* que están reportados como productores de propionato. Finalmente, la presencia de acetato, butirato y etanol podría indicar la producción de hidrógeno por fermentación butírica y fermentación ácido mixta.

En el último experimento de EF en el que se utilizó la mezcla de inóculos enriquecidos y sin enriquecer (relación 1:1 del EAe1 y Ae). Se obtuvieron mayores concentraciones de butirato en pudiendo sugerirse que se favoreció la producción de H<sub>2</sub> mediante fermentación butírica. Asimismo se obtuvo una mayor producción de etanol en las fermentaciones convencionales



(F(Ae:Ae1)) (Figura 11B). Por falta de tiempo en la pasantía, no fue posible realizar el estudio de las comunidades microbianas de este último ensayo.

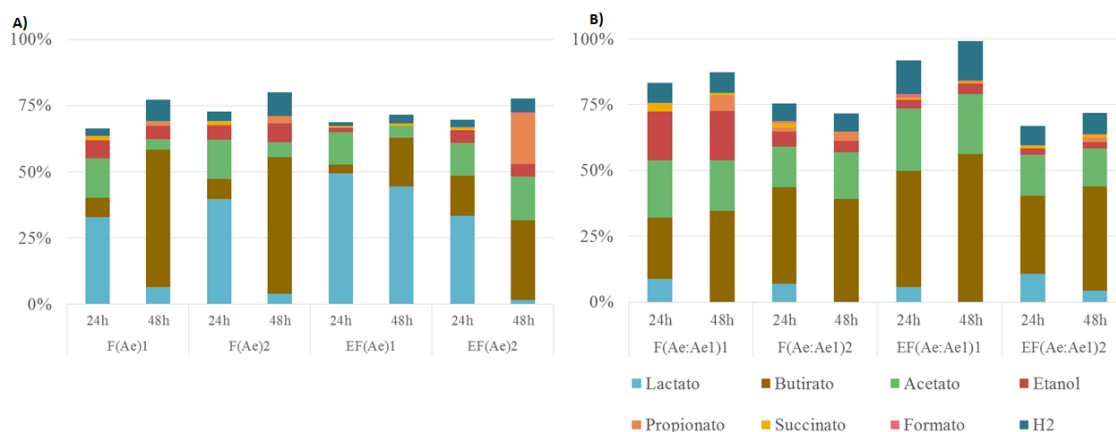


Figura 11. A) Análisis de productos de fermentación en los ensayos (FAe) y la electrofermentación (EFAe) en glucosa y acetato utilizando el inóculo sin enriquecer. B) Análisis de productos de fermentación en los ensayos de fermentación y de EF realizados con la mezcla de inóculos (F(Ae:Ae1), EF(Ae:Ae1)) con la adición de glucosa y acetato como sustratos. Los estudios se realizaron por duplicado y se midió a las 24 y 48h

#### 4.3.3 Comunidades microbianas en los ensayos de EF

En todos los experimentos, en las muestras tomadas al final de la operación, las comunidades se vieron enriquecidas por microorganismos del género *Streptococcus* y *Clostridium* (Tabla 11). La producción de hidrógeno probablemente se correlaciona con la presencia de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae (*E. coli* y *Klebsiella*) y del género *Clostridium*. Además, la literatura evidencia que algunas especies de *Clostridium* podrían transferir electrones desde o hacia un electrodo polarizado, ya sea directamente o usando mediadores electrónicos (Peguin y Soucaille, 1996). En particular, Choi et al. (2014) informaron que *C. pasteurianum* recibió electrones directamente de un cátodo polarizado con cambios en los perfiles metabólicos, aumentando la producción de 1,3-propanodiol y butanol a partir de glicerol y glucosa, respectivamente. Kumar et al. (2017) también trabajaron con un consorcio microbiano enriquecido para la producción de bioelectricidad en celdas de combustible microbianas. *Clostridium* fue el género dominante y fue responsable de la fermentación, así como de la transferencia de electrones desde el medio de fermentación al electrodo mediado por ferredoxina. Más recientemente se informó un aumento en las producciones de H<sub>2</sub> y

butirato asociadas con la selección de bacterias productoras de H<sub>2</sub>, incluidas las especies de *Clostridium*, durante la EF de glucosa utilizando cultivos mixtos (Toledo-Alarcón et al. , 2019).

Por otro lado, los menores rendimientos de hidrógeno en las electrofermentaciones con el lodo sin enriquecer (EF(Ae)) podrían explicarse por la presencia de microorganismos productores de ácido láctico como *Streptococcus* que se presentaron en mayor abundancia relativa en estas condiciones. La presencia de este microorganismo se puede correlacionar con mayores concentraciones de lactato producido durante la electrofermentación (Figura 8A). También se observó la presencia de *Bifidobacterium*, este género fue reportado como productor de propionato (Sivagurunathan et al., 2014). Asimismo se destaca la presencia del género *Prevotella*, reportado como subdominante en los reactores de producción de H<sub>2</sub> aunque su función no está del todo clara. Se ha informado que pueden contribuir a la descomposición de sustratos complejos, pero también a competir por el consumo de glucosa (Cabrol et al., 2017). Como posibles microorganismos electroactivos, se detectó la presencia del género *Defluviicoccus*.

De acuerdo con los resultados obtenidos el agregado de un inóculo enriquecido en bacterias electroactivas sería beneficioso cuando se agrega acetato al medio de cultivo tanto en el proceso de fermentación como de electrofermentación (Tabla 12).

Tabla 11. Heatmap que muestra la abundancia relativa de los microorganismos presentes en las muestras de los ensayos de fermentación F1 y F2 en muestras tomadas a tiempo 0 (t0), 24 hs (t24) y 48 hs (t48); y en los ensayos de electrofermentación EF1 y EF2 en muestras tomadas a tiempo 0 (t0), 24 hs (t24) y 48 hs (t48). Las abundancias relativas se determinaron de acuerdo al análisis del gen del ARNr de 16S mediante secuenciación masiva. Se muestra la afiliación a nivel de género de aquellos microorganismos con una abundancia relativa mayor a 1 % en al menos una de las muestras.

Genus	F(Ae)	F(Ae)	F(Ae)	F(Ae)	EF(Ae)	EF(Ae)	EF(Ae)	EF(Ae)
	1 t0	1 t48	2 t0	2 t48	1 t0	1 t48	2 t0	2 t48
Streptococcus	0%	44%	0%	40%	0%	73%	0%	39%
Clostridium_sensu_stricto_1	0%	11%	0%	11%	0%	7%	0%	34%
Clostridium_sensu_stricto_12	0%	19%	0%	22%	0%	1%	0%	0%
Escherichia-Shigella	0%	8%	0%	14%	0%	4%	0%	10%
Klebsiella	0%	6%	0%	6%	1%	3%	1%	4%
Dechloromonas	5%	0%	5%	0%	5%	0%	4%	0%
Defluviococcus	2%	0%	2%	0%	5%	0%	3%	0%
Clostridium_sensu_stricto_12	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	3%
Prevotella_9	0%	3%	0%	1%	0%	0%	0%	2%
B1-7BS_ge	2%	0%	3%	0%	2%	0%	2%	0%
Bifidobacterium	0%	0%	0%	0%	0%	2%	0%	0%
uncultured	2%	0%	2%	0%	1%	0%	2%	0%
Denitratisoma	2%	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%
Rhodocyclaceae_unclassified	1%	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%
PHOS-HE36_ge	1%	0%	1%	0%	1%	0%	2%	0%
Nitrospira	2%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
Nitrospira	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
Clostridiaceae_1_unclassified	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
Chromatiaceae_unclassified	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
Terrimonas	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
uncultured	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
Macellibacteroides	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%
Halicomonobacter	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
Bacteria_unclassified	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
Lactobacillus	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%
uncultured	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
uncultured_ge	1%	0%	1%	0%	1%	0%	1%	0%
Tolumonas	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Tabla 12. Rendimientos en H<sub>2</sub> obtenidos en los diferentes experimentos y principales microorganismos encontrados en las comunidades microbianas.

Experimento	Sustrato	Rendimiento en H <sub>2</sub> (mol <sub>H<sub>2</sub></sub> /mol <sub>glucosa</sub> )	Microorganismos más abundantes
1 (AeG)	Glucosa	0,84±0,08	<i>Klebsiella</i> , <i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> , <i>Escherichia-Shigella</i> , <i>Tolumonas</i>
2 (Ae1G)	Glucosa	0,44±0,15	<i>Klebsiella</i> , <i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> <i>Escherichia-Shigella</i> , <i>Aeromonas</i>
3 (Ae:Ae1G)	Glucosa y acetato	0,72±0,28	No se secuenció
4 (AeGA)	Glucosa y acetato	0,60±0,17	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> <i>Streptococcus</i> , <i>Defluviococcus</i>
5 (Ae1GA)	Glucosa y acetato	1,04±0,07	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> <i>Streptococcus</i>

6 (Ae:Ae1GA)	Glucosa y acetato	1,02±0,15	<i>Clostridium_sensu_stricto_12</i>
			<i>Defluviicoccus</i>
7 (Ae2GA)	Glucosa y acetato	0,98±0,14	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>
			<i>Paraclostridium</i> <i>Acetoanaerobium</i>
8 (Ae:Ae2GA)	Glucosa y acetato	1,04±0,04	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>
			<i>Streptococcus</i> <i>Paraclostridium</i> <i>Acetoanaerobium</i>
9 (Ae3GA)	Glucosa y acetato	1,1±0,11	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>
			<i>Streptococcus</i> <i>Paraclostridium</i> <i>Proteiniclasticum</i>
10 (Ae:Ae3GA)	Glucosa y acetato	1,03±0,15	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>
			<i>Streptococcus</i> <i>Paraclostridium</i> <i>Proteiniclasticum</i>
11 F(Ae)	Glucosa y acetato	1,14±0,09	<i>Streptococcus</i>
			<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> <i>Clostridium_sensu_stricto_12</i> <i>Escherichia-Shigella</i>
12 F(Ae:Ae1)	Glucosa y acetato	0,99±0,09	No se secuenció
13 EF(Ae)	Glucosa y acetato	0,57±0,17	<i>Streptococcus</i>
			<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i> <i>Escherichia-Shigella</i>
14 EF(Ae:Ae1)	Glucosa y acetato	1,60±0,76	No se secuenció

## 5. Conclusiones

- Los enriquecimientos fueron efectivos para la selección de microorganismos electroactivos y fermentadores detectándose una especialización de la comunidad
- Esto permitió tener el máximo rendimientos de H<sub>2</sub> en las EF realizadas con la mezcla de inóculos enriquecido y sin enriquecer (Ae:Ae1) aunque estos ensayos fueron los que tuvieron mayor variación entre las réplicas.
- El máximo rendimiento de H<sub>2</sub> se obtuvo en los ensayos realizados con la mezcla de inóculos (Ae:Ae3) aunque presentó variación en los triplicados. Se obtuvieron mejores rendimientos de H<sub>2</sub> con el agregado de acetato.
- El acetato podría tener un efecto de impulsar el crecimiento de *Geobacter* favoreciendo la relación sintrófica con *Clostridium* y con esto mejorando la producción de H<sub>2</sub>

- Como microorganismos fermentadores las poblaciones predominantes correspondieron a *Klebsiella*, *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*, *Escherichia-Shigella*, *Tolomonas*, *Streptococcus*.
- Como microorganismos electroactivos se encontraron aquellos pertenecientes al género *Desulfovibrio* y *Geobacter*
- Si bien los enriquecimientos fueron útiles para lograr mayores rendimientos en la EF, se requieren más estudios para mejorar la reproducibilidad del proceso.

## REFERENCIAS

Achenbach, L. A., Michaelidou, U., Bruce, R. A., Fryman, J., & Coates, J. D. (2001). *Dechloromonas agitata* gen. nov., sp. nov. and *Dechlorosoma suillum* gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per) chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(2), 527-533.

Almeida, J.R.M., Fávoro, L.C.L., and Quirino, B.F. (2012) Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnol Biofuels* 5: 48

Awate, B., Steidl, R. J., Hamlicher, T., & Reguera, G. (2017). Stimulation of electro-fermentation in single-chamber microbial electrolysis cells driven by genetically engineered anode biofilms. *Journal of Power Sources*, 356, 510-518.

Barbirato, F., Chedaille, D., & Bories, A. (1997). Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates. *Applied microbiology and biotechnology*, 47(4), 441-446.

Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2003). Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and environmental microbiology*, 69(3), 1548-1555.

Breitenstein, A., Wiegel, J., Haertig, C., Weiss, N., Andreesen, J. R., & Lechner, U. (2002). Reclassification of *Clostridium hydroxybenzoicum* as *Sedimentibacter hydroxybenzoicus* gen. nov., comb. nov., and description of *Sedimentibacter saalensis* sp. nov.. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 801-807.

Bursac, T., Gralnick, J. A., & Gescher, J. (2017). Acetoin production via unbalanced fermentation in *Shewanella oneidensis*. *Biotechnology and bioengineering*, 114(6), 1283-1289.

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.

- Caldwell, M. E., Allen, T. D., Lawson, P. A., & Tanner, R. S. (2011). *Tolumonas osonensis* sp. nov., isolated from anoxic freshwater sediment, and emended description of the genus *Tolumonas*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(11), 2659-2663.
- Castelló, E., Ferraz-Junior, A. D. N., Andreani, C., del Pilar Anzola-Rojas, M., Borzacconi, L., Buitrón, G., ... & Palomo-Briones, R. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109602
- Chandrasekhar, K., Amulya, K., & Mohan, S. V. (2015). Solid phase bio-electrofermentation of food waste to harvest value-added products associated with waste remediation. *Waste management*, 45, 57-65.
- Chatellard, L., Trably, E., & Carrère, H. (2016). The type of carbohydrates specifically selects microbial community structures and fermentation patterns. *Bioresource technology*, 221, 541-549.
- Choi, O., Um, Y., & Sang, B. I. (2012). Butyrate production enhancement by *Clostridium tyrobutyricum* using electron mediators and a cathodic electron donor. *Biotechnology and bioengineering*, 109(10), 2494-2502.
- Choi, O., Kim, T., Woo, H. M., & Um, Y. (2014). Electricity-driven metabolic shift through direct electron uptake by electroactive heterotroph *Clostridium pasteurianum*. *Scientific reports*, 4, 6961.
- Cordas, C. M., Guerra, L. T., Xavier, C., & Moura, J. J. (2008). Electroactive biofilms of sulphate reducing bacteria. *Electrochimica Acta*, 54(1), 29-34.
- Creasey, R. C., Mostert, A. B., Nguyen, T. A., Viridis, B., Freguia, S., & Laycock, B. (2018). Microbial nanowires—electron transport and the role of synthetic analogues. *Acta biomaterialia*, 69, 1-30.
- De Vrieze, J., Arends, J. B., Verbeeck, K., Gildemyn, S., & Rabaey, K. (2018). Interfacing anaerobic digestion with (bio) electrochemical systems: Potentials and challenges. *Water research*, 146, 244-255.
- Detman, A., Laubitz, D., Chojnacka, A., Kiela, P. R., Salamon, A., Barberan, A., ... & Sikora, A. (2020). Dynamics of Dark Fermentation Microbial Communities in the Light of Lactate and Butyrate Production.
- Dinamarca, C. S. (2010). Homoacetogenic H<sub>2</sub> consumption in fermentative hydrogen production processes.
- Eaktasang, N., Kang, C. S., Ryu, S. J., Suma, Y., & Kim, H. S. (2013). Enhanced current production by electroactive biofilm of sulfate-reducing bacteria in the microbial fuel cell. *Environmental Engineering Research*, 18(4), 277-281.
- Fischer-Romero, C., Tindall, B. J., & Jüttner, F. (1996). *Tolumonas auensis* gen. nov., sp. nov., a toluene-producing bacterium from anoxic sediments of a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(1), 183-188.

- Flynn, J. M., Ross, D. E., Hunt, K. A., Bond, D. R., & Gralnick, J. A. (2010). Enabling unbalanced fermentations by using engineered electrode-interfaced bacteria. *MBio*, 1(5), e00190-10.
- Förster, A. H., Beblawy, S., Golitsch, F., & Gescher, J. (2017). Electrode-assisted acetoin production in a metabolically engineered *Escherichia coli* strain. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 65.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73-95.
- Grabowski, A., Tindall, B. J., Bardin, V., Blanchet, D., & Jeanthon, C. (2005). *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1113-1121.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4, 9. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Hughenoltz, J., & Ljungdahl, L. G. (1990). Metabolism and energy generation in homoacetogenic clostridia. *FEMS microbiology reviews*, 7(3-4), 383-389.
- Hirose, A., Kasai, T., Aoki, M., Umemura, T., Watanabe, K., & Kouzuma, A. (2018). Electrochemically active bacteria sense electrode potentials for regulating catabolic pathways. *Nature communications*, 9(1), 1-10.
- Hoelzle, R. D., Viridis, B., & Batstone, D. J. (2014). Regulation mechanisms in mixed and pure culture microbial fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 111(11), 2139-2154.
- Horn, M. A., Ihssen, J., Matthies, C., Schramm, A., Acker, G., & Drake, H. L. (2005). *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N<sub>2</sub>O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(3), 1255-1265.
- Jiang, Y., May, H. D., Lu, L., Liang, P., Huang, X., & Ren, Z. J. (2019). Carbon dioxide and organic waste valorization by microbial electrosynthesis and electro-fermentation. *Water research*, 149, 42-55.
- Jourdin, L., Freguia, S., Flexer, V., & Keller, J. (2016). Bringing high-rate, CO<sub>2</sub>-based microbial electrosynthesis closer to practical implementation through improved electrode design and operating conditions. *Environmental science & technology*, 50(4), 1982-1989.
- Kiely, P. D., Regan, J. M., & Logan, B. E. (2011). The electric picnic: synergistic requirements for exoelectrogenic microbial communities. *Current opinion in biotechnology*, 22(3), 378-385.

- Kim, N. K., Oh, S., & Liu, W. T. (2016). Enrichment and characterization of microbial consortia degrading soluble microbial products discharged from anaerobic methanogenic bioreactors. *Water research*, 90, 395-404.
- Kouzuma, A., Kato, S., & Watanabe, K. (2015). Microbial interspecies interactions: recent findings in syntrophic consortia. *Frontiers in microbiology*, 6, 477.
- Kumar, P., Chandrasekhar, K., Kumari, A., Sathiyamoorthi, E., & Kim, B. S. (2018). Electro-fermentation in aid of bioenergy and biopolymers. *Energies*, 11(2), 343.
- Jabari, L., Gannoun, H., Cayol, J. L., Hedi, A., Sakamoto, M., Falsen, E., ... & Fardeau, M. L. (2012). *Macelibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(10), 2522-2527.
- Lee, H., Salerno, M.B., and Rittmann, B.E. (2008) Thermodynamic evaluation on H<sub>2</sub> production in glucose fermentation. *Environ Sci Technol* 42: 2401–2407.
- Liu, Z., Zhang, C., Lu, Y., Wu, X., Wang, L., Wang, L., ... & Xing, X. H. (2013). States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technology. *Bioresource technology*, 135, 292-303.
- Lominadze, G. S. (1940). Electrofermentation of tea. *Electrofermentation of tea.*, (8).
- Lovley, D. R., & Walker, D. (2019). Geobacter protein nanowires. *Frontiers in microbiology*, 10, 2078.
- Luo, J., Yang, J., He, H., Jin, T., Zhou, L., Wang, M., & Zhou, M. (2013). A new electrochemically active bacterium phylogenetically related to *Tolumonas osonensis* and power performance in MFCs. *Bioresource technology*, 139, 141-148.
- Matias, P. M., Pereira, I. A., Soares, C. M., & Carrondo, M. A. (2005). Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Progress in biophysics and molecular biology*, 89(3), 292-329.
- Matturro, B., Cruz Viggli, C., Aulenta, F., & Rossetti, S. (2017). Cable bacteria and the bioelectrochemical snorkel: the natural and engineered facets playing a role in hydrocarbons degradation in marine sediments. *Frontiers in Microbiology*, 8, 952.
- Miceli III, J. F., Parameswaran, P., Kang, D. W., Krajmalnik-Brown, R., & Torres, C. I. (2012). Enrichment and analysis of anode-respiring bacteria from diverse anaerobic inocula. *Environmental science & technology*, 46(18), 10349-10355.



- Minnan, L., Jinli, H., Xiaobin, W., Huijuan, X., Jinzao, C., Chuannan, L., ... & Liangshu, X. (2005). Isolation and characterization of a high H<sub>2</sub>-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring. *Research in microbiology*, 156(1), 76-81.
- Mohan, S. V., Velvizhi, G., Krishna, K. V., & Babu, M. L. (2014). Microbial catalyzed electrochemical systems: a bio-factory with multi-facet applications. *Bioresource technology*, 165, 355-364.
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., & Bernet, N. (2016). Electro-fermentation: how to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends in biotechnology*, 34(11), 856-865.
- Moscoviz, R., De Fouchécour, F., Santa-Catalina, G., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Cooperative growth of *Geobacter sulfurreducens* and *Clostridium pasteurianum* with subsequent metabolic shift in glycerol fermentation. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- Moscoviz, R., Trably, E., & Bernet, N. (2018). Electro-fermentation triggering population selection in mixed-culture glycerol fermentation. *Microbial biotechnology*, 11(1), 74-83.
- Mostafazadeh, A. K., Drogui, P., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Le Bihan, Y., Buelna, G., & Rasolomanana, S. D. (2016). Enhancement of biobutanol production by electromicrobial glucose conversion in a dual chamber fermentation cell using *C. pasteurianum*. *Energy conversion and management*, 130, 165-175.
- Nakashimada, Y., Rachman, M.A., Kakizono, T., and Nishio, N. (2002) Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *Int J Hydrogen Energy* 27: 1399–1405
- Nevin, K. P., Hensley, S. A., Franks, A. E., Summers, Z. M., Ou, J., Woodard, T. L., ... & Lovley, D. R. (2011). Electrosynthesis of organic compounds from carbon dioxide is catalyzed by a diversity of acetogenic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(9), 2882-2886.
- Nikhil, G. N., Subhash, G. V., Yeruva, D. K., & Mohan, S. V. (2015). Synergistic yield of dual energy forms through biocatalyzed electrofermentation of waste: stoichiometric analysis of electron and carbon distribution. *Energy*, 88, 281-291.
- Nishio, K., Kimoto, Y., Song, J., Konno, T., Ishihara, K., Kato, S., ... & Nakanishi, S. (2014). Extracellular electron transfer enhances polyhydroxybutyrate productivity in *Ralstonia eutropha*. *Environmental Science & Technology Letters*, 1(1), 40-43.
- Nobu, M. (2013). Metagenomic characterization of *Candidatus Defluviicoccus tetraformis* TFO71, a tetrad-forming organism, predominant in an anaerobic-aerobic membrane bioreactor with deteriorated biological phosphorus removal.

- Oh, Y. K., Park, M. S., Seol, E. H., Lee, S. J., & Park, S. (2003). Isolation of hydrogen-producing bacteria from granular sludge of an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(1), 54-57
- Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., and Trably, E. (2017) Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Appl Energy* 198: 77–87
- Palomo-Briones, R., Trably, E., López-Lozano, N. E., Celis, L. B., Méndez-Acosta, H. O., Bernet, N., & Razo-Flores, E. (2018). Hydrogen metabolic patterns driven by *Clostridium-Streptococcus* community shifts in a continuous stirred tank reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(5), 2465-2475.
- Peguín, S., & Soucaille, P. (1996). Modulation of metabolism of *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture in a three-electrode potentiostatic system with methyl viologen as electron carrier. *Biotechnology and bioengineering*, 51(3), 342-348.
- Pham, C. A., Jung, S. J., Phung, N. T., Lee, J., Chang, I. S., Kim, B. H., ... & Chun, J. (2003). A novel electrochemically active and Fe (III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiology Letters*, 223(1), 129-134
- Pierra, M., Carmona-Martínez, A. A., Trably, E., Godon, J. J., & Bernet, N. (2015). Microbial characterization of anode-respiring bacteria within biofilms developed from cultures previously enriched in dissimilatory metal-reducing bacteria. *Bioresource technology*, 195, 283-287.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B., Marsic, D., Whitman, W. B., Lupa, B., Tang, J., & Krader, P. (2009). *Proteocatella sphenisci* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant, spore-forming anaerobe isolated from penguin guano. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(9), 2302-2307.
- Poehlein, A., Yutin, N., Daniel, R., & Galperin, M. Y. (2017). Proposal for the reclassification of obligately purine-fermenting bacteria *Clostridium acidurici* (Barker 1938) and *Clostridium purinilyticum* (Dürre et al. 1981) as *Gottschalkia acidurici* gen. nov. comb. nov. and *Gottschalkia purinilytica* comb. nov. and of *Eubacterium angustum* (Beuscher and Andreesen 1985) as *Andreesenia angusta* gen. nov. comb. nov. in the family *Gottschalkiaceae* fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2711.
- Rabaey, K., & Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis—revisiting the electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 706-716.
- Rabelo, C. A. B. S., Okino, C. H., Sakamoto, I. K., & Varesche, M. B. A. (2020). Isolation of *Paraclostridium* CR4 from sugarcane bagasse and its evaluation in the bioconversion of lignocellulosic feedstock into hydrogen by monitoring cellulase gene expression. *Science of The Total Environment*, 715, 136868.

- Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., ... & Steyer, J. P. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International journal of hydrogen energy*, 38(12), 4975-4985.
- Rago, L., Baeza, J. A., & Guisasola, A. (2016). Increased performance of hydrogen production in microbial electrolysis cells under alkaline conditions. *Bioelectrochemistry*, 109, 57-62.
- Schievano, A., Sciarria, T. P., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J., ... & Pant, D. (2016). Electro-fermentation—merging electrochemistry with fermentation in industrial applications. *Trends in biotechnology*, 34(11), 866-878.
- Schink, B., & Bomar, M. (1992). The genera *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Acetoanaerobium* and *Acetitomaculum*. *The Prokaryotes*, 1923-1936.
- 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.
- Speers, A. M., Young, J. M., & Reguera, G. (2014). Fermentation of glycerol into ethanol in a microbial electrolysis cell driven by a customized consortium. *Environmental science & technology*, 48(11), 6350-6358.
- Sravan, J. S., Butti, S. K., Sarkar, O., Krishna, K. V., & Mohan, S. V. (2018). Electrofermentation of food waste—Regulating acidogenesis towards enhanced volatile fatty acids production. *Chemical Engineering Journal*, 334, 1709-1718.
- Sturm-Richter, K., Golitsch, F., Sturm, G., Kipf, E., Dittrich, A., Beblawy, S., ... & Gescher, J. (2015). Unbalanced fermentation of glycerol in *Escherichia coli* via heterologous production of an electron transport chain and electrode interaction in microbial electrochemical cells. *Bioresource technology*, 186, 89-96.
- Tang, I. C., Okos, M. R., & Yang, S. T. (1989). Effects of pH and acetic acid on homoacetic fermentation of lactate by *Clostridium formicoaceticum*. *Biotechnology and bioengineering*, 34(8), 1063-1074.
- Thrash, J. C., & Coates, J. D. (2008). Direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism. *Environmental science & technology*, 42(11), 3921-3931.
- Toledo-Alarcón J. (2020). Bio-hidrógeno: Contexto y alternativas de producción biológica. Presentación realizada en el marco de Ciclo de Seminarios Online "Alternativas biológicas para la producción de Hidrógeno" titulado de la Escuela de Ingeniería Bioquímica, PUCV, Chile, 4 de noviembre.

- Toledo-Alarcón, J., Moscoviz, R., Trably, E., & Bernet, N. (2019). Glucose electro-fermentation as main driver for efficient H<sub>2</sub>-producing bacteria selection in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(4), 2230-2238.
- Torres-Rojas, F., Muñoz, D., Tapia, N., Canales, C., & Vargas, I. T. (2020). Bioelectrochemical chlorate reduction by *Dechloromonas agitata* CKB. *Bioresource Technology*, 315, 123818.
- Vassilev, I., Gießelmann, G., Schwechheimer, S. K., Wittmann, C., Viridis, B., & Krömer, J. O. (2018). Anodic electro-fermentation: Anaerobic production of L-Lysine by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and bioengineering*, 115(6), 1499-1508.
- Wietzke, M. and Bahl, H. (2012) The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 96: 749–761.
- Xu, D., Liu, S., Chen, Q., & Ni, J. (2017). Microbial community compositions in different functional zones of Carrousel oxidation ditch system for domestic wastewater treatment. *Amb Express*, 7(1), 40.
- Yan, B. H., Selvam, A., Xu, S. Y., & Wong, J. W. (2014). A novel way to utilize hydrogen and carbon dioxide in acidogenic reactor through homoacetogenesis. *Bioresource technology*, 159, 249-257
- Yang, G., & Wang, J. (2019). Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(47), 25542-25550.
- Yin, Q., Miao, J., Li, B., & Wu, G. (2017). Enhancing electron transfer by ferroferric oxide during the anaerobic treatment of synthetic wastewater with mixed organic carbon. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 104-110.
- Zhang, C., Liu, X., & Dong, X. (2004). *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(3), 969-973.
- Zhang, K., Song, L., & Dong, X. (2010). *Proteiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic proteolytic bacterium isolated from yak rumen. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(9), 2221-2225.
- Zhang, J., Zhang, Y., Liu, B., Dai, Y., Quan, X., & Chen, S. (2014). A direct approach for enhancing the performance of a microbial electrolysis cell (MEC) combined anaerobic reactor by dosing ferric iron: enrichment and isolation of Fe (III) reducing bacteria. *Chemical Engineering Journal*, 248, 223-229.
- Zeng, A.-P., and Sabra, W. (2011) Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses. *Curr Opin Biotechnol* 22: 749–757.

## Capítulo 5

## *Discusión general*

### *1. El H<sub>2</sub> en el marco de las biorefinerías*

El mundo está atravesando una nueva ola de urbanización, especialmente en los países en desarrollo emergentes. Esto genera múltiples impactos sobre los recursos naturales y el medio ambiente. La infraestructura metropolitana, como interfaz entre el consumo humano y los recursos naturales y medio ambiente, plantea varios desafíos y oportunidades para la gestión sostenible de los recursos a escala urbana (Clark y Deswarte, 2008). Las preocupaciones sobre la dependencia de los combustibles fósiles junto con los crecientes niveles de dióxido de carbono CO<sub>2</sub> en la atmósfera han llevado a un impulso global por la búsqueda de tecnologías renovables y amigables con el medio ambiente. Los procesos convencionales de producción de energía son la causa de cambios climáticos irreversibles, calentamiento global y agotamiento más rápido de los recursos naturales (Ni et al., 2006).

En este contexto, la biorefinería ha surgido como una alternativa potencial donde la biomasa de materia prima, que no sea alimento, y desechos o subproductos de la producción se utilizan para obtener una gama de productos, como biocombustibles, bioquímicos industriales y biomateriales, incluidos biopolímeros de importancia comercial. (Clark y Deswarte, 2015; Mohan, 2014). Conceptos como la 'biorefinería' aspiran hacia tecnologías cada vez más integradas (Aresta et al., 2012). Los residuos, como sustancia objetivo principal en la biorefinería, se manifiesta en una amplia gama de oportunidades por intereses mercantiles más que por razones utilitarias. Por otro lado, crear un esquema categórico para describir las tecnologías para la valorización de residuos es inmensamente difícil (Zondervan et al., 2011). Hay varios modelos donde aplica las biorefinerías, entre ellos se encuentran la fermentación oscura, la obtención de ácidos carboxílicos, el uso de microorganismos autótrofos, el uso de sistemas bioelectroquímicos, entre otros.

En particular, la fermentación oscura, cuyo estudio son parte de los objetivos de esta tesis, los compuestos orgánicos se oxidan convirtiéndose en varios productos biológicos como H<sub>2</sub>, AGV y otros subproductos traza (Sarkar et al., 2016). En esta tesis nos enfocamos en el H<sub>2</sub> y pudimos ver que una selección apropiada del inóculo influye significativamente en la eficiencia del proceso acidógeno y la degradación del sustrato hacia la producción de esta molécula (Kapdan y Kargi, 2006). Generalmente se prefieren los consorcios mixtos como biocatalizador debido a su bajo costo, requisitos de condiciones no estériles, estabilidad operativa y flexibilidad en diversos sustratos, diversas funciones bioquímicas, facilidad de control de procesos y escalado

(Nikhil et al., 2014). En estos consorcios mixtos nos enfocamos en estudiar los microorganismos presentes en este proceso.

## *2. Situación actual de la producción de H<sub>2</sub> y nuestros aportes*

Dada la crisis energética y la intensa explotación de los recursos naturales en el mundo se hace necesaria la intensificación de la búsqueda de nuevas alternativas más respetuosas con el medio ambiente. Los procesos convencionales de producción de energía son la causa de cambios climáticos irreversibles, calentamiento global y agotamiento más rápido de los recursos naturales (Ni et al. 2006). Asimismo el efecto invernadero es una consecuencia de la emisión de CO<sub>2</sub> por el uso de combustibles fósiles (Budzianowski, 2011; Kozłowski et al., 2019).

Para que un proceso pueda ser sostenible se requiere que sea ambientalmente, económicamente y socialmente sustentable. La valorización de residuos industriales y la producción de energías limpias como el H<sub>2</sub> mediante la fermentación biológica es una opción atractiva. El H<sub>2</sub> tiene el contenido de energía más alto por unidad de peso de cualquier combustible conocido. Sin embargo aún quedan muchos desafíos por resolver. Es una contradicción ambiental que un combustible limpio se genere a partir de fuentes contaminantes y limitadas en condiciones de presión de alta temperatura, que emite importantes GEI (Ewan y Allen, 2005).

La producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura se considera la más aplicable en la práctica debido a que no requiere energía externa y su tasa de producción de H<sub>2</sub> es mucho más rápida que otros procesos. Además, cuando se combina con el tratamiento de residuos, puede resolver dos problemas simultáneamente: la reducción de la carga ambiental y la producción de energía limpia. Los desechos de alimentos como el suero de queso, al tener un alto contenido de carbohidratos, y ser fácilmente hidrolizables por naturaleza, exhiben un mayor potencial de producción de H<sub>2</sub> en comparación con otros desechos orgánicos. Además, tomando en cuenta el uso de residuos la reacción social no sería negativa como en el caso del uso de alimentos para producir biocombustibles (Yun et al., 2018)

Sin embargo, desde el punto de vista ingenieril y económico, aún existen dudas sobre si este proceso está listo para ser aplicado en la práctica (Yun et al., 2018).

Este proceso sigue presentando inestabilidades. Dentro de las limitaciones del H<sub>2</sub> están los bajos rendimientos en la producción de este biogás. Si bien se pueden generar 4 moles de H<sub>2</sub> a partir de 1 mol de glucosa, el rendimiento real de H<sub>2</sub> es inferior al 50% del máximo teórico. Esto se le atribuye a la limitación termodinámica, la existencia de microorganismos no productores de H<sub>2</sub> y las reacciones de consumo de H<sub>2</sub> acetogénico (Lalman et al., 2013). En el caso de los residuos, como el suero de queso, el otro problema asociado con un bajo rendimiento de H<sub>2</sub> es el suministro continuo de otros

microorganismos no productores de H<sub>2</sub>, en particular las LAB que están presentes en el suero de queso. Como se menciona en el capítulo 2, pudimos confirmar la presencia de LAB mediante el aislamiento y la secuenciación masiva.

Los métodos aplicados en esta investigación tuvieron éxito en la recuperación de los microorganismos objetivo. Entre estos, el método de aislamiento mediante siembra directa en placa mostró una mayor cobertura en comparación con los otros métodos de aislamiento. Las cepas clasificadas dentro del género *Clostridium* se aislaron mediante un tratamiento térmico previo de la muestra o mediante aislamiento directo en placas anaeróbicas. Esto confirma el efecto del tratamiento térmico que favorece el crecimiento de microorganismos formadores de esporas que eliminan otros microorganismos competidores.

También se determinó el rendimiento de H<sub>2</sub> en los cultivos puros y se postuló su posible papel en los reactores productores de hidrógeno. El aplicar varias técnicas de aislamiento nos permitió elaborar un esquema de trabajo para aislar la mayoría de los microorganismos detectados por análisis de pirosecuenciación. Este trabajo revela la importancia de realizar aislamientos para el estudio de la fisiología y el rol de los microorganismos presentes en el reactor. La interacción de aislados representativos con diferentes características fisiológicas se probó utilizando cocultivos.

### *2.1 Rol de las bacterias ácido lácticas en la producción de H<sub>2</sub>, aportes de esta Tesis*

En particular, los estudios de cocultivo confirmaron el efecto inhibitorio de las LAB en la producción de H<sub>2</sub> por organismos del género *Clostridium*. Además, se pudo confirmar el papel clave de *Megasphaera* para la eliminación del ácido láctico producido por LAB favoreciendo el crecimiento de *Clostridium* y la producción de H<sub>2</sub> por parte de este. Este efecto había sido observado durante la operación de los reactores con suero de queso en los cuales no se detectó la producción de láctico aunque se detectó la presencia de bacterias lácticas (Castelló et al., 2009).

Pudimos encontrar el rol fisiológico de los microorganismos observados en las muestras del reactor. La inclusión de *Megasphaera* en un consorcio microbiano podría evitar parcialmente la inhibición de *Clostridium* por bacterias del ácido láctico. Asimismo, estos aislamientos podrían usarse más para diseñar consorcios artificiales para mejorar la producción de hidrógeno.

### *2.2 El efecto de la homoacetogénesis, su importancia y los aportes de esta Tesis*

Por otro lado, se pudo estudiar la inestabilidad provocada por los microorganismos homoacetogénicos. Como se menciona en el artículo 2 del capítulo 2 se abordaron varias estrategias para el estudio de la homoacetogénesis en reactores de productor de hidrógeno. Se observó que el sustrato utilizado y las condiciones de operación influyen en la comunidad microbiana. La



secuenciación masiva reveló que la diversidad de homoacetógenos fue bastante baja en todas las muestras investigadas con predominancia de *Acetobacterium woodii* en el sistema alimentado con glucosa. Los sistemas alimentados con suero de queso en polvo dieron como resultado la codominancia de *Blautia coccooides* y especies no clasificadas dentro de *Sporoanaerobacter*. En sistemas alimentados con glicerol *Eubacterium limosum* y *Selenomonas* sp. eran dominantes. Este estudio refleja un trabajo interdisciplinario de colaboración entre varios laboratorios de varios países en la búsqueda de explicaciones y mejoras en la producción de H<sub>2</sub>.

### 3. Situación actual de la fermentación oscura

En relación a la situación actual de la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura se pueden desarrollar otros enfoques para que este proceso sea más sustentable. Desde el punto de vista económico aunque el H<sub>2</sub> se derivaría de materiales de desecho a través de una ruta respetuosa con el medio ambiente, todavía existe la preocupación de si la fermentación oscura es económicamente viable o no. Se estima que el costo de su producción es aún más alto que el precio de venta actual de H<sub>2</sub> (0.5-3.2 USD/ kg<sub>H2</sub>) (Bartels et al., 2010), lo que indica que la viabilidad económica de la producción de H<sub>2</sub> a partir de residuos por fermentación oscura es aún cuestionable.

Se han abordado varias estrategias para la disminución de los costos enfocadas en: 1) mejora de la producción de H<sub>2</sub> mediante sistemas bioelectroquímicos, 2) la producción de mezcla H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, 3) hacer uso de los subproductos (AGV) generados, o 4) enfoque en la obtención de AGV de interés industrial por fermentación oscura. Además, el conocer los procesos de obtención de H<sub>2</sub> nos permite elaborar estrategias tanto para favorecerlo como para evitarla con el fin de obtener otros subproductos. Tal es el caso de la homoacetogénesis. El estudio de este proceso (Capítulo 2.2) permitió conocerlo aún más para elaborar estrategias sea para inhibirlo (y mejorar la producción de H<sub>2</sub>) o favorecerlo (para obtener acetato a partir de CO<sub>2</sub> mediante la captura de CO<sub>2</sub>).

#### 3.1 Enfoque en la mejora de producción de H<sub>2</sub> mediante sistemas bioelectroquímicos

##### 3.1.1 Electrofermentación, aportes de esta Tesis

El aumento del rendimiento de H<sub>2</sub> de la fermentación oscura sigue siendo uno de los principales desafíos para la producción de H<sub>2</sub> a gran escala. La fermentación oscura es el resultado de la oxidación parcial de sustratos orgánicos, y más de dos tercios del contenido de carbono y H<sub>2</sub> se convierte en subproductos metabólicos microbianos. En los últimos años, los sistemas electroquímicos microbianos han atraído una atención significativa debido a su potencial aplicación (Mohan et al., 2014).

La integración de la fermentación oscura combinado con sistemas electroquímicos microbianos denominado electrofermentación (EF) toma las características ventajosas de ambos procesos con la capacidad de dirigir el metabolismo hacia la producción selectiva (Sravan et al., 2018). Los ensayos de EF a partir de glucosa como sustrato (Capítulo 4) dieron lugar a diversos productos metabólicos de alto valor comercial. Por otro lado, el uso de desechos de alimentos como sustrato permitiría la remediación de desechos (Sravan et al., 2018). Los estudios de EF son muy recientes aún, hasta la fecha, solo unos pocos estudios se ocuparon de la producción de H<sub>2</sub>. Es fundamental la presencia de microorganismos fermentadores y electroactivos en este proceso. (Toledo-Alarcón et al., 2019; Toledo-Alarcón et al., 2020).

Como se menciona en el capítulo 4 de la tesis, una de las estrategias es enriquecer los consorcios microbianos, usualmente utilizados para la fermentación oscura, con microorganismos electroactivos. Los se realizaron enriquecimientos en medio anaerobio con Fe (III). Los estudios nos permitieron confirmar que los enriquecimientos fueron efectivos para la selección de microorganismos electroactivos y fermentadores. Si bien los enriquecimientos fueron útiles para lograr mayores rendimientos en la EF, se requieren más estudios para mejorar la estabilidad en el proceso. Pudimos confirmar que la EF con un inóculo especializado permite obtener mayor producción de H<sub>2</sub>. La EF es una herramienta con gran potencial que permite controlar los procesos biológicos. Sin embargo, los mecanismos involucrados, especialmente cuando se trabaja con cultivos mixtos, no están completamente determinados. En este contexto, se necesita más investigación, tal vez realizando aislamientos y ensayos en cultivos puros probando diferentes parámetros operativos con el fin de elucidar los mecanismos de la electrofermentación con cultivos puros y ampliar el conocimiento de la electrofermentación con cultivos mixtos.

### 3.1.2 Celdas de electrosíntesis microbiana (MEC)

En estas celdas la oxidación del sustrato se combina con la corriente eléctrica como fuerza impulsora, que los microorganismos electroactivos utilizan para la adición de voltaje para permitir la producción de H<sub>2</sub> u otras reacciones biológicas/químicas energéticamente desfavorables en el cátodo (Mozcoviz et al., 2016). La electrosíntesis microbiana se ha estudiado a escala de laboratorio en varios grupos durante los últimos años. Uno de los principales desafíos actuales para los MEC es la ampliación. En este dominio, se requiere más investigación, ya que la mayoría de los estudios realizados hasta ahora, que lograron la producción de H<sub>2</sub>, trataron con reactores a escala de laboratorio (*bench-scale*) que proporcionaron información útil sobre el funcionamiento de la tecnología MEC pero no permiten ninguna predicción sobre su éxito a nivel mundial. A escala industrial hasta ahora, solo Cusick et al. (2011) han intentado ampliar los MEC a escala piloto para la producción de H<sub>2</sub> a partir de residuos de la industria alimentaria. Los

autores desarrollaron un sistema MEC para el tratamiento de aguas residuales de bodegas con una capacidad máxima de 1 m<sup>3</sup>. Aunque se logró una remoción de DQO soluble de 62 ± 20%, la mayor parte del biogás producido fue CH<sub>4</sub> y no se recuperó H<sub>2</sub>. La contaminación por CH<sub>4</sub> se ha informado a menudo como la principal causa de falla del proceso en el tratamiento de sustratos complejos con MEC (Lalauette et al., 2009).

### *3.2 Producción de Hytano*

Dentro de los modelos de biorefinerías, otro enfoque para aumentar la recuperación de bioenergía y mejorar la remoción de la materia orgánica es utilizar los ácidos orgánicos restantes mediante la metanogénesis para producir CH<sub>4</sub>. El H<sub>2</sub> y el CH<sub>4</sub> producidos a través de un proceso separado de dos etapas conduce a una posible solución de alto valor para la valorización de la biomasa residual (Mohan et al., 2008). La mezcla de CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub> se conoce como "hythane" (hytano), que puede tener una composición de 46 a 57% de H<sub>2</sub>, 43 a 54% de CH<sub>4</sub> y 0,4% de CO<sub>2</sub>. Una mezcla adecuada de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> puede tener un impacto en la transición de la sociedad dependiente de los combustibles fósiles. La cocombustión de la mezcla de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> podría reducir las emisiones de óxidos de nitrógeno en comparación con la combustión de CH<sub>4</sub> solo (Pasupuleti y Mohan, 2015). Se ha estudiado el rendimiento de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> en escala piloto del sistema de fermentación de dos etapas obteniéndose 290 mL<sub>H<sub>2</sub></sub> /gVS y 240 mL<sub>CH<sub>4</sub></sub> /gVS, respectivamente, mientras que la eliminación de DQO de la eficiencia del proceso fue del 95% (Han et al., 2005). Chu et al (2008) demostraron también que un proceso de dos etapas escalonado por temperatura para la producción de H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> era más eficiente. Los rendimientos en la producción de H<sub>2</sub> termófilo y la producción de CH<sub>4</sub> mesófilo fueron 205 mL<sub>H<sub>2</sub></sub>/gVS y 464 mL<sub>CH<sub>4</sub></sub>/gVS, respectivamente, mientras que la eficiencia de remoción de DQO alcanzó el 93%. Una ventaja adicional de un sistema de fermentación secuencial de CH<sub>4</sub> es que el efluente metanogénico se puede utilizar como agua de dilución en la fermentación de H<sub>2</sub>.

En otro estudio reciente se operó un reactor de dos etapas a escala piloto en condiciones termófilas (55 °C) para la producción de hytano a partir del efluente de la planta de aceite de palma. Se logró una tasa de producción de hytano de 1,93 L/L/d que contenía 11% de H<sub>2</sub> y 52% de CH<sub>4</sub>. La relación H<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> fue de 0,13 a 0,18, siendo adecuado para combustible de vehículos. El hytano podría ser un biocombustible limpio con alto potencial ya que contiene una relación H<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub> flexible y controlable (Seengenyong et al., 2019).

### *3.3 Utilización de los AGV generados durante la fermentación oscura*

### 3.3.1 Celdas de combustible microbianas, aportes de esta Tesis

En nuestro laboratorio se ha estudiado la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura utilizando suero de queso crudo como sustrato. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esta opción presenta algunas limitaciones como fuertes variaciones en los rendimientos de H<sub>2</sub> y la degradación incompleta de la materia orgánica que queda como ácidos grasos volátiles. Dentro de los sistemas bioelectroquímicos, las pilas de combustible microbianas (MFC) surgen como una nueva alternativa para la recuperación de energía durante el tratamiento de aguas residuales. El uso de MFC sería una forma de complementar la producción de energía luego de la producción de H<sub>2</sub> (El Mekawy et al., 2015). En el capítulo 3.1 se mostró que las MFC son una tecnología atractiva como un proceso de segunda etapa para obtener energía extra a partir del efluente generado durante el tratamiento del suero de queso crudo mediante el proceso de fermentación oscura.

En una MFC, el desarrollo de un biofilm en la superficie del ánodo es esencial para obtener una producción de corriente eficiente. En nuestro trabajo reportamos el análisis de las comunidades microbianas asociadas a los ánodos de MFCs alimentadas con suero de queso y efluente de suero de queso. Esto permitió explicar las diferencias en el comportamiento electroquímico las MFC. La secuenciación del amplicón del gen del ARNr 16S mostró que las poblaciones electroactivas potenciales (*Geobacter*, *Pseudomonas* y *Thauera*) se enriquecieron en ánodos de MFC alimentados con efluente del reactor, mientras que las poblaciones fermentativas (*Clostridium* y *Lactobacillus*) fueron predominantes en el ánodo de MFC alimentado directamente con suero de queso crudo. Este resultado se complementó con las técnicas de cultivo donde se aislaron microorganismos pertenecientes a 10 géneros diferentes incluyendo poblaciones electrogénicas conocidas como *Geobacter* (en MFC con efluente del reactor) y poblaciones fermentativas conocidas como *Lactobacillus* (en MFC con suero de queso) que nos permitió explicar la performance de cada celda.

#### 3.3.1.1 Aislamiento de microorganismos con potencial capacidad electroactiva

Se obtuvo un aislamiento (cepa NAR) que fue identificada como perteneciente al género *Raoultella*, se complementaron análisis bioquímicos y fisiológicos con estudios genómicos.

Los estudios genómicos permitieron confirmaron que la cepa NAR pertenece al género y especie *Raoultella ornithinolytica*. Además, la determinación del valor de ANI nos permitió concluir que hay cepas dentro de esta especie mal clasificadas y postular que tanto *R. ornithinolytica* y *R. planticola* pertenecen a la misma especie.

El conjunto de estudios fisiológicos y genómicos permitió confirmar el metabolismo fermentativo de la cepa. Se observó la producción de H<sub>2</sub> y etanol utilizando glicerol como sustrato, lo que sugiere una

importante aplicación de la cepa en la producción de biocombustibles utilizando residuos. Las pruebas electrogénicas revelaron una débil actividad electrogénica. Los estudios del genoma mostraron la presencia de varios genes candidatos involucrados en la electroactividad aportando al conocimiento del sistema. Es la primera cepa dentro de la especie en el cual se le asigna la capacidad electrogénica y la segunda dentro del género *Raoultella*.

Surgieron varias dificultades como el desafío de definir la electroactividad ya que no existe una definición fija ni un marcador genético ni un estándar (Koch y Harnisch, 2016). Doyle et al., 2018 agregaron el concepto de microorganismos electrogénicos débiles. Estos microorganismos podrían considerarse electroactivos en determinadas condiciones. Los electrogénicos débiles se asocian a microorganismos anaeróbicos facultativos con un metabolismo diverso, con una amplia capacidad metabólica a través de la interfaz anaeróbica-aeróbica y de pequeña corriente. La cepa NAR cumple con estas características, por lo que se podría sugerir considerarla como un electrogénica débil. Si bien el papel de los electrogénicos fuertes como *Geobacter* se ha explorado a fondo, aún no se ha evaluado la relevancia de los electrogénicos débiles (Doyle et al., 2018).

Por otro lado, está el desafío de mantener los aislamientos de microorganismos electroactivos para que no pierdan su capacidad. Las pruebas de electroactividad y las aplicaciones biotecnológicas posteriores dependen del mantenimiento de las cepas aisladas en sustratos solubles. Se ha reportado que las cepas electroactivas aisladas y mantenidas en sustratos solubles se adaptan a un metabolismo no selectivo al disminuir la expresión de ciertos genes. Los microorganismos electroactivos pueden perder sus capacidades cuando se cultivan en condiciones no específicas en el laboratorio (Yee et al., 2020). Esto puede haber contribuido a la baja electroactividad de la cepa NAR. Este hecho debería ser considerado para los futuros aislamientos.

Uno de los inconvenientes de las MFC es el costo de los materiales utilizados para construir los MFC. Los materiales de los electrodos van desde tela de carbón y papel de carbón hasta barras de grafito, placas. Los cátodos están hechos de los mismos materiales, pero también contienen metales preciosos, como platino, cuando se usa oxígeno como aceptor de electrones. Sin embargo, este tipo de electrodo no es sustentable económicamente y se han buscado otras alternativas más baratas incluyendo biocátodos. Además, algunos materiales no son adecuados para el escalado debido a su falta inherente de durabilidad o resistencia estructural (por ejemplo, papel carbón), o costo (por ejemplo, varillas de grafito). La ampliación del sistema también requerirá que el diseño y la aplicación de estos materiales se adapten a los enfoques de fabricación en masa. Sin embargo, se continúan realizando investigaciones a nivel mundial para contribuir conocimiento a esta tecnología para convertirla en una alternativa viable para la generación de energía renovable (Choi, 2015).

### *3.4 Obtención de AGV de interés industrial por fermentación oscura*

Las bacterias acidogénicas durante la fermentación oscura producen AGV de cadena corta como ácido acético (C2), ácido propiónico (C3), ácido butírico (C4) y ácido valérico (C5), etc. Estos ácidos carboxílicos de cadena corta se pueden utilizar ya que son sustratos para diversos compuestos orgánicos, incluidos alcoholes, bioplásticos, lípidos de microalgas, bioelectricidad, etc. Además, la adición de AGV ayuda a la eliminación biológica de nitrógeno y fósforo de las aguas residuales mediante nitrificación aeróbica seguida por desnitrificación anóxica. Todas estas aplicaciones muestran el potencial de los AGV para provocar una evolución en el campo de la bioenergía. La producción de AGV se puede considerar una estrategia eficaz para cerrar la brecha entre la recuperación de residuos y la recuperación del producto (Dahiya et al., 2015).

#### *3.4.1 Homoacetogénesis para la obtención de acetato y otros componentes de interés industrial*

El acetato se puede producir mediante la fermentación de polímeros orgánicos más complejos o mediante homoacetogénesis. Este último es uno de los procesos biológicos más primitivos y antiguos que facilita la formación de compuestos orgánicos. La importancia de este proceso radica en el origen de la tierra donde no existían compuestos orgánicos para sustentar la vida y la producción de acetato mediante la reducción del dióxido de carbono proporcionó suficiente potencial termodinámico para sustentar la vida quimiolitautotrófica inicial. El metabolismo de la homoacetogénesis se conoce desde hace años pero no se le ha dedicado muchos estudios al mismo. Las bacterias homoacetogénicas han recibido menos atención que las acidogénicas y metanógenos, especialmente en los estudios de producción de H<sub>2</sub> (Saady, 2013). En los últimos años, el interés industrial en la producción autótrofa de productos químicos a granel y biocombustibles ha aumentado intensamente. El uso de gases (CO, o CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>) como única fuente de energía y carbono tienen beneficios ecológicos y económicos. Contribuye (bajo ciertas condiciones) a la reducción del efecto invernadero atmosférico y la fermentación del gas es menos costosa, ya que los gases residuales industriales y el gas de síntesis sirven como sustratos. Sin embargo, las fermentaciones que utilizan sustratos gaseosos aún no han alcanzado escala comercial (Fast et al., 2015; Schiel-Bengelsdorf y Dürre, 2012).

Una estrategia utilizada para mejorar la producción de acetato es el uso de MEC para la mejorar la eficiencia de la homoacetogénesis. El ánodo sirve como aceptor terminal de electrones para la descarga de equivalentes microbianos reductores en exceso y el cátodo proporciona los equivalentes reductores requeridos para los procesos bioquímicos. El acetato es el compuesto intermedio básico

que se puede utilizar como sustrato para los diversos componentes básicos biológicos de la vida (Parameswaran et al., 2012). Estudios de prueba de MES fueron reportados donde se mostró la producción de acetato, butirato y formiato por la producción bioelectroquímica de *Sporomusa ovata*, *Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium aceticum* y *Moorella thermoacetica* a un potencial aplicado de -400 mV (SHE) (Nervin et al., 2010).

#### 4. Uso de otros modelos de biorefinería

##### 4.1 Microorganismos autótrofos

Dentro de los organismos fotótrofos se encuentran las algas y cianobacterias. Las algas subsisten en muchas formas, incluidas macro (algas marinas) y microalgas (algas, diatomeas, etc.), que convierten el CO<sub>2</sub> en compuestos orgánicos complejos a través del ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Venkata Mohan et al., 2016). Las cianobacterias son procariontas, con pigmentos fotosintéticos presentes en el citoplasma en lugar de orgánulos especializados como en eucariotas (plantas y algas). Estos organismos son capaces de fijar CO<sub>2</sub> y nitrógeno de la atmósfera a través de la nitrogenasa. La asimilación de CO<sub>2</sub> de las bacterias no solo se limita a los organismos fotosintéticos (por ejemplo, plantas, algas, cianobacterias), sino que también a bacterias que tienen vías específicas de fijación de carbono para la asimilación en la captura y utilización biológica de carbono. Entre las diferentes clases de bacterias, las beta-Proteobacteria tienen diferentes modos de nutrición (autótrofos, heterótrofos y mixotróficos) según los tipos de fuentes de carbono disponibles (Subhash et al. al., 2013). Estas bacterias también tienen la capacidad de almacenar carbono en forma de polihidroxialcanoatos (PHA), o más generalmente conocidos como bioplásticos. Los gránulos de PHA generalmente consisten en cadenas de poli (3-hidroxi butirato) (PHB) y poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV) (Subhash et al. al., 2013).

Las microalgas actúan como máquinas biosolares que incorporan mecanismos de captura de luz y secuestro de carbono y convierten estas entradas en biomoléculas/ metabolitos de alto valor en la biomasa. Las microalgas pueden crecer en varios modos nutricionales como sistemas autótrofos, mixotróficos y heterótrofos. La producción de biocombustibles a partir de microalgas fotosintéticas establece una extensa red de procesos altamente integrados. Aunque existe un desarrollo significativo en la producción de biocombustibles basados en microalgas, existen algunas limitaciones importantes como la deshidratación y la recolección de biomasa, que comparten tanto la energía como los procesos costosos. El concepto de biorefinería de microalgas se puede definir como un enfoque metódico que integra varios procesos para la

producción y conversión de biomasa de microalgas. La integración del concepto de biorefinería con el tratamiento de aguas residuales proporcionaría una utilización eficiente de la biomasa de algas reduciendo el componente de desechos residuales en general y favoreciendo la economía sostenible. La biomasa residual puede someterse a una variedad de procesos bioquímicos como fermentación y digestión anaeróbica para la recuperación de metano y H<sub>2</sub> (Chandra et al., 2014; Devi et al., 2013).

##### 5. Técnicas abordadas en estos estudios

En esta tesis se abordaron una amplia variedad de técnicas tanto dependientes como independientes de cultivo. Pudimos confirmar que ambas son complementarias para el estudio de comunidades microbianas lo cual nos permite conocer cómo funciona el proceso desde el punto de vista de la microbiología y elaborar estrategias para mejorar la eficiencia de los procesos.

Se desarrolló un esquema de trabajo para el aislamiento de los diferentes microorganismos que se encuentran comúnmente en los reactores productores de hidrógeno y se demostró su efectividad en detectar una alta proporción de los mecanismos presentes en la comunidad de acuerdo al análisis del gen del ARNr 16S.

Los aislamientos nos permitieron realizar estudios fisiológicos y podrían utilizarse para construir consorcios artificiales y estudiar el papel fisiológico de los diferentes microorganismos en los reactores. Una estrategia podría ser el tratamiento de suero de queso con un consorcio artificial de *Clostridium* y *Megasphaera* que contra resta el rol inhibitorio de las bacterias lácticas que tiene el suero de queso.

En cuanto a los estudios de homoacetogénesis se aplicaron dos técnicas independientes de cultivo que también son complementarias entre sí. El uso de secuenciación masiva enfocada en un gen funcional es una técnica novedosa de puesta a punto en nuestro laboratorio, con esta metodología solo hay un estudio en un reactor anaerobio (Singh et al., 2020).

Las técnicas de qPCR enfocada en el gen *fthfs* y *hydA* nos permitió observar las dinámicas de los grupos de microorganismos homoacetogénicos y productores de H<sub>2</sub> y la secuenciación masiva nos permitió conocer cuáles son los microorganismos homoacetogénicos presentes en los reactores (Cabezas et al., 2015). Tal vez unas de las perspectivas respecto a este último estudio sería poder responder que microorganismos están expresando el gen de *fthfs*. Esto lo podríamos hacer mediante la extracción de ARNm, la obtención de su cDNA realizar luego la secuenciación masiva y qPCR del gen *fthfs*.



En cuanto al aislamiento de la cepa NAR se abordaron estudios bioquímicos, fisiológicos, de electroactividad, complementado con el estudio bioinformáticos del genoma que nos permitió caracterizar esta cepa. Hay muy pocos trabajos que se enfocan en el aislamiento de cepas electrogénicas y en el conocimiento de sus mecanismos de electrogénesis.

## 6. Perspectivas

Los informes sobre estudios piloto y a gran escala sobre la fermentación oscura son bastante limitados. El tamaño los fermentadores han oscilado entre 0,15 y 0,5 m<sup>3</sup>, siendo mucho más pequeño que el tamaño práctico (Cavinato et al., 2012). La homogeneidad se puede garantizar con suficiente agitación en un fermentador a escala de laboratorio, lo que permite un control preciso del pH. Sin embargo, al aumentar la escala y en la implementación práctica, no está claro si el pH sería uniforme en todo el fermentador. Puede existir una zona muerta con agitación insuficiente y este fenómeno puede reducir la precisión del control del pH, lo que, a su vez, provoca una disminución en la producción de H<sub>2</sub> (Moon et al., 2015). Se han realizado numerosos trabajos sobre lodos de digestión anaeróbica, lodos de depuradora y lodos digeridos, pero hay poca información disponible sobre la fermentación oscura (Trchounian et al., 2015).

También se ha apostado a la modificación de microorganismos genéticamente sin embargo el uso de cultivos puros también supone un riesgo de contaminación. Aunque el rendimiento de H<sub>2</sub> es limitado la fermentación oscura podría utilizarse más para la obtención de AGV, incluidos acetato y butirato. Posteriormente estos AGV se pueden procesar a H<sub>2</sub> mediante el uso de MEC y fotofermentación.

En un estudio reciente se evaluó la producción de H<sub>2</sub> por *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 utilizando diferentes desechos y residuos orgánicos pasando de una escala de laboratorio a una escala piloto. Se examinaron diferentes desechos orgánicos como la melaza de caña, el efluente de destilería y las aguas residuales con almidón como posibles sustratos para la producción de H<sub>2</sub> por *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. La demostración a escala piloto mostró una mejora significativa en la producción de H<sub>2</sub> con recuperación de energía neta positiva. El estudio a escala piloto logró 76,2 m<sup>3</sup> de hidrógeno con una eliminación de DQO y una eficiencia de conversión de energía de 18,1 kgm<sup>-3</sup> y 37,9 %. Este estudio proporciona una estrategia extensa para pasar del laboratorio a la producción de H<sub>2</sub> a escala piloto, lo que brinda más oportunidades para la explotación comercial. Sin embargo el uso de cultivos puros tiene el riesgo de posible contaminación (Balachandar et al., 2020).

Por otro lado, se han realizado estudios extensos sobre el proceso combinando de la fermentación oscura y fotofermentación para lograr un alto rendimiento de H<sub>2</sub>. Kim y Kim (2013) fermentaron residuos de alimentos a lactato utilizando bacterias lácticas, y luego el sobrenadante de ese

fermentado fue convertido en H<sub>2</sub> por un organismo foto-fermentador. Se obtuvo un alto rendimiento de H<sub>2</sub> de 8,35 molH<sub>2</sub> /mol<sub>hexosa</sub> por fotofermentación.

Por lo tanto, la fermentación oscura se puede integrar con varias tecnologías para maximizar el valor de los subproductos de residuos. Otra estrategia es generar energía a partir de la parte sólida de la fermentación oscura mediante digestión anaeróbica convencional. La parte sólida generalmente representa del 30 al 50 % del contenido energético de la fermentación oscura y el CH<sub>4</sub> derivado se puede utilizar para la generación de calor y electricidad, o se puede suministrar directamente a hogares y vehículos (Kim et al., 2016). Esta producción de energía adicional también puede complementar el requisito de energía en el procesamiento de combustibles y productos químicos de la fermentación oscura.

Se han hecho intentos para aumentar aún más el rendimiento de H<sub>2</sub> y la recuperación de energía mediante el acoplamiento con MEC y fermentación de metano. Además hay varias rutas posibles en la fermentación oscura para el procesamiento de combustibles y químicos valiosos, que pueden maximizar el valor de los subproductos de los residuos.

#### *6.1 Integración de la fermentación oscura y MEC*

La integración de la fermentación oscura (fuente de carbono) y la aplicación de potencial externo utilizando celdas MEC podría ayudar a lograr una mayor recuperación de energía junto con el tratamiento completo de los desechos (Lee y Rittmann, 2009). En los sistemas bioelectroquímicos el biocatalizador desempeña un papel crucial en las reacciones bioquímicas impulsadas por electrodos que inducen la electrosíntesis microbiana mediante la utilización de una variedad de materias primas disponibles y renovables, como los desechos para la obtención de energía en forma de bioelectricidad y diversos productos de base biológica que son sustancias químicas de plataforma (etanol, acetato, propionato, butanol, polihidroxialcanoatos (PHA), etc) (Amulya et al., 2014; Modestra et al., 2015). Los AGV producidos tienen un alto valor de mercado que pueden comercializarse o usarse como sustratos en otras aplicaciones de bioprocesos como los procesos MEC y BES para generar un valor agregado más alto (Reddy et al., 2015). Esta forma de integrar diversas aguas residuales y bioproductos favorece la sostenibilidad y ayudará en la descarga cero hacia un enfoque de circuito cerrado que aborde la nueva área de investigación del nexo entre la electroquímica y la microbiología.

#### *6.2 Integración de la fermentación oscura con la foto fermentación*

El proceso de fermentación oscura con las condiciones optimizadas apenas alcanza el límite de 4 moles<sub>H<sub>2</sub></sub>/mol<sub>glucosa</sub>). Alternativamente, la foto-fermentación tiene la capacidad de producir 12

mol de H<sub>2</sub>/ mol de hexosa, lo que tampoco se ha logrado todavía. La combinación de estos dos procesos fermentativos tiene el potencial de aumentar los rendimientos generales de producción de H<sub>2</sub>. La integración de la fermentación oscuridad y la foto-fermentación se puede operar en una o dos etapas donde la posterior tiene ventaja sobre la anterior debido a los contratiempos como inhibición del sustrato, acceso limitado a la luz, condiciones de pH (Chandra y Mohan, 2014). Por tanto, se puede emplear un sistema híbrido de fermentación oscura y de fotofermentación para superar la inhibición de los ácidos grasos. Los bioreactores de dos etapas han ganado mucha atención recientemente debido a la utilización efectiva de los sustratos carbonosos y al menor gasto de energía para la producción de H<sub>2</sub> (Fakhimi et al., 2019). La integración no solo aumenta el rendimiento de la producción de H<sub>2</sub> por mol de sustrato, sino que también aborda el tema de la utilización óptima del sustrato. Por lo tanto, estos sistemas híbridos pueden ser una ruta prometedora sin embargo, debe explorarse. En la producción de H<sub>2</sub> fermentativo oscuro convencional, los productos cogenerados y el sustrato no utilizado no se reciclan después del proceso inicial que finalmente se expulsa del ciclo del proceso. Por lo tanto, se requiere del establecimiento de una biorefinería integrada que pueda enfrentar los desafíos actuales de la bioeconomía para producir compuestos de alto valor a la vez (Rai y Singh, 2016). En la figura 1 se resume un esquema de la integración de los procesos.

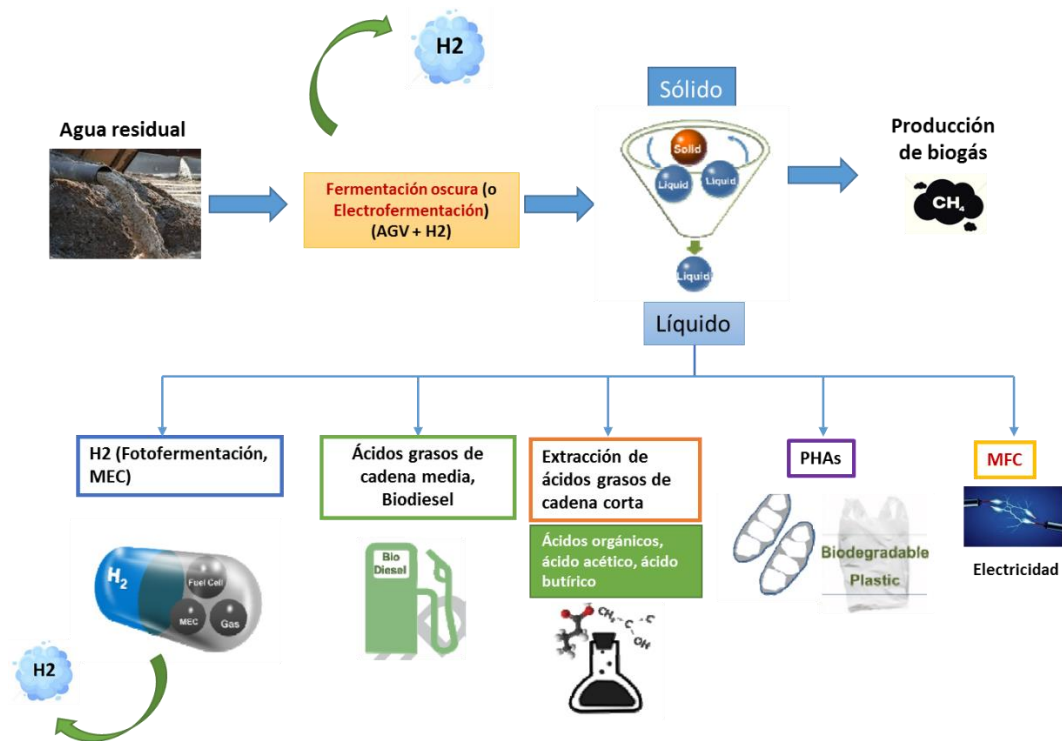


Figura 1. Sistema integrado de fermentación oscura de residuos industriales con proceso de conversión de efluentes en compuestos de interés industrial. En rojo se indican los procesos que fueron estudiados en esta tesis. Imagen extraída y modificada de Yun et al., 2020

### *6.3 Desafíos en la purificación, uso, almacenamiento y transporte de H<sub>2</sub>*

El H<sub>2</sub> como combustible se utiliza principalmente en pilas de combustible para la producción de energía. Las pilas de combustible de H<sub>2</sub> pueden ser la mejor fuente de combustible ya que tienen una alta eficiencia térmica. Sin embargo, la barrera más grande para la comercialización del combustible H<sub>2</sub> es el alto costo (de producción y fabricación) y otros aspectos técnicos diversos como la confiabilidad y la durabilidad (Wang et al., 2018).

Para utilizar bio-H<sub>2</sub> como combustible, la purificación, el almacenamiento y el transporte actúan como obstáculo principal. Como los procesos en la actualidad consumen mucha energía y son rentables, la purificación y el almacenamiento de H<sub>2</sub> sigue siendo un desafío. Estos son los principales desafíos que deben abordarse para la purificación y almacenamiento de bio-H<sub>2</sub> (Kazakov et al., 2016). Los métodos de purificación de H<sub>2</sub> generalmente utilizados, como la adsorción por cambio de presión, la destilación criogénica, etc., no son aplicables para la purificación de H<sub>2</sub> debido a los requisitos en la alimentación de gas (cerca de 75-90%), presiones y temperaturas de operación. Los métodos de separación óptimos deben tener en cuenta el volumen y la composición de la mezcla, la variación de la producción de gases con respecto al tiempo y la calidad del producto (Bakonyi et al., 2018). Además, el costo del almacenamiento de H<sub>2</sub> es muy caro, se necesitan metodologías de fabricación de bajo costo y alto volumen para un mejor almacenamiento. Para concluir, se requiere un código y un proceso operativo estandarizado particular para los sistemas de almacenamiento de H<sub>2</sub>. Las instalaciones centralizadas tienen menor costo de generación de H<sub>2</sub> y mayor transporte, mientras que el escenario es opuesto para las instalaciones descentralizadas (Dahiya et al., 2020).

### *6.4 Materiales de segunda generación*

Una forma eficaz de reducir el costo de producción de H<sub>2</sub> es la utilización de materias primas renovables y de bajo valor (Lay et al., 2012). La biomasa lignocelulósica es una fuente de energía neutra en carbono y la materia prima más disponible en la tierra para la producción de H<sub>2</sub> (Kumar et al., 2013). En general, la biomasa lignocelulósica se puede clasificar ampliamente en biomasa virgen, que incluye todas las plantas terrestres naturales como árboles, arbustos y pastos, biomasa residual de diversos sectores industriales como la agricultura y la silvicultura, y cultivos energéticos con alto rendimiento de biomasa lignocelulósica producida para servir como materia prima para la producción de biocombustible, los ejemplos incluyen la soja y el sorgo dulce. Sin embargo, la barrera para la producción de H<sub>2</sub> a partir de este material es que los azúcares polisacáridos están dentro de la lignocelulosa (Kumar et al., 2013) que es difícil de

degradar. La producción de H<sub>2</sub> a partir de biomasa lignocelulósica se ha considerado una tecnología emergente que tiene madurez a escala de laboratorio, mientras que, los resultados a escala piloto aún no están disponibles. Como resultado, para lograr la viabilidad de la producción de H<sub>2</sub> lignocelulósico se requiere más investigación para establecer un método de pretratamiento sin inhibidores respetuoso con el medio ambiente, desarrollar una tecnología de sacarificación efectiva y de bajo costo, estudiar nuevas especies de bacterias con capacidad de fermentación de H<sub>2</sub> sostenible a partir de biomasa lignocelulósica. De acuerdo con las características del material de biomasa lignocelulósica, las investigaciones deberían centrarse más en el establecimiento de reactores continuos con el fin de proporcionar resultados y experiencias mucho más valiosos que podrían facilitar la realización de tecnología comercial de producción de H<sub>2</sub> (Ren et al., 2016).

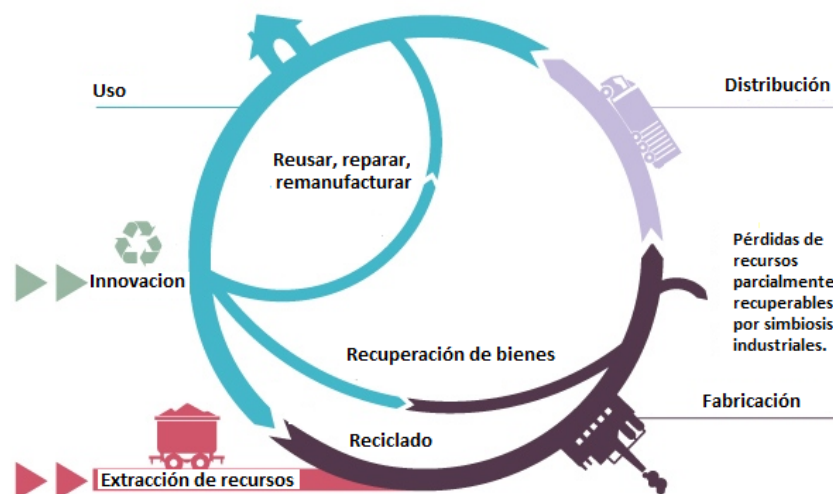
#### *6.5 Nuevas tecnologías para el estudio de las comunidades microbianas*

La producción de energía mediante los procesos microbianos estudiados en esta Tesis (fermentación oscura, EF y MFC) se basan en el desarrollo de consorcios microbianos enriquecidos en los microorganismos de interés. Los factores ambientales y operativos afectan la comunidad microbiana, y esto tiene repercusiones en el rendimiento del proceso. Hoy en día hay nuevos métodos moleculares de alto rendimiento (metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica, metabolómica) que están proporcionando conocimientos detallados sobre los microorganismos que gobiernan los sistemas de tratamiento de aguas residuales y sobre sus capacidades metabólicas. Esto permite tener secuencias de genomas de microorganismos no cultivables con funciones clave en los sistemas estudiados. Un ejemplo de esto es el microorganismo acumulador de polifosfato "Candidatus Accumulibacter phosphatis" o el oxidante de nitrito "Candidatus Nitrospira defluvii" que ahora están disponibles a través de estudios metagenómicos (Rodríguez et al., 2015). Los genomas de estos microorganismos fueron obtenidos de sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante técnicas metagenómicas. La aplicación de la metagenómica a los estudios de reactores de producción de H<sub>2</sub> permitiría caracterizar genéticamente los microorganismos presentes y proporcionar información sobre la fisiología de los microorganismos clave. Además, la metagenómica comparativa, en la que se comparan los tipos, la abundancia y la distribución de genes entre los metagenomas, permite comprender cómo las diferencias genómicas afectan y son afectadas por el entorno abiótico. La integración de datos metagenómicos de microorganismos con información metatranscriptómica proporciona una mejor comprensión de las respuestas microbianas a perturbaciones o variaciones ambientales ya que esta última permite ver que microorganismos se están expresando (Albertsen et al., 2012). Para conocer realmente qué funciones están llevando a cabo los miembros de la comunidad en condiciones específicas, se debe

analizar el metatranscriptoma o metaproteoma (ARNm total o proteína de todos los organismos presentes en un ecosistema biológico). La integración de datos puede permitir la creación de modelos de comportamiento predictivo en estos ecosistemas lo que podría ayudar a mejorar la explotación de los procesos microbianos (Rodríguez et al., 2015).

### 6.6 Biorefinería y economía circular

La biorefinería integra procesos y tecnologías de conversión de biomasa para producir combustibles, energía y productos químicos con valor agregado. Esto estará determinado por la naturaleza de: la materia prima de entrada; las tecnologías de proceso; las sustancias intermedias y los productos de salida que se requieren. Hay un interés renovado en la explotación de los desechos orgánicos impulsado por el objetivo de reducir la huella ecológica y lograr un suministro más seguro de recursos renovables. La aspiración a valorizar los desechos mediante el tratamiento tiene un interés económico (Mohan et al., 2016). Durante la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura, el 60-70 % del sustrato se canaliza a diferentes subproductos. Entre ellos, el etanol, el 1,3 propanodiol (PD) y el ácido butírico, subproductos que tienen una inmensa importancia comercial. Si se consideran la producción simultánea de H<sub>2</sub> y la recuperación de etanol, por cada mol de glucosa se podrían recuperar 1,58 mol<sub>H<sub>2</sub></sub> y adicionalmente, 0,90 mol<sub>etanol</sub>. Este rendimiento de etanol es equivalente a 0,23 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glucosa</sub>, que es casi la mitad de 0,41 g<sub>etanol</sub>/g<sub>glucosa</sub> producido por el proceso de producción de bioetanol convencional. Considerando el hecho de que el H<sub>2</sub> es el producto principal y el etanol recuperado de los residuos acidógenos no tiene un costo de producción directo. En otro aspecto, según una estimación de bioconversión de 1 kg de glicerol crudo, un residuo generado durante la producción de biodiesel puede producir 48,14 L<sub>H<sub>2</sub></sub> y 307,06 g<sub>PD</sub>. Considerando el valor actual de mercado de H<sub>2</sub> (\$ 7.75- \$ 11.50 m<sup>-3</sup>) y PD (\$ 2.43 kg<sup>-1</sup>- \$ 288 L<sup>-1</sup>), la cantidad de PD que podría recuperarse tiene importancia industrial. Mediante la bioconversión de 1 kg de glucosa, además de producir 326,44 L de hidrógeno, se pueden recuperar como subproducto 299,37 L de butirato con un precio a granel de hasta \$ 50 kg<sup>-1</sup> - \$ 74,6 L<sup>-1</sup> (Sarma et al., 2015). Alternativamente, estos subproductos pueden ser los precursores para la producción de varios otros productos que tienen interés comercial como los PHA (comúnmente llamados bioplásticos), lípidos, el hytano y la electricidad por MFC (Poggi-Varaldo et al., 2014). Además, estos últimos subproductos pueden ser un sustituto de los biofertilizantes solubilizantes de fosfato; logrando finalmente una descarga de líquido cercana a cero de materia orgánica (Scoma et al., 2016). En la figura 2 se muestra un esquema de economía circular. El trabajo aportado por esta tesis formaría parte de las investigaciones de innovación para la recuperación de bienes.



**Innovación**

Se necesita investigación para transformar bienes usados en "nuevos" y reciclar átomos.

**Extracción de recursos**

El agua, la energía y los recursos naturales entran en el proceso de fabricación

**Fabricación**

Renovar productos usados reduce la necesidad de crearlos desde cero

**Distribución**

Transferencias de propiedad del fabricante al consumidor en el punto de venta

**USO**

¿Es controlado por el comprador-propietario-consumidor de bienes o por los administradores de flota que retienen la propiedad y venden bienes y servicios?

Figura 2. Esquema de economía circular e integración de biorefinerías. Imagen tomada y modificada de Schieb et al., 2015.

Por otro lado, para fundamentar estas afirmaciones ambientales, los impactos de los materiales biológicos deben cuantificarse normalmente aplicando una evaluación del ciclo de vida (ACV), comúnmente conocida como análisis de la cuna a la tumba, es decir, desde la extracción de recursos hasta la gestión de residuos pasando por la fabricación, transporte, uso y mantenimiento del producto o servicio. El ACV se utiliza cada vez más para la evaluación ambiental de procesos y productos en la investigación, y también para aplicaciones de políticas. Por tanto, el desarrollo de métodos y la evaluación de ACV son importantes. Otras herramientas de análisis de sistemas ambientales incluyen la Evaluación de Impacto Ambiental (EIA), la Evaluación de Riesgos Ecológicos (ERA) y el Análisis de Flujo de Materiales (AFM). En general, las herramientas de análisis de sistemas ambientales examinan los sistemas sociales, técnicos y naturales y los vínculos entre estos sistemas. Por lo tanto se hace evidente el cambio de una economía lineal a una economía circular para promover un cambio del consumo de reservas

fósiles a recursos renovables o "verdes" (Mohan et al., 2016). Esto contribuirá en la mitigación de las emisiones de GEI y su impacto en el cambio climático (Stahel, 2016). Además, generará increíbles oportunidades de empleo en las industrias y el mundo académico, especialmente en los sectores de la agricultura, la alimentación, la química y la salud, la farmacia y la logística (Amulya et al., 2016).

Los estudios de ACV revelaron que todavía la producción de H<sub>2</sub> a gran escala y su utilización en el campo real está en etapa de desarrollo y necesita impulso para obtener el H<sub>2</sub> por medios renovables para su uso en el campo real. Aunque la producción de bio-H<sub>2</sub> está en auge, otros factores, como la utilización eficaz de los residuos orgánicos, la eficiencia del proceso, etc., deben tenerse en cuenta para la viabilidad económica y la sostenibilidad ambiental (Mohan et al., 2016). Este enfoque todavía está en desarrollo, con la gran mayoría de los estudios que se realizan a escala de laboratorio y pocos a escala piloto (Poggi-Varaldo et al., 2014).

Es necesario entender que no hay una única solución sino que la producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura es una de las tantas alternativas para el tratamiento de residuos y la obtención de energía. Esto ayuda a diversificar la matriz energética, tener otras alternativas energéticas. Quizás, el mayor desafío es aprender cómo integrar tecnologías, no solo dentro de los límites de la biorefinería, sino también ampliar los horizontes para integrar los sistemas biológicos y bioprocesos para expandir los circuitos que operan a través del sistema de gestión de residuos (Schieb et al., 2015b) pudiendo así surgir nuevas estructuras industriales sostenibles. Entender que todas estas tecnologías diferentes encajan (o no) requerirá un esfuerzo considerable.

#### 7. Conclusiones finales

- Se generó conocimiento de la comunidad microbiana presente en reactores de producción de H<sub>2</sub> por fermentación oscura que permitió explicar cómo funciona el proceso.
- Se diseñó una estrategia exitosa que permitió aislar y caracterizar bacterias productoras de H<sub>2</sub> determinado su máximo rendimiento en cultivos puros utilizando diferentes sustratos. Esta estrategia también permitió aislar y estudiar las bacterias competidoras de importancia en reactores hidrogenogénicos.
- Se verificó el efecto de *Lactobacillus* como inhibidor de *Clostridium* y se determinó el rol de *Megasphaera* en suprimir esa inhibición.



- Se caracterizó la comunidad microbiana de microorganismos homoacetogénicos presentes en reactores de producción de H<sub>2</sub> operados con diferentes sustratos, se concluyó que el sustrato es determinante en la comunidad microbiana desarrollada.
- Mediante los aislamientos de microorganismos de las MFC se pudo postular el posible rol de estos microorganismos en las celdas.
- Se aisló y caracterizó la cepa NAR como posible microorganismo electrogénico con actividad débil.
- El estudio del genoma de la cepa NAR permitió clasificarla dentro de la especie *Raoultella ornithinolytica* que no estaba descrita como electrogénica. Este estudio permitió elaborar una lista con los posibles genes candidatos de la electrogénesis.
- Se determinó que la electrofermentación puede tener un efecto positivo en la producción de H<sub>2</sub> dependiendo del inóculo seleccionado, aunque el proceso tiene una gran variación entre las réplicas.

## REFERENCIAS

Albertsen, M., Hansen, L. B. S., Saunders, A. M., Nielsen, P. H., & Nielsen, K. L. (2012). A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal. *The ISME journal*, 6(6), 1094-1106.

Amulya, K., Reddy, M. V., & Mohan, S. V. (2014). Acidogenic spent wash valorization through polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis coupled with fermentative biohydrogen production. *Bioresource technology*, 158, 336-342.

Aresta, M., Dibenedetto, A., & Dumeignil, F. (Eds.). (2012). *Biorefinery: from biomass to chemicals and fuels*. Walter de Gruyter.

Bakonyi, P., Kumar, G., Bélafi-Bakó, K., Kim, S. H., Koter, S., Kujawski, W., ... & Pientka, Z. (2018). A review of the innovative gas separation membrane bioreactor with mechanisms for integrated production and purification of biohydrogen. *Bioresource technology*, 270, 643-655.

Balachandar, G., Varanasi, J. L., Singh, V., Singh, H., & Das, D. (2020). Biological hydrogen production via dark fermentation: A holistic approach from lab-scale to pilot-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(8), 5202-5215.

Bartels, J. R., Pate, M. B., & Olson, N. K. (2010). An economic survey of hydrogen production from conventional and alternative energy sources. *International journal of hydrogen energy*, 35(16), 8371-8384.

Budzianowski, W. M. (2011). Can 'negative net CO<sub>2</sub> emissions' from decarbonised biogas-to-electricity contribute to solving Poland's carbon capture and sequestration dilemmas?. *Energy*, 36(11), 6318-6325.

Cabezas, A., de Araujo, J. C., Callejas, C., Galès, A., Hamelin, J., Marone, A., ... & Etchebehere, C. (2015). How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(4), 555-593.

Cavinato, C., Giuliano, A., Bolzonella, D., Pavan, P., & Cecchi, F. (2012). Bio-hythane production from food waste by dark fermentation coupled with anaerobic digestion process: a long-term pilot scale experience. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(15), 11549-11555.

Castelló....(2009)

Choi, S. (2015). Microscale microbial fuel cells: Advances and challenges. *Biosensors and Bioelectronics*, 69, 8-25.

Chu, C. F., Li, Y. Y., Xu, K. Q., Ebie, Y., Inamori, Y., & Kong, H. N. (2008). A pH-and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International journal of hydrogen energy*, 33(18), 4739-4746.

Clark, J. H., & Deswarte, F. E. (2008). The biorefinery concept—an integrated approach. *Introduction to chemicals from biomass*, 2.

Chandra, R., Rohit, M. V., Swamy, Y. V., & Mohan, S. V. (2014). Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. *Bioresource technology*, 165, 279-287.

Chandra, R., Venkata Mohan, S., 2014. Enhanced bio-hydrogenesis by co-culturing photosynthetic bacteria with acidogenic process: Augmented dark-photo fermentative hybrid system to regulate volatile fatty acid inhibition, *Int J Hydrogen Energy*. 39, 14,7604-7615.

Cusick, R. D., Bryan, B., Parker, D. S., Merrill, M. D., Mehanna, M., Kiely, P. D., ... & Logan, B. E. (2011). Performance of a pilot-scale continuous flow microbial electrolysis cell fed winery wastewater. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(6), 2053-2063.

Dahiya, S., Chatterjee, S., Sarkar, O., Venkata Mohan, S.(2020) Renewable Hydrogen Production by Dark-Fermentation: Current Status, Challenges and Perspectives, *Bioresource Technology*,

doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124354>

Dahiya, S., Sarkar, O., Swamy, Y. V., & Mohan, S. V. (2015). Acidogenic fermentation of food waste for volatile fatty acid production with co-generation of biohydrogen. *Bioresource technology*, 182, 103-113.

- Devi, M. P., Swamy, Y. V., & Mohan, S. V. (2013). Nutritional mode influences lipid accumulation in microalgae with the function of carbon sequestration and nutrient supplementation. *Bioresource technology*, 142, 278-286.
- Doyle, L. E., & Marsili, E. (2018). Weak electricigens: A new avenue for bioelectrochemical research. *Bioresource technology*, 258, 354-364.
- ElMekawy, A., Srikanth, S., Bajracharya, S., Hegab, H. M., Nigam, P. S., Singh, A., ... & Pant, D. (2015). Food and agricultural wastes as substrates for bioelectrochemical system (BES): the synchronized recovery of sustainable energy and waste treatment. *Food Research International*, 73, 213-225.
- Ewan, B. C. R., & Allen, R. W. K. (2005). A figure of merit assessment of the routes to hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(8), 809-819.
- Fakhimi, N., Dubini, A., Tavakoli, O., & González-Ballester, D. (2019). Acetic acid is key for synergetic hydrogen production in *Chlamydomonas*-bacteria co-cultures. *Bioresource technology*, 289, 121648.
- Fast, A. G., Schmidt, E. D., Jones, S. W., & Tracy, B. P. (2015). Acetogenic mixotrophy: novel options for yield improvement in biofuels and biochemicals production. *Current opinion in biotechnology*, 33, 60-72.
- Han, S. K., Kim, S. H., Kim, H. W., & Shin, H. S. (2005). Pilot-scale two-stage process: a combination of acidogenic hydrogenesis and methanogenesis. *Water science and technology*, 52(1-2), 131-138.
- Kapdan, I. K., & Kargi, F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and microbial technology*, 38(5), 569-582.
- Kazakov, A. N., Dunikov, D. O., & Mitrokhin, S. V. (2016). AB5-type intermetallic compounds for biohydrogen purification and storage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(46), 21774-21779.
- Kim, D. H., & Kim, M. S. (2013). Development of a novel three-stage fermentation system converting food waste to hydrogen and methane. *Bioresource technology*, 127, 267-274.
- Kim, M. S., Na, J. G., Lee, M. K., Ryu, H., Chang, Y. K., Triolo, J. M., ... & Kim, D. H. (2016). More value from food waste: lactic acid and biogas recovery. *Water research*, 96, 208-216.
- Koch, C., & Harnisch, F. (2016). Is there a specific ecological niche for electroactive microorganisms?. *ChemElectroChem*, 3(9), 1282-1295.
- Kozłowski, K., Lewicki, A., Malińska, K., & Wei, Q. (2019). Current state, challenges and perspectives of biological production of hydrogen in dark fermentation process in Poland. *Journal of Ecological Engineering*, 20(2).
- Kumar, G., Sen, B., & Lin, C. Y. (2013). Pretreatment and hydrolysis methods for recovery of fermentable sugars from de-oiled *Jatropha* waste. *Bioresource technology*, 145, 275-279.

- Lalurette, E., Thammannagowda, S., Mohagheghi, A., Maness, P. C., & Logan, B. E. (2009). Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. *International journal of hydrogen energy*, 34(15), 6201-6210.
- Lalman, J. A., Chaganti, S. R., Moon, C., & Kim, D. H. (2013). Elucidating acetogenic H<sub>2</sub> consumption in dark fermentation using flux balance analysis. *Bioresource technology*, 146, 775-778.
- Lee, H. S., & Rittmann, B. E. (2010). Significance of biological hydrogen oxidation in a continuous single-chamber microbial electrolysis cell. *Environmental science & technology*, 44(3), 948-954.
- Modestra, J. A., Navaneeth, B., & Mohan, S. V. (2015). Bio-electrocatalytic reduction of CO<sub>2</sub>: Enrichment of homoacetogens and pH optimization towards enhancement of carboxylic acids biosynthesis. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 10, 78-87.
- Moon, C., Jang, S., Yun, Y. M., Lee, M. K., Kim, D. H., Kang, W. S., ... & Kim, M. S. (2015). Effect of the accuracy of pH control on hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 179, 595-601.
- Nevin, K. P., Woodard, T. L., Franks, A. E., Summers, Z. M., & Lovley, D. R. (2010). Microbial electrosynthesis: feeding microbes electricity to convert carbon dioxide and water to multicarbon extracellular organic compounds. *MBio*, 1(2).
- Ni, M., Leung, D. Y., Leung, M. K., & Sumathy, K. (2006). An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel processing technology*, 87(5), 461-472.
- Nikhil, G. N., Mohan, S. V., & Swamy, Y. V. (2014). Systematic approach to assess biohydrogen potential of anaerobic sludge and soil rhizobia as biocatalysts: Influence of crucial factors affecting acidogenic fermentation. *Bioresource technology*, 165, 323-331.
- Mohan, S. V., Mohanakrishna, G., & Sarma, P. N. (2008). Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *International journal of hydrogen energy*, 33(9), 2156-2166.
- Mohan, S. V., Velvizhi, G., Krishna, K. V., & Babu, M. L. (2014). Microbial catalyzed electrochemical systems: a bio-factory with multi-facet applications. *Bioresource technology*, 165, 355-364.
- Mohan, S. V., Modestra, J. A., Amulya, K., Butti, S. K., & Velvizhi, G. (2016). A circular bioeconomy with biobased products from CO<sub>2</sub> sequestration. *Trends in Biotechnology*, 34(6), 506-519.
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., & Bernet, N. (2016). Electro-fermentation: how to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends in biotechnology*, 34(11), 856-865.
- Parameswaran, P., Torres, C. I., Kang, D. W., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2012). The role of homoacetogenic bacteria as efficient hydrogen scavengers in microbial electrochemical cells (MXCs). *Water Science and Technology*, 65(1), 1-6.

- Pasupuleti, S. B., Sarkar, O., & Mohan, S. V. (2014). Upscaling of biohydrogen production process in semi-pilot scale biofilm reactor: evaluation with food waste at variable organic loads. *international journal of hydrogen energy*, 39(14), 7587-7596.
- Poggi-Varaldo, H. M., Munoz-Paez, K. M., Escamilla-Alvarado, C., Robledo-Narváez, P. N., Ponce-Noyola, M. T., Calva-Calva, G., ... & Rinderknecht-Seijas, N. F. (2014). Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: a review. *Waste management & research*, 32(5), 353-365.
- Rai PK, Singh SP. Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement. *Int J Hydrogen Energy* 2016;41:19957–71
- Reddy, C. N., Modestra, J. A., Kumar, A. N., & Mohan, S. V. (2015). Waste remediation integrating with value addition: biorefinery approach towards sustainable bio-based technologies. In *Microbial Factories* (pp. 231-256). Springer, New Delhi.
- Ren, N. Q., Zhao, L., Chen, C., Guo, W. Q., & Cao, G. L. (2016). A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H<sub>2</sub>: key challenges and new insights. *Bioresource Technology*, 215, 92-99.
- Rodríguez, E., García-Encina, P. A., Stams, A. J., Maphosa, F., & Sousa, D. Z. (2015). Meta-omics approaches to understand and improve wastewater treatment systems. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(3), 385-406.
- Sarma, S. J., Pachapur, V., Brar, S. K., Le Bihan, Y., & Buelna, G. (2015). Hydrogen biorefinery: potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 942-951.
- Schieb, P. A., Lescieux-Katir, H., Thénot, M., & Clément-Larosière, B. (2015). An original business model: the integrated biorefinery. In *Biorefinery 2030* (pp. 25-66). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schiel-Bengelsdorf, B., & Dürre, P. (2012). Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS letters*, 586(15), 2191-2198.
- Scoma, A., Bertin, L., Reis, M. A., Kornaros, M., & Coma, M. (2016). Multipurpose, integrated 2nd generation biorefineries.
- Seengenyong, J., Mamimin, C., Prasertsan, P., & Sompong, O. (2019). Pilot-scale of biohythane production from palm oil mill effluent by two-stage thermophilic anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(6), 3347-3355.
- Singh, A., Nylander, J. A., Schnürer, A., Bongcam-Rudloff, E., & Müller, B. (2020). High-throughput sequencing and unsupervised analysis of formyltetrahydrofolate synthetase (FTHFS) gene amplicons to estimate acetogenic community structure. *Frontiers in microbiology*, 11, 2066.

- Sravan, J. S., Butti, S. K., Sarkar, O., Krishna, K. V., & Mohan, S. V. (2018). Electrofermentation of food waste—Regulating acidogenesis towards enhanced volatile fatty acids production. *Chemical Engineering Journal*, 334, 1709-1718.
- Stahel, W. R. (2016). The circular economy. *Nature*, 531(7595), 435-438.
- Subhash, G. V., Chandra, R., & Mohan, S. V. (2013). Microalgae mediated bio-electrocatalytic fuel cell facilitates bioelectricity generation through oxygenic photomixotrophic mechanism. *Bioresource Technology*, 136, 644-653.
- Toledo-Alarcón, J., Moscoviz, R., Trably, E., & Bernet, N. (2019). Glucose electro-fermentation as main driver for efficient H<sub>2</sub>-producing bacteria selection in mixed cultures. *international journal of hydrogen energy*, 44(4), 2230-2238.
- Toledo-Alarcón, J., Fuentes, L., Etchebere, C., Bernet, N., & Trably, E. (2020). Glucose electro-fermentation with mixed cultures: A key role of the Clostridiaceae family. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Trchounian, K., & Trchounian, A. (2015). Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. *Applied Energy*, 156, 174-184.
- Wang, Y., Tang, W., Wang, F., Ding, C., Xu, S., & Yu, R. (2018). Effects of surface coating with Cu-Pd on electrochemical properties of A2B7-type hydrogen storage alloy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(6), 3244-3252.
- Yee, M. O., Deutzmann, J., Spormann, A., & Rotaru, A. E. (2020). Cultivating electroactive microbes—from field to bench. *Nanotechnology*, 31(17), 174003.
- Yun, Y. M., Lee, M. K., Im, S. W., Marone, A., Trably, E., Shin, S. R., ... & Kim, D. H. (2018). Biohydrogen production from food waste: current status, limitations, and future perspectives. *Bioresource Technology*, 248, 79-87.
- Zondervan, E., Nawaz, M., de Haan, A. B., Woodley, J. M., & Gani, R. (2011). Optimal design of a multi-product biorefinery system. *Computers & chemical engineering*, 35(9), 1752-1766.