



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRODUCCIÓN DE BIOHIDRÓGENO A PARTIR DE
VINAZAS VITIVINÍCOLAS: POTENCIAL DE
COMPONENTES DEL SUSTRATO Y COMUNIDAD
MICROBIANA ASOCIADA

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Isaac Zahuantitla Razo

DIRECTOR: Doctor Julián Carrillo Reyes



Septiembre 2020



JURADO ASIGNADO

Doctora Abigaíl Martínez Torres, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Doctora Norma Elena Rojas Ruíz, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP-BUAP.

Doctor Julián Carrillo Reyes, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.

DIRECTOR DE PROYECTO DE TESIS:

Dr. Julián Carrillo Reyes

FIRMA





AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



El trabajo experimental de la presente tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA), de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México; bajo la dirección del Dr. Julián Carrillo Reyes.

Se agradece a los proyectos CONACYT 255537 y PAPIIT IA100518 (DGAPA-UNAM) por el financiamiento de esta investigación. Isaac Zahuantitla Razo agradece al CONACYT por la beca tesis otorgada (número de registro 29914).





DEDICATORIA





AGRADECIMIENTOS

Me complace extender mi más profundo agradecimiento al Dr. Julián Carrillo Reyes por brindarme la oportunidad de realizar el presente proyecto de tesis bajo su dirección y liderazgo, gracias por su apoyo, paciencia, dedicación y por brindarme ánimos en todas las etapas de esta tesis.

A mis sinodales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; Doctora Norma Elena Rojas Ruíz y Doctora Abigaíl Martínez Torres, por sus comentarios que enriquecieron de gran manera el presente proyecto.

A la Maestra en Ingeniería. Marcela del Carmen Zavala Méndez por su invaluable apoyo, tiempo, constancia y conocimientos compartidos.

Al técnico académico del Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas, de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería, UNAM, el M. en C. Jaime Treviña Pérez por el apoyo brindado.

Al Doctor Martín Barragán Trinidad por su apoyo y comentarios durante la fase experimental de este proyecto de tesis. A Emanuel Eduardo Ávalos por su ayuda en el laboratorio.

A todo el grupo de investigación del Dr. Julián Carrillo Reyes. A mis amigas: Luz Cristina Ibarra Bañuelos, Monserrat Aguilar Pichardo y Gratia Deii Flores Salgado. Mi estancia en LIPATA fue una buena experiencia gracias a todos ustedes.



ÍNDICES

INDICE DE SECCIONES

1. Resumen.....	11
2. Introducción.....	13
2.1 Biocombustibles.....	13
3. Marco Teórico.....	15
3.1 Hidrógeno.....	15
3.2 Producción de Biohidrógeno.....	17
3.3 Ferredoxinas.....	18
3.4 Enzimas nitrogenasa e hidrogenasa.....	19
3.5 Biofotólisis.....	21
3.6 Fotofermentación.....	23
3.7 Celdas de electrólisis microbiana.....	23
3.8 Fermentación oscura.....	23
3.8.1 Valorización de desechos vía Fermentación Oscura.....	38
3.8.2 Vinazas vitivinícolas como sustrato en la producción de biohidrógeno.....	39
3.8.3 Factores que pueden afectar el rendimiento en la producción de H ₂	45
3.8.4 Otros posibles usos de la fermentación oscura.....	46
3.9 Determinación de ácidos orgánicos y solventes mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia HPLC.....	46
3.10 La importancia de la Demanda química de oxígeno.....	47
3.11 Método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico para la determinación de carbohidratos...50	
3.12 Determinación de Sólidos suspendidos.....	50
3.13 Cromatografía de gases para determinación de la composición de biogás.....	51
3.14 Secuenciación mediante Illumina.....	51



3.15 Análisis de la estructura de la comunidad micro microbiana.....	52
3.15.1 Unidades operacionales taxonómicas (OTUS) y Variantes de secuencia de amplicon (ASVs).....	53
4. Antecedentes.....	55
5. Justificación.....	60
6. Hipótesis.....	60
7. Objetivos.....	61
8. Metodología.....	62
8.1 Inóculo.....	62
8.2 Sustratos.....	62
8.3 Cinéticas de producción de biohidrógeno con diferentes sustratos.....	65
8.4 Métodos analíticos.....	67
8.5 Caracterización microbiana.....	69
8.6 Análisis de resultados de secuenciación.....	69
9. Resultados y discusión.....	71
9.1 Efecto de los diferentes sustratos en la producción de biohidrógeno.....	71
9.2 Cinética de consumo de sustratos y producción de metabolitos.....	77
9.3 Análisis de la comunidad microbiana.....	95
10. Conclusiones.....	105
11. Bibliografía.....	107



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos biológicos para producir biohidrógeno.....	18
Figura 2. Estructura esquemática de la enzima nitrogenasa.....	19
Figura 3. Sitios activos de hidrogenasas.....	20
Figura 4. Proceso llevado a cabo en la biofotólisis directa para la obtención de H ₂	22
Figura 5. Proceso llevado a cabo en la biofotólisis indirecta para la obtención de H ₂	22
Figura 6. Glucólisis.....	29
Figura 7. Reacción llevada a cabo por la enzima piruvato ferredoxina oxidorreductasa.....	30
Figura 8. Ruta metabólica de síntesis de ácido acético mediante fermentación oscura.....	32
Figura 9. Ruta metabólica de síntesis de ácido butírico mediante fermentación oscura.....	33
Figura 10. Proceso sintetizado de la homoacetogénesis.....	37
Figura 11. Sistema automático AMPTS II.....	66
Figura 12. HPLC (1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).....	67
Figura 13. Cromatógrafo de gases (8610 C, SRI Instruments, Torrance, CA, USA).....	69
Figura 14. Volumen de biogás producido por sustrato empleado.....	72
Figura 15. Volumen máximo de biohidrógeno producido por sustrato. H _{max}	75
Figura 16. Valor de la fase exponencial de producción de biohidrógeno por sustrato. R _{max}	75
Figura 17. Metabolitos presentes en cinética de consumo usando el sustrato 1 Ácido acético y ácido láctico.....	79
Figura 18. Metabolitos presentes en cinética de consumo usando el sustrato 2 Carbohidratos.....	82
Figura 19. Metabolitos presentes en cinética de consumo usando el sustrato 3 Glicerol/Carbohidratos.....	83
Figura 20. Metabolitos presentes en cinética de consumo usando el sustrato 4 Glicerol.....	85
Figura 21. Metabolitos presentes en cinética de consumo usando el sustrato 5 Vinazas.....	86
Figura 22. Clúster damerograma y composición de la comunidad microbiana por sustrato empleado.....	96



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales países productores de biocombustibles.....	15
Tabla 2. Microorganismos implicados en la producción de Biohidrógeno FO.....	26
Tabla 3. Algunos de los residuos empleados como sustrato en la fermentación oscura.....	38
Tabla 4. Determinación de la composición de vinazas vitivinícolas.....	42
Tabla 5. Concentraciones iniciales en g/L de los componentes presentes en las vinazas vitivinícolas empleadas como sustrato.....	63
Tabla 6. Componentes utilizados en la elaboración de los sustratos a evaluar en el presente proyecto de investigación.....	63
Tabla 7. Concentraciones iniciales en g/L de los componentes presentes en los diferentes sustratos evaluados.....	64
Tabla 8. Valores de volumen máximo de biohidrógeno producido por sustrato.....	75
Tabla 9. Valores de Rmax (mL/h) para cada sustrato evaluado.....	75
Tabla 10. Valores de concentración de (SST), (SSF), (SSV).....	77
Tabla 11. Consumo de componentes en g DQOe/L y producción de H2 en mL H2/g DQOe consumido.....	91
Tabla 12. Porcentaje de aporte en la producción de biohidrógeno de cada componente principal de las vinazas vitivinícolas.....	93
Tabla 13. Diferentes valores de DQO obtenidos por cada sustrato evaluado.....	94
Tabla 14. Porcentajes de abundancia relativa de cada género presente en la comunidad microbiana perteneciente a cada botella y sustrato.....	99



RESUMEN

Los biocombustibles son fuentes renovables de energía obtenidos a partir de biomasa, pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos. El hidrógeno es probablemente el biocombustible más prometedor debido a su contenido energético específico de 122 KJ/g, mayor que cualquier otro combustible. Tiene aplicaciones desde combustible para transportes hasta generación de electricidad. Su producción mediante biomasa es carbono neutral (cero emisiones de CO₂) al igual que su combustión. En este sentido, la fermentación oscura es un proceso de producción de biohidrógeno que no requiere de luz y ocurre bajo condiciones anaerobias, utilizando como sustrato residuos orgánicos. Dentro de la fermentación oscura se han identificado rutas metabólicas que producen compuestos como; ácido acético, ácido butírico, butanol, etanol y ácido propiónico, las cuales tienen diferentes rendimientos teóricos en la producción de biohidrógeno. Los géneros microbianos principalmente estudiados en fermentación oscura son *Clostridium*, *Enterobacter* y *Bacillus*. La fermentación oscura puede utilizar una amplia gama de sustratos ricos en materia orgánica, entre ellos las vinazas vitivinícolas las cuales son un desecho resultante de la producción de vino, con altas cargas orgánicas y cuya descarga directa en cuerpos de agua o tierras causa un impacto ambiental. Diversos estudios han comprobado su factibilidad como sustrato en la producción de biohidrógeno, sin embargo, en la actualidad no se conoce la contribución que tienen los componentes presentes en las vinazas vitivinícolas, ni se ha determinado cual de esos componentes es determinante en la producción de H₂. Tampoco se conoce como repercuten estos componentes en la comunidad de los microorganismos presentes en la fermentación oscura de este sustrato. El presente proyecto de tesis se enfoca en abordar esas cuestiones, con la información generada habrá una mejor comprensión del proceso y podrá ser utilizada dentro del conocimiento teórico en futuros proyectos de investigación sobre la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura empleando como sustrato a las vinazas vitivinícolas. Se realizaron experimentos de cinética de producción de biohidrógeno en lote con un volumen de trabajo de 400 ml, en un sistema automático que registra las productividades de hidrógeno en línea, utilizando sustrato; vinazas vitivinícolas, así como los componentes principales de las mismas por separado (aceto-láctico, carbohidratos, glicerol-carbohidratos, glicerol) para evaluar su contribución en la producción de H₂. El inóculo utilizado fue un cultivo mixto previamente empleado en procesos de producción de



biohidrógeno en un biorreactor tipo filtro percolador escala piloto. Los experimentos se incubaron a 37°C y una agitación intermitente de 120 rpm (60 s prendido/180 s apagado) durante un periodo de 118 h. A lo largo de la cinética se determinaron periódicamente los metabolitos producidos. Al término de la fermentación se determinó la demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos totales (SST), sólidos suspendidos fijos (SSF) y sólidos en suspensión volátiles (SSV), composición de biogás, así como muestras de biomasa para caracterizar la composición microbiana presente en cada uno de los sustratos evaluados, mediante secuenciación del gen ARNr 16S. Se obtuvo un volumen de producción máximo de 237 mL de H₂, cuando el sustrato empleado fue vinazas vitivinícolas (Dilución 1:2 en agua), obteniendo un rendimiento experimental de producción de 1182 mL de biohidrógeno por L de vinazas. Como principal resultado de las cinéticas se demostró que el rendimiento asociado a ácido acético-ácido láctico, glicerol y carbohidratos fue 35.7596 mL H₂/g DQO_{consumida}, 25.4901 mL H₂/g DQO_{consumida} y 132.3085 mL H₂/g DQO_{consumida} respectivamente, demostrando el potencial de cada uno de los componentes de las vinazas como sustrato para la producción de hidrógeno. Sin embargo, el glicerol fue el componente mayoritariamente consumido en las vinazas, llegándose a consumir hasta 61% del mismo, de los 11.19 g/L que se encuentran en las vinazas. A partir de los resultados obtenidos de los ácidos orgánicos producidos, se identificó que el principal ácido orgánico producido mediante este proceso de fermentación oscura es el ácido butírico (Obteniendo una concentración final de 5.51 g DQOe/L en el sustrato Vinazas). Por otro lado, el análisis de la comunidad bacteriana mostró que el género productor de H₂, *Clostridium* tuvo una abundancia relativa en todos los sustratos evaluados (Rango del 21 al 57%), relacionandolo con la producción de H₂ y ácido butírico. Otros géneros microbianos que tuvieron una abundancia relativa importante en los sustratos fueron *Prevotella* y *Lactobacillus* (El cual probablemente tuvo una relación simbiótica con el género *Clostridium* al emplear vinazas como sustrato).



2. INTRODUCCIÓN

2.1 Biocombustibles

Los biocombustibles son fuentes renovables de energía obtenidos a partir de biomasa, la cual es un conjunto de materia orgánica que puede ser procedente de microorganismos, plantas herbáceas, leñosas, aceites vegetales, grasas animales, así como residuos agrícolas, forestales, industriales y municipales. Los biocombustibles pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos (Carrillo-Reyes *et al.*, 2014; Serna *et al.*, 2011). Los biocombustibles generados a partir de fermentaciones microbianas fueron utilizados a principios del siglo XX para satisfacer ciertas necesidades energéticas de la época, tales son los casos del butanol, acetona y el etanol (Carrillo-Reyes *et al.*, 2014), el cual servía como combustible para los automóviles modelo Ford T diseñados por Henry Ford (Bustamante & Cerutti, 2016). Sin embargo después de la Segunda Guerra Mundial, en la década de los 50, el desarrollo de biocombustibles tuvo un decline en favor de la industria petroquímica debido a los bajos costos de los combustibles derivados de fósiles así como la amplia gama de productos y materiales obtenidos del petróleo (Jones & Woods, 1986). La dependencia, el uso excesivo de los combustibles fósiles y su combustión, generan tres importantes problemas; en primer lugar se produce un aumento de la concentración de gases de efecto invernadero los cuáles contribuyen al calentamiento global, junto con las consecuencias ambientales que ello representa (Mona *et al.*, 2020), el segundo problema es la contaminación del aire con compuestos NO_x, SO_x y CO , los cuales pueden tener efectos negativos en la salud humana, por ejemplo; provocar nacimientos prematuros, tamaño y peso bajo en neonatos, reducción del funcionamiento de los pulmones de infantes, o desarrollo de desórdenes neurológicos (IQ reducido, ansiedad, depresión) (Singh & Rathore, 2017 ; Perera, 2017). Por ultimo las reservas de petróleo están siendo mermadas con lo cual se compromete el futuro suministro energético (Noblecourt *et al.*, 2018), ya que se prevé que se agotaran a finales de este siglo (Singh & Rathore, 2017).

Por esta razón la investigación y desarrollo de biocombustibles ha resurgido como una alternativa energética y ambientalmente viable (Srivastava *et al.*, 2020). Los



biocombustibles de primera generación son aquellos producidos a partir de biomasa proveniente de cultivos agrícolas, los cuáles sirven para alimentación humana y/o animal, entre los principales sustratos se encuentran; trigo, arroz, papa, maíz, caña de azúcar, cebada y aceite vegetal (Syahirah *et al.*, 2020). Los biocombustibles de segunda generación provienen de diversos tipos de biomasa, las cuáles pueden ser materias primas, pero no estar destinadas a la alimentación, como los desechos agrícolas, también pueden ser desechos ricos en materia orgánica como residuos municipales e industriales, estos desechos ricos en carbono pueden ser obtenidos a bajos costo, además de que se ha demostrado que pueden ser utilizados para la producción de biocombustibles como el hidrógeno, biodiesel y bioetanol (Srivastava *et al.*, 2016). Los biocombustibles de tercera generación proceden de biomasa procedente de microalgas y su crecimiento mediante el consumo de CO₂ (Sadatshojaei *et al.*, 2020). Recientemente se ha utilizado el término biocombustibles de cuarta generación para referirse a la biomasa procedente de organismos genéticamente modificados, principalmente microalgas, las cuales gracias a las modificaciones realizadas pueden consumir una mayor cantidad de CO₂, además de aumentar su tasa de crecimiento y adaptabilidad para sobrevivir en ambientes pobres en nutrientes (Ríos *et al.*, 2017; Syahirah *et al.*, 2020).

En la actualidad los principales biocombustibles producidos a nivel industrial son los de primera generación y los más económicos, sin embargo, esto ha generado un debate por la seguridad alimenticia; hay una competencia por el suelo y agua entre los cultivos destinados al consumo humano y animal, con los cultivos destinados a la producción de biocombustibles (Serna *et al.*, 2011; Cheteni, 2017). Por otro lado se ha relacionado el hecho de que utilizar alimentos con fines energéticos repercute directamente en el precio de los mismos (Gao *et al.*, 2011; Havlík *et al.*, 2011), por ejemplo las tortillas en México, al ser elaboradas a partir de maíz su precio se ha incrementado, debido a que se importan grandes cantidades de este cereal desde Estados Unidos y en ese país el maíz es utilizado para la generación de biocombustible (González & Castañeda, 2008; Fernández & Venegas, 2017). Actualmente México está considerado como uno de los principales productores de biocombustibles, sin embargo, su nivel de producción sigue siendo muy bajo con



respecto a otros países (Alonso & Zamora, 2019) lo cual se puede apreciar en la Tabla (1).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Estados Unidos	49.63	54.74	53.84	59.34	60.76	59.39	56.66	58.09	57.54	57.55
Brasil	38.33	36.69	32.28	30.38	24.31	25	26.70	25.15	27.56	27.39
México	0.02	0.04	0.09	0.11	0.12	0.14	0.19	0.19	0.19	0.20

Tabla (1). Principales países productores de biocombustibles y sus respectivos porcentajes de producción a nivel mundial (Azamar & Tagle, 2019).

Por estas razones la investigación en producción de biocombustibles de 2da, 3ra y 4ta generación, es imprescindible, ya que puede valorizar desechos provenientes de diversos procesos, y al ser bio transformados terminan en un estado más amigable con el ambiente (Skaggs *et al.*, 2018; Srivastava *et al.*, 2020; Syahirah *et al.*, 2020; Rai & Singh, 2016). Además de que estos tipos de tecnología no repercuten en el costo de bienes alimenticios y tampoco provocan deforestación de regiones naturales (Serna *et al.*, 2011; Datta *et al.*, 2019).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Hidrógeno

El hidrógeno es el elemento más pequeño y simple, el cual tiene un peso atómico de 1.0, es el elemento más común en la superficie de la tierra ya que está presente en grandes cantidades, en compuestos como el agua, en la biomasa, en la litósfera y la hidrósfera (Ohnishi, 2015). El hidrógeno molecular es un gas en condiciones ambientales, no es venenoso, es incoloro, inodoro (Møller *et al.*, 2017). El hidrógeno es probablemente el biocombustible más prometedor debido a su contenido energético específico de 122 KJ/g (Fernández & Venegas, 2017), mayor que cualquier otro combustible; Metano (119.66 KJ/g), metanol (20.08 KJ/g), etanol (26.78 KJ/g) y gasolina (44.35 KJ/g) (Sołowski, 2018). Tiene aplicaciones como combustible de transportes, en motores de combustión interna y turbinas, así como generación de electricidad mediante pilas de combustible que funcionan a base de



H₂ (Noblecourt *et al.*, 2018; Abe *et al.*, 2019). Las pilas de combustible son celdas electroquímicas que pueden convertir la energía química almacenada en un combustible (en este caso hidrógeno) en energía eléctrica (Weber & Lipman, 2019). La producción de hidrógeno mediante biomasa es carbono neutral (cero emisiones de CO₂) al igual que su combustión (Rosen & Koohi-Fayegh, 2016). La combustión teórica del hidrógeno está representada por la ecuación (1), en donde se puede observar que el agua es el único subproducto de su uso (V. Kumar *et al.*, 2015).



El hidrógeno puede ser obtenido mediante los siguientes procesos físicos y químicos: Electrólisis del agua, termólisis y separación termoquímica de moléculas de agua, procesos fotónicos, tecnologías de reformación de hidrocarburos, reformación de hidrocarburos asistida por el uso de tecnología plasmática y producción de hidrógeno usando amonio mediante descomposición plasmática (El-Shafie *et al.*, 2019; Dawood *et al.*, 2020; Nikolaidis & Poullikkas, 2017). Actualmente su principal producción es mediante procesos químicos, como la reformación de vapor de metano (MSR), del total de hidrógeno producido a nivel global 40% proviene de gas natural, 40% de petróleo crudo, 18% de carbón y 4% de la hidrólisis del agua (Amin *et al.*, 2016), de acuerdo con Rittmann (2015) la obtención de hidrógeno mediante las fuentes anteriormente mencionados es altamente demandante de energía y por lo tanto perjudicial para el ambiente.

Desde el año 1800 los científicos sabían que las bacterias y algas podían producir hidrógeno, pero fue hasta el año 1970 que la producción biológica de hidrógeno fue seriamente considerada como una práctica posible (Benemann, 1996). En la actualidad se sabe que la producción biológica de hidrógeno puede utilizar una amplia gama de sustratos orgánicos provenientes de desechos (Kamaraj *et al.*, 2020) y la tecnología empleada es más simple que la utilizada en producción química, además de ser amigable con el medio ambiente y sustentable (Sampath *et al.*, 2020). Diversos avances científicos y tecnológicos realizados por investigadores en escalas laboratorio y piloto han mostrado resultados prometedores para la obtención de biohidrógeno mediante fermentación a nivel industrial (Balachandar *et*



al., 2020; Lin *et al.*, 2011; Rizal *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020). Es por ello que la producción biológica es una alternativa prometedora para sustituir los métodos físicos y químicos a nivel industrial, obteniendo consigo beneficios económicos y ambientales (Rittmann *et al.*, 2015; Saratale *et al.*, 2019). Las empresas Honda, Toyota y Hyundai han producido en masa los primeros vehículos que utilizan hidrógeno como combustible y hasta el año 2019 se habían vendido 225,000 celdas de combustible a base de hidrógeno, las cuales son empleadas en hogares (Staffell *et al.*, 2019). Reportes de la Unión Europea indican que a partir del año 2030, en un periodo subsecuente de 15 años, se generarán 100,000 empleos derivados de la construcción y operación de plantas de producción de biohidrógeno (Singh & Rathore, 2017).

3.2 Producción de Biohidrógeno

La producción biológica de hidrógeno es llevada a cabo por diversos organismos que pueden ser eucariotas o procariotas, por lo tanto, están implicadas diferentes rutas metabólicas y procesos (Bagi *et al.*, 2014; Cabrol *et al.*, 2017). Sin embargo, pueden ser agrupados en 2 conjuntos, los procesos dependientes de luz y los procesos independientes de luz (Chandrasekhar *et al.*, 2015), como se aprecia en la Figura (1); dichos procesos serán explicados de manera breve en los siguientes apartados además de las enzimas involucradas, haciendo énfasis en la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura, proceso empleado en la fase experimental del presente proyecto de investigación.

3.3 Ferredoxinas

Las ferredoxinas son proteínas pequeñas, solubles, con bajo potencial redox y que cuentan con cúmulos de hierro-azufre. Fungen como acarreadores de electrones en diversas rutas metabólicas, tanto en bacterias como en algas, plantas y animales (Bodek & Ca, 2013; Cabrol *et al.*, 2017). Durante la producción biológica de hidrógeno, esta proteína acepta los electrones provenientes de otras moléculas como el agua o el NADH, dependiendo del proceso biológico que se esté realizando, las ferredoxinas reducidas serán las encargadas de acarrear los electrones a una enzima hidrogenasa o nitrogenasa, según sea el caso, para que esta enzima lleve

a cabo la producción de biohidrógeno (Diakonova *et al.*, 2016; Veeravalli *et al.*, 2019).

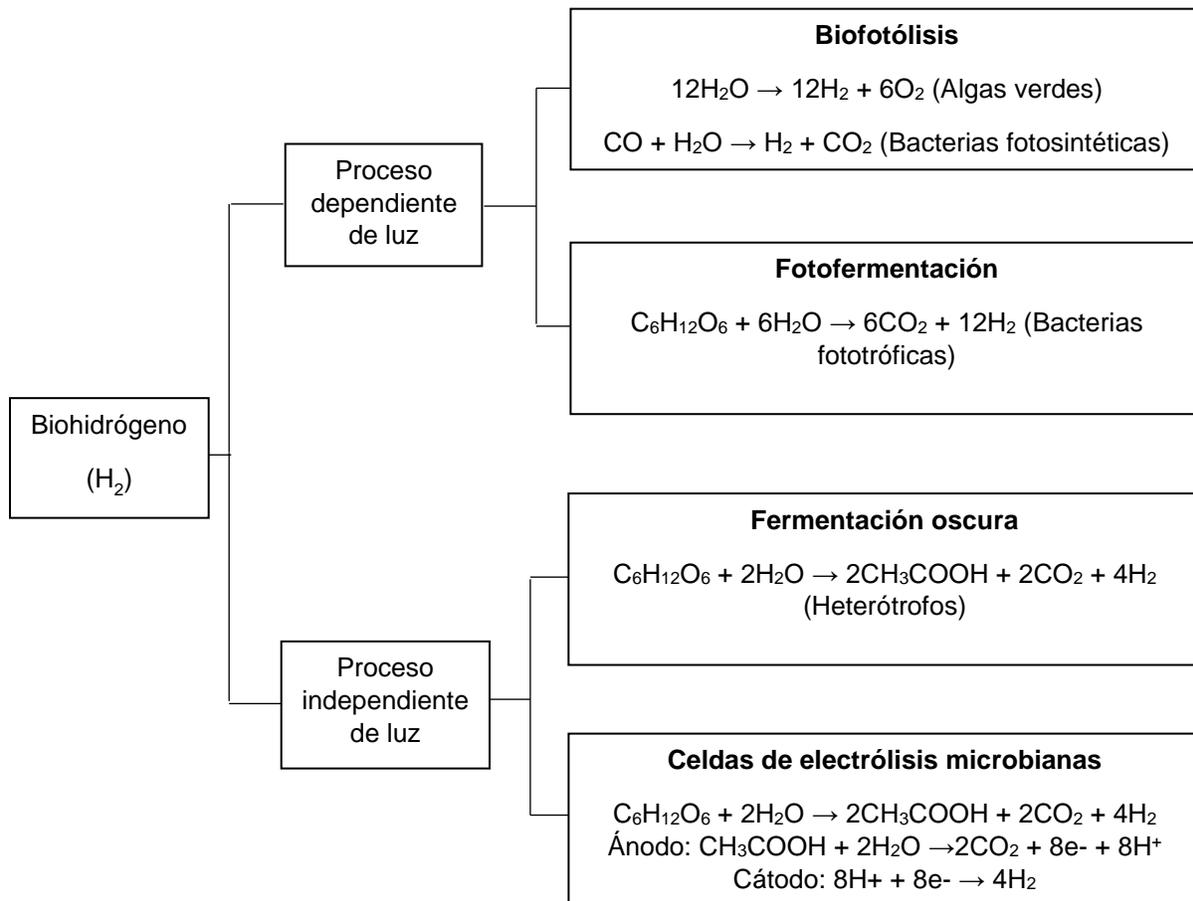


Figura (1). Métodos biológicos para producir biohidrógeno (Ghimire *et al.*, 2015).

3.4 Enzimas nitrogenasa e hidrogenasa

Las enzimas nitrogenasa e hidrogenasa, son las responsables de catalizar la producción de biohidrógeno (Hosseini *et al.*, 2015). En ambientes anaerobios la nitrogenasa presente en microorganismos fotosintéticos, cuya estructura puede apreciarse en la Figura (2), puede convertir una molécula de nitrógeno en amonio generando también como producto hidrógeno, este proceso puede llevarse a cabo en la fotofermentación o en la fotólisis (Das & Veziroglu, 2008; Mona *et al.*, 2020).

La estructura funcional de la nitrogenasa consiste en 3 cofactores que contienen algún metal, los cuales son; clúster hierro-sulfuro, clúster fósforo y el clúster hierro-

molibdeno (Seefeldt *et al.*, 2018). Los primeros clústeres están implicados en la entrega de electrones al clúster hierro-molibdeno, el cuál funciona como sitio activo para la reducción de nitrógeno en amonio (Sun *et al.*, 2019).

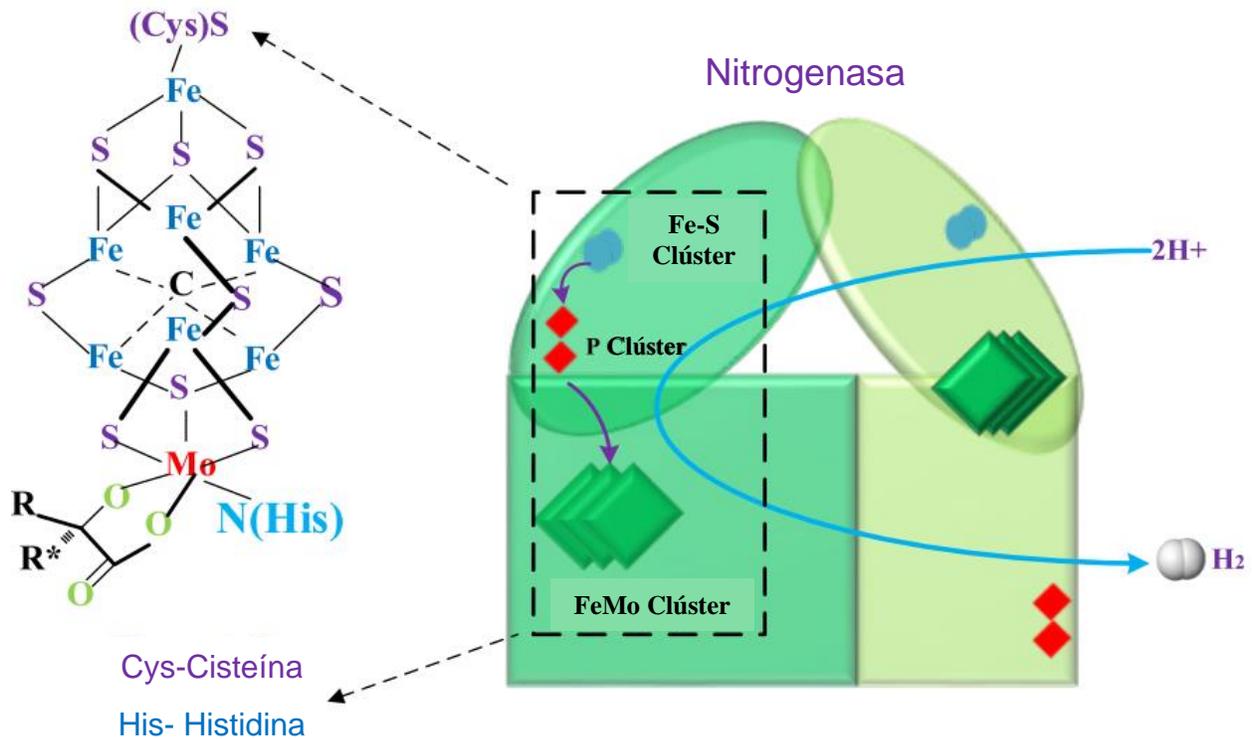


Figura (2). Estructura esquemática de la enzima nitrogenasa. R y R* son ligandos. Óvalos azules representan el clúster hierro-sulfuro, Rombos rojos representan el clúster fósforo y rectángulos verdes representan el clúster hierro-molibdeno, Figura tomada y modificada de Sun *et al.* (2019).

Respecto a las hidrogenasas, estas enzimas son las responsables de sintetizar H_2 y pueden ser empleadas tanto en procesos dependientes de luz como la biofotólisis y en procesos independientes de luz como la fermentación oscura (Sołowski, 2018), existen 3 tipos diferentes de esta enzima, dependiendo de sus sitios activos (Sampath *et al.*, 2020). La hidrogenasa-FeFe está implicada en la síntesis de H_2 , sin embargo también puede llevar a cabo su oxidación (Morra *et al.*, 2017; J. Wang & Yin, 2019), la hidrogenasa-NiFe está implicada en la transferencia de electrones en la cadena transportadora de electrones y también está relacionada al consumo de H_2 (Sun *et al.*, 2019). Por otro lado la hidrogenasa-Fe cataliza la reducción de CO_2 en metano utilizando H_2 (Budiman & Wu, 2018; Kim & Kim, 2011), la estructura

de los sitios activos pertenecientes a los 3 diferentes tipos de hidrogenasas puede apreciarse en la Figura (3).

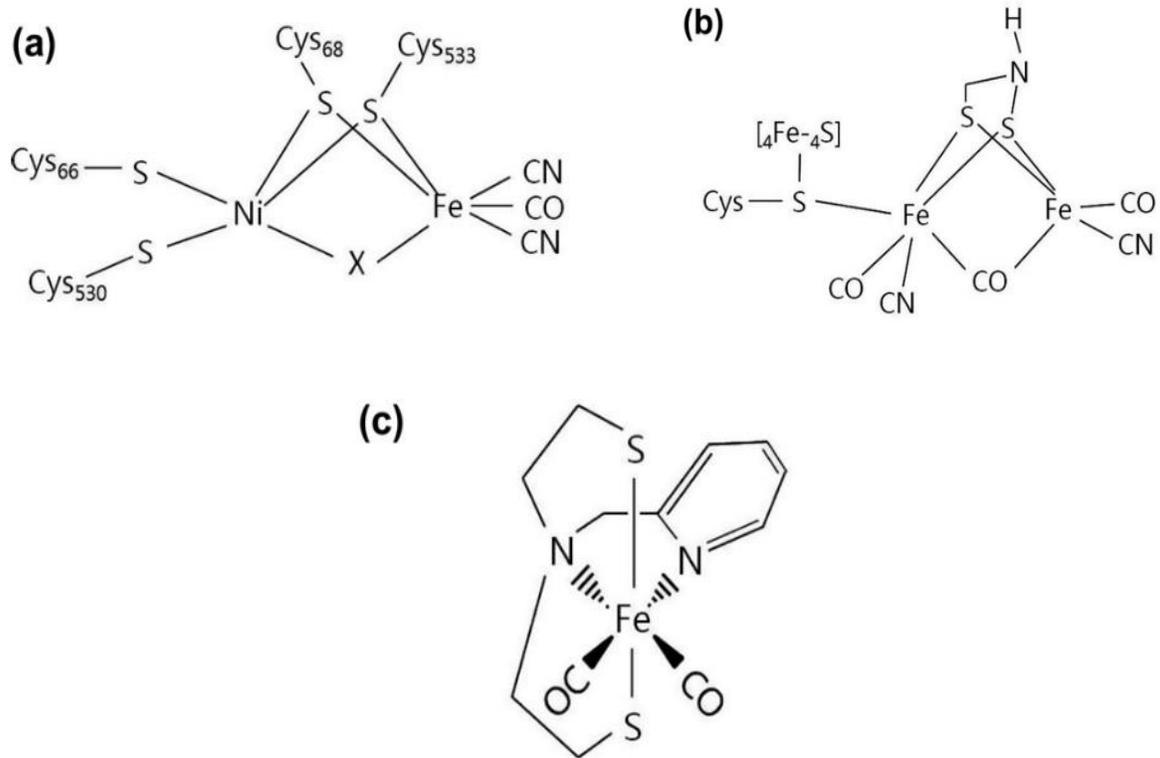


Figura (3). Sitios activos de hidrogenasas. (a) Sitio activo de Hidrogenasa-NiFe, (b) Sitio activo de Hidrogenasa-Fefe, (c) Sitio activo de hidrogenasa-Fe (Budiman & Wu, 2018).

3.5 Biofotólisis

La biofotólisis es un proceso en el cual se dividen las moléculas de agua (H_2O) en O_2 y H_2 , utilizando luz como fuente de energía (Hosseini *et al.*, 2015). La biofotólisis ocurre en el cloroplasto de organismos fotoautótrofos (Sun *et al.*, 2019; Kim & Kim, 2011). Existen dos variantes del proceso, la primera de ellas se denomina Biofotólisis directa, en la cual los electrones derivados de la división del agua, son transferidos a las ferredoxinas por los fotosistemas 1 y 2, posteriormente las ferredoxinas reducidas donan los electrones obtenidos a la enzima nitrogenasa o hidrogenasa para formar H_2 (Chandrasekhar *et al.*, 2015), este proceso puede observarse de manera sintetizada en la Figura (4). La segunda variante del proceso se llama Biofotólisis indirecta, este proceso se lleva a cabo en 2 etapas que se

encuentran separadas entre sí, espacial y/o temporalmente (Kamaraj *et al.*, 2020). En la primera etapa, a partir del proceso fotosintético llevado a cabo por los microorganismos fotoautótrofos se fija CO_2 , cuyo carbono será almacenado en sustratos ricos en hidrógeno como los carbohidratos endógenos (acumulación de carbohidratos). En la etapa posterior, los microorganismos son incubados en condiciones anaerobias, para llevar a cabo la fermentación de los carbohidratos endógenos. Posteriormente la enzima hidrogenasa o nitrogenasa (dependiendo de los microorganismos implicados) llevará a cabo la formación de hidrógeno molecular a partir de los electrones y protones producidos (Yu, 2007; Huesemann & Hausmann, 2009), dicho proceso puede apreciarse de manera sintetizada en la Figura (5).

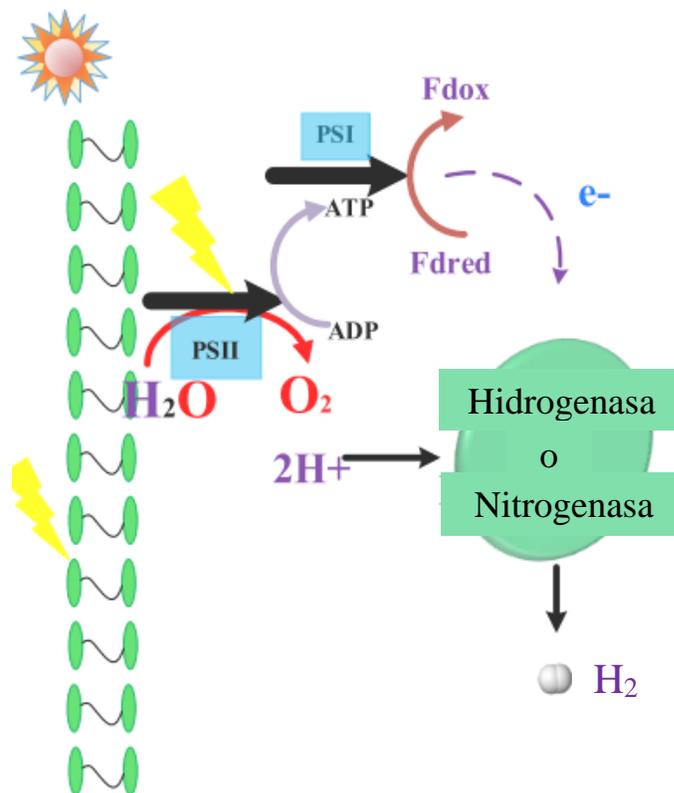


Figura (4). Proceso llevado a cabo en la biofotólisis directa para la obtención de H_2 . PSII representa al fotosistema 2, PSI representa al fotosistema 1, Fdox representa a la ferredoxina oxidada, Fdred representa a la ferredoxina reducida.
Figura tomada y modificada de Sun *et al.*, (2019)

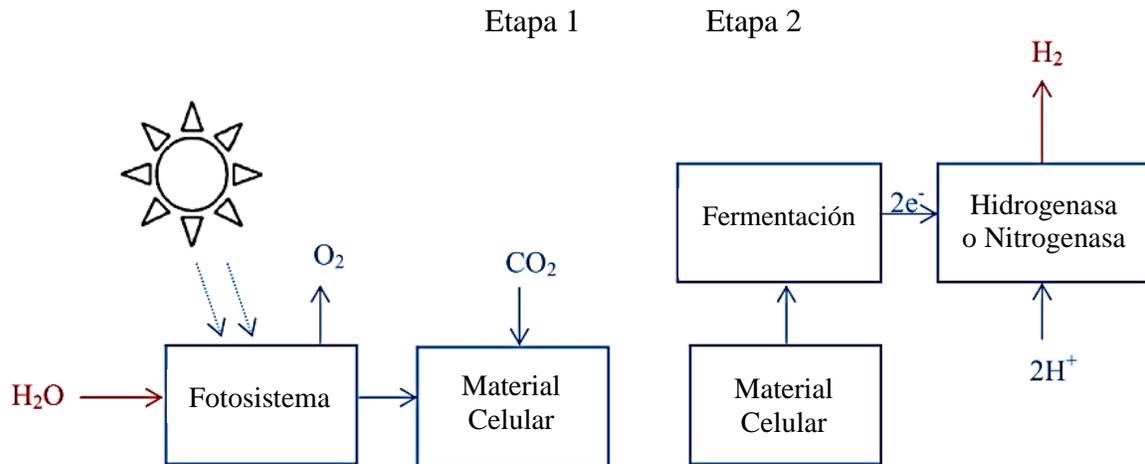


Figura (5). Proceso llevado a cabo en la biofotólisis indirecta para la obtención de H₂.
Figura tomada y modificada de Nikolaidis & Poullikkas, (2017).

3.6 Fotofermentación

La fotofermentación es un proceso anaerobio fotosintético llevado a cabo por bacterias púrpuras no sulfurosas, en el cual se utiliza la luz como fuente de energía para la producción de H₂ y CO₂ (Ghimire *et al.*, 2015). En esta fermentación se degrada un sustrato, principalmente ácidos orgánicos, los cuales serán los donadores de electrones, que serán transferidos a la enzima nitrogenasa mediante la cadena transportadora de electrones y las ferredoxinas, esto resulta en la formación de H₂ (Reungsang *et al.*, 2018; Q. Zhang & Zhang, 2018). Esta fermentación puede utilizar de manera efectiva luz visible (400-700 nm) e infrarrojo cercano (700-950 nm) (Trchounian *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019).

3.7 Celdas de electrólisis microbianas

Uno de los métodos utilizados para la generación de biohidrógeno sin necesidad de luz y a partir de biomasa, son las celdas de electrólisis microbianas, las cuales son dispositivos electroquímicos que pueden transducir la energía química en energía eléctrica por la oxidación de sustratos orgánicos (Kadier *et al.*, 2016). Están compuestas por dos cámaras, en el primer compartimiento (ánodo) los microorganismos, mediante su metabolismo descomponen compuestos orgánicos



en dióxido de carbono, electrones y protones (Kundu *et al.*, 2012). El segundo compartimento o cátodo, tiene un compuesto que sirve como aceptor de los electrones y protones provenientes del primer compartimento, estos compuestos pueden ser oxígeno molecular o ferricianuro de potasio. Ambos compartimentos están separados por membranas de intercambio de protones que permiten solo el paso de las partículas de interés (Vargas *et al.*, 2018).

3.8 Fermentación Oscura

La fermentación oscura, también conocida como fermentación acidogénica de cultivo mixto (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015) es considerada como el proceso más prometedor para la producción de biohidrógeno (Łukajtis *et al.*, 2018), este proceso es independiente de luz y ocurre bajo condiciones anaerobias, donde se degradan compuestos orgánicos para la producción de H₂ (Hosseini *et al.*, 2015). La fermentación oscura ocurre en la naturaleza dentro de un proceso más grande llamado digestión anaerobia, durante este proceso la materia orgánica utilizada como sustrato es degradada por microorganismos en un reactor anaerobio, dando como resultado metano y CO₂ (Tapia-Venegas *et al.*, 2015). La digestión anaerobia tiene 3 pasos; (i) Descomposición de materia orgánica presente en sustratos (ii) Acidogénesis, en la cual mediante la síntesis de ácidos orgánicos (Ácido butírico, ácido acético, ácido valérico, ácido propiónico) ocurre la producción de H₂ mediada por bacterias acidogénicas y acetogénicas (iii) Consumo de ácidos orgánicos y H₂ por organismos metanogénicos para la producción de metano (Wainaina *et al.*, 2019; Ferreira *et al.*, 2019; Rubia *et al.*, 2019). Para que la digestión anaerobia no continúe con la metanogénesis posterior a la acidogénesis y la producción de H₂, se han desarrollado diversos pretratamientos dirigidos al inóculo empleado, para poder eliminar los microorganismos implicados en la generación de metano (Chatellard *et al.*, 2017). Entre estos tratamientos se encuentran; (i) Tratamiento térmico, calentamiento a 90°C durante una hora para que microorganismos metanogénicos que no producen esporas sean eliminados (Júnior *et al.*, 2020), (ii) Tratamientos ácidos y alcalinos para suprimir actividad metanogénica (Zhu & Béland, 2006) y (iii) El tratamiento de enriquecimiento de cultivo mixto por



fermentación natural de aguas residuales, el cual consiste en dejar fermentar el sustrato de interés por 3 días a 25 °C en un recipiente abierto, esta fermentación es llevada a cabo por microorganismos presentes en la atmósfera y por los microorganismos endógenos del sustrato, con lo cual habrá una inhibición de microorganismos metanogénicos y se favorecerá la proliferación de bacterias productoras de H₂ (Fernandes *et al.*, 2013). Por lo tanto la fermentación oscura es considerada un proceso truncado de la digestión anaerobia, ya que nos interesa obtener solamente H₂ y ácidos orgánicos (Becerra, 2008). Este proceso es denominado “fermentación oscura” debido a que emplea microorganismos independientes de luz, que son productores de H₂ y ácidos orgánicos (Trchounian *et al.*, 2017), además esta denominación sirve para diferenciarla de los procesos biológicos de producción de H₂ que sí requieren luz, como la Fotofermentación (Wang *et al.*, 2020; Becerra, 2008). Debido a que la fermentación no requiere de luz y puede emplear una amplia gama de sustratos, además de que puede llevarse a cabo en condiciones de temperatura y presión ambiente, disminuye el costo de producción de hidrógeno aproximadamente 340 veces en comparación a los procesos fotobiológicos (Antonopoulou *et al.*, 2011). En el estilo de vida de crecimiento heterotrófico, los sustratos son descompuestos por oxidación para proveer la energía metabólica necesaria para el crecimiento, esta oxidación genera electrones que deben ser dispuestos en favor de mantener la neutralidad eléctrica, por lo tanto, en ambientes anaerobios como en la fermentación oscura, los protones (H⁺) fungen como aceptores de electrones, siendo reducidos a H₂ (Bagi *et al.*, 2014). La producción de ácidos orgánicos y H₂ mediante fermentación oscura será descrita con detalle posteriormente.

Para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura, los biorreactores pueden funcionar en modo batch o continuo. Los procesos en continuo son más recomendables cuando se consideran aplicaciones industriales debido a su factibilidad económica y su diseño práctico de ingeniería al emplear altas cargas de sustratos (Toledo-Alarcón *et al.*, 2018), sin embargo, en la literatura se encuentran reportados más experimentos en batch debido a su simplicidad para estudiar el proceso de fermentación y su eficiencia (Khanna & Das, 2013).



Los microorganismos productores de H₂ tienen una gran diversidad metabólica ya que son capaces de llevar a cabo diferentes tipos de fermentación dependiendo de las condiciones a las que estén expuestos (Castelló *et al.*, 2020). En el proceso de obtención de biohidrógeno mediante fermentación oscura, se han identificado a 3 géneros principalmente responsables; *Clostridium*, *Bacillus* y *Enterobacter* (Bedoya & Ramirez-morales, 2008). *Clostridium* comúnmente es considerado como el género más abundante y eficiente en la producción de H₂ en los biorreactores (Cabrol *et al.*, 2017). A continuación, en la Tabla (2) se mencionan algunos de los microorganismos que se ha demostrado que participan en la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura.

A parte de las especies mencionadas en la Tabla (2), también se ha reportado que los siguientes géneros están implicados en la producción de biohidrógeno; *Arsenophonus*, *Branneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Erwinia*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Coserella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoutella*, *Salmonella*, *Samsonia*, *Serratia*, *Shigella*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Thorsellia*, *Trabulsiella*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, and *Yokenella* (Łukajtis *et al.*, 2018).

Es posible producir H₂ a partir de diversos sustratos mediante fermentación oscura usando cultivos mixtos o puros, sin embargo al emplear este último tipo de cultivo existen algunas desventajas significativas; la esterilización del sustrato es costosa y altamente demandante de energía, los cultivos puros son sensibles a contaminación por parte de otros microorganismos, además su capacidad para utilizar sustratos complejos como los desechos es limitada (Łukajtis *et al.*, 2018), por otro lado los cultivos mixtos no requieren de condiciones asépticas y pueden utilizar una amplia gama de sustratos, lo cual disminuye el costo del proceso (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015).



Respiración	Género	Especie	Referencia
Anaerobio facultativo	<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>	(Bagi <i>et al.</i> , 2014)
Anaerobio facultativo	<i>Bacillus</i>	<i>macerans</i>	(Łukajtis <i>et al.</i> , 2018)
Anaerobio facultativo	<i>Bacillus</i>	<i>polymyxa</i>	(Łukajtis <i>et al.</i> , 2018)
Anaerobio obligado	<i>Caldicellulosiruptor</i>	<i>saccharolyticus</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>acetobutylicum</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>beijerinckii</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>bifermentans</i>	(Martínez & García, 2010)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	(Martínez & García, 2010)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>paraputrificum</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>pasteurianum</i>	(Ghimire <i>et al.</i> , 2015)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>scatologenes</i>	(Łukajtis <i>et al.</i> , 2018)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>stercorarium</i>	(Ghimire <i>et al.</i> , 2015)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>thermocellum</i>	(Martínez & García, 2010)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>thermosaccharolyticum</i>	(Wang <i>et al.</i> , 2020)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>thermolacticum</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio obligado	<i>Clostridium</i>	<i>welchii</i>	(Bagi <i>et al.</i> , 2014)
Anaerobio obligado	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>geothermicum</i>	(Ghimire <i>et al.</i> , 2015)
Anaerobio facultativo	<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio facultativo	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio facultativo	<i>Escherichia</i>	<i>Coli</i>	(Martínez & García, 2010)
Anaerobio obligado	<i>Megasphaera</i>	<i>elsdenii</i>	(Ohnishi <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio obligado	<i>Pyrococcus</i>	<i>furiosus</i>	(Rittmann <i>et al.</i> , 2015)
Anaerobio facultativo	<i>Rhodobacter</i>	<i>sphaeroides</i>	(Trchounian <i>et al.</i> , 2017)
Anaerobio obligado	<i>Thermoanaerobacterium</i>	<i>thermosaccharolyticum</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio obligado	<i>Thermococcus</i>	<i>kodakaraensis</i>	(Rittmann <i>et al.</i> , 2015)
Anaerobio obligado	<i>Thermotoga</i>	<i>elfii</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)
Anaerobio obligado	<i>Thermotoga</i>	<i>neapolitana</i>	(Ntaikou <i>et al.</i> , 2010)



Tabla (2). Microorganismos implicados en la producción de Biohidrógeno mediante el proceso de fermentación oscura.

Otras ventajas de los cultivos mixtos sobre los cultivos puros son; diversidad metabólica, variabilidad genética, alto rendimiento en la producción de biohidrógeno (Wang *et al.*, 2020), mejor capacidad de adaptación en respuesta a estrés ambiental causado por limitado sustrato así como cambios abruptos de pH y temperatura (Toledo-Alarcón *et al.*, 2020). Debido a los diferentes microorganismos que están presentes en un cultivo mixto, hay una potencial sinergia entre las diferentes rutas metabólicas que pueden llevar a cabo las cepas involucradas, incrementando el rendimiento en la producción de H₂ (Cabrol *et al.*, 2017). Dauptain y colaboradores en el año 2020, demostraron que, al emplear un cultivo mixto proveniente del sustrato, el cual también es denominado como cultivo autóctono, provee de desempeños tan satisfactorios en la producción de H₂ mediante fermentación oscura que no es necesario adicionar microorganismos o cultivos externos. Una ventaja que se tiene al emplear un cultivo mixto, con respecto a un cultivo puro es que se puede trabajar a condiciones ambientales no estériles (Wang *et al.*, 2020). Se ha reportado ampliamente que al emplear los géneros *Clostridium* y *Enterobacter* dentro del inóculo para la fermentación oscura, la temperatura óptima para la producción de H₂, se encuentra en el rango de 37°C y 45 °C (Khanna & Das, 2013). De acuerdo con Herbert *et al.*, (2001), el nivel de pH inicial óptimo para la producción de hidrógeno es 5.5.

Debido a la diversidad de microorganismos que pueden estar implicados en la fermentación oscura, ya sea en cultivos mixtos o cultivos puros, a la amplia gama de sustratos que pueden emplearse y a los diferentes productos que pueden ser obtenidos, el principal modelo para explicar la producción de biohidrógeno vía fermentación oscura es a través de la fermentación de la glucosa (Cabrol *et al.*, 2017; Toledo-Alarcón *et al.*, 2018).

Es importante recalcar que las vías metabólicas descritas a continuación son llevadas a cabo por los microorganismos de manera natural, por citar un ejemplo,



se ha reportado que bacterias pertenecientes al género *Clostridium* producen ácido butírico en el intestino humano (Erik *et al.*, 2018). Estas vías metabólicas en las cuales se produce H_2 y ácidos orgánicos pueden estar implicadas en la fermentación oscura sin que eso signifique que son exclusivas de dicho proceso.

La producción de biohidrógeno comienza con la hidrólisis de sustratos complejos en materia disuelta más simple, entre esos productos la glucosa, este proceso puede llevarse a cabo por bacterias fermentativas hidrolíticas (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015). La glucosa es degradada mediante la glucólisis a ácido pirúvico (Chandrasekhar *et al.*, 2015). En resumen, la glucólisis (Figura 6), dará como resultado 2 moléculas de adenosín trifosfato (ATP), 2 moléculas de piruvato, 2 protones ($2 H^+$), 2 moléculas de dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida (NADH) y 2 moléculas de agua (H_2O) (Nelson & Cox, 2005).

Posteriormente las moléculas de piruvato sufrirán una descarboxilación oxidativa por parte de la enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductasa, produciéndose 2 moléculas de Acetil-CoA, CO_2 y la reducción de las ferredoxinas a partir de las moléculas de NADH, a continuación las ferredoxinas reducidas donarán los electrones obtenidos a la enzima hidrogenasa, que llevará a cabo la formación de hidrógeno gaseoso a partir de los protones ($2H^+$) producidos en pasos anteriores y los electrones acarreados por las ferredoxinas (Ghimire *et al.*, 2015). Se generará un mol de biohidrógeno por cada mol de ferredoxina reducida, o en todo caso, también se puede decir que se generará un mol de biohidrógeno a partir de la oxidación de un mol NADH a NAD^+ por parte de la enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (Blanco & Rodríguez, 2012; Toledo-Alarcón *et al.*, 2018), dicho proceso puede apreciarse en la Figura (7). Es importante aclarar que la reacción llevada a cabo por la enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductasa ocurre en microorganismos anaerobios obligados (Balachandar *et al.*, 2013), posteriormente se explicará el proceso para anaerobios facultativos.

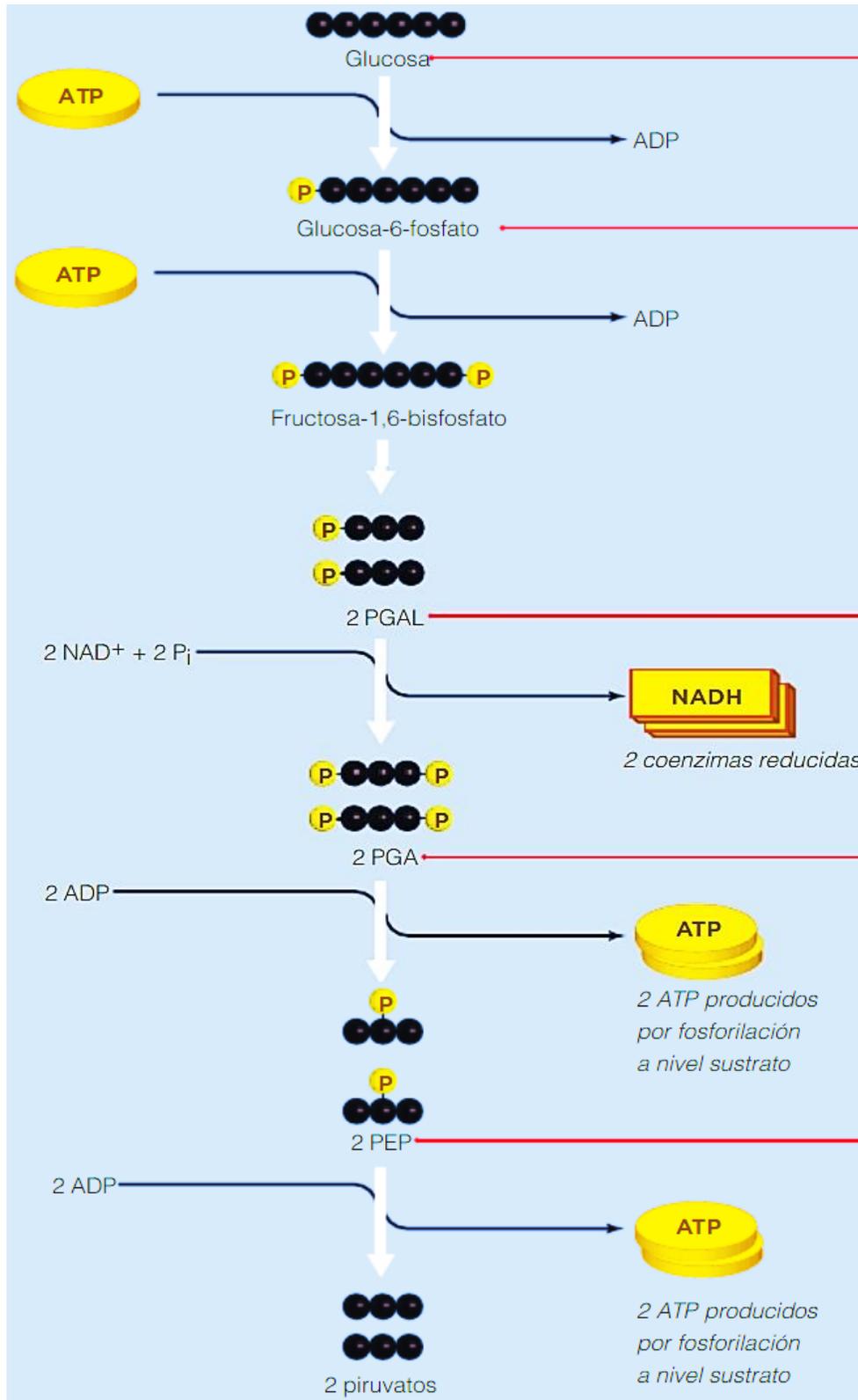
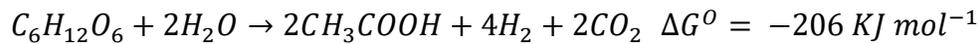


Figura (6). Glucólisis. ATP; Adenosín trifosfato, ADP; Adenosín difosfato NAD; Dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado, NADH; Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido, PGAL; Gliceraldehído-3-fosfato, PGA; 1,3-Bisfosfoglicerato, PEP; 2-fosfoenolpiruvato, Pi; Fósforo inorgánico. Figura tomada y modificada de Starr *et al.*, 2009.

A partir de las moléculas de Acetil-CoA se sintetizarán 2 moléculas de ácido acético mediante las reacciones llevadas a cabo por las enzimas fosfotransacetilasa y acetato quinasa, con lo cual también se generarán dos moléculas de ATP (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015). De forma general, la formación de acetato y biohidrógeno a partir de una molécula de glucosa es un proceso de oxido reducción y la fermentación es llevada a cabo en medio acuoso, además de la formación de 2 moléculas de H₂O durante la glucólisis y el cambio en el nivel de pH debido a la acidogénesis, por tal motivo la reacción general es representada mediante la ecuación (2); ampliamente aceptada como referencia para la estimación de la producción teórica del hidrógeno y acético, vía fermentación oscura (Khanna & Das, 2013; Castelló *et al.*, 2020).



Ecuación (2)

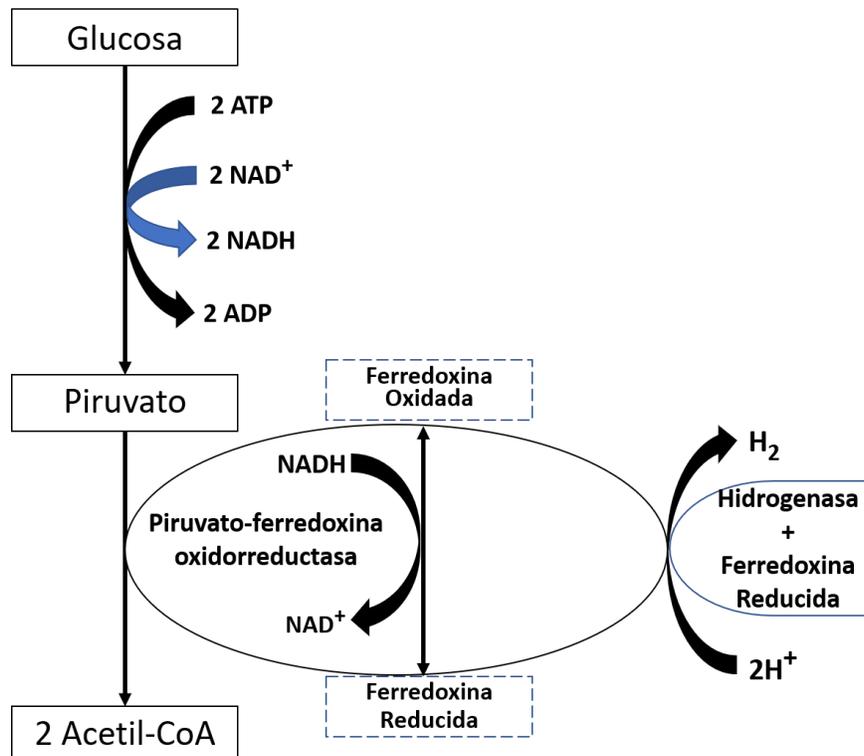


Figura (7). Reacción llevada a cabo por la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa
Figura tomada y modificada de Cabrol *et al.*, (2017)



Obteniendo con ello una producción global de 4 mol de biohidrógeno por cada mol de glucosa consumido. Este rendimiento teórico es obtenido solo si, el único ácido graso volátil (AGV) producido es el ácido acético, además de producirse también 2 mol de CO₂ (Ecuación 2) (Mishra *et al.*, 2019). La energía libre Gibbs de esta reacción tiene un valor negativo, por lo tanto, la generación de productos no tiene necesidad de requerimientos energéticos externos (Lee *et al.*, 2008). El proceso anteriormente descrito puede ser apreciado de manera sintetizada en la Figura (8).

Por otro lado, en caso de que la producción de biohidrógeno y ácido acético mediante fermentación oscura sea llevada a cabo por organismos anaerobios facultativos, las moléculas de piruvato producidas en la glucólisis serán convertidas en Acetil-CoA y en ácido fórmico mediante la enzima piruvato formato liasa. Posteriormente la molécula de ácido fórmico será transformada en moléculas de biohidrógeno y de dióxido de carbono por la enzima formato-hidrogeno liasa (Tapia-Venegas *et al.*, 2015). Bajo condiciones ácidas en el ambiente, la molécula de ácido fórmico será transformada en moléculas de biohidrógeno y de dióxido de carbono por la enzima formato-hidrogeno liasa, con el objetivo de mantener el pH del sistema y reducir la concentración de ácido fórmico en la célula. Este procedimiento es común en el metabolismo de enterobacterias como *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli* (Toledo-Alarcón *et al.*, 2018; Cabrol *et al.*, 2017; Ntaikou *et al.*, 2010). El Acetil-CoA obtenido seguirá las transformaciones posteriores para producir ácido acético. A través de este proceso se obtiene un rendimiento teórico de 2 mol de biohidrógeno por cada mol de glucosa consumido (Blanco & Rodríguez, 2012).

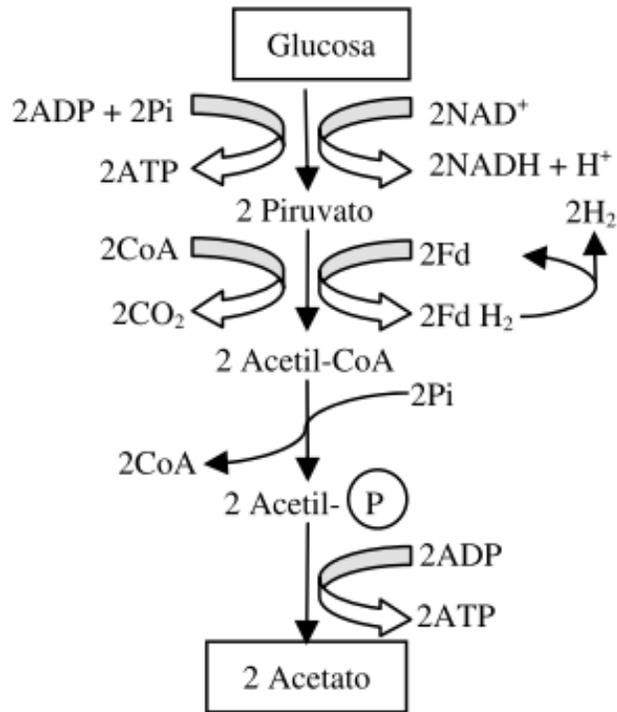


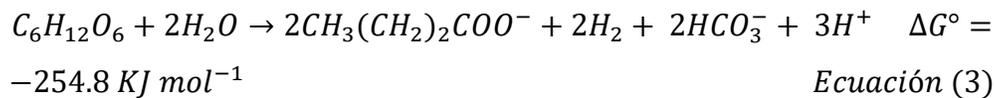
Figura (8). Ruta metabólica de síntesis de ácido acético mediante fermentación oscura. Síntesis de 2 moléculas de acetato y generación de biohidrógeno a partir de glucosa (Blanco & Rodríguez, 2012).

El proceso hasta ahora explicado se enfoca en la producción de biohidrógeno y acetato a partir de glucosa, sin embargo, la fermentación oscura cuenta con diversas rutas que pueden generar productos diferentes al ácido acético. Una de esas rutas es la producción de ácido butírico a partir de glucosa (Lee *et al.*, 2008). El proceso sigue el mismo camino que la producción de ácido acético, hasta la formación de Acetil-CoA, a partir de este punto difiere y sigue otro camino, la molécula de acetil-CoA es transformada a 3-hidroxi-butiril-CoA mediante la oxidación de una molécula de NADH, posteriormente la molécula producida sufre una deshidratación, resultando en la molécula crotonil-CoA, el siguiente paso consiste en reducir al crotonil-CoA mediante la oxidación de una molécula de NADH, resultando en la formación de butiril-CoA; esta molécula sufrirá una fosforilación, dando origen al butirilo de fosfato y a través de la generación de ATP, mediante una molécula de ADP, el butirilo de fosfato será transformado en butirato.

Estas reacciones son llevadas a cabo por el complejo enzimático butiril-CoA deshidrogenasa/Etf (Li *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2019). Debido a que las moléculas de



NADH producidas en la glucólisis son empleadas para la transformación de acetil-CoA en butirato, el rendimiento teórico para este proceso es 2 mol de biohidrógeno por cada mol de glucosa consumido (Blanco & Rodríguez, 2012) La reacción de este proceso está representada en la ecuación (3) (Mishra *et al.*, 2019); mientras que en la Figura (9) se puede apreciar de forma sintetizada la ruta seguida para la producción de ácido butírico y biohidrógeno a partir de una molécula de glucosa (Kumar *et al.*, 2018).



Dependiendo de las condiciones de cultivo, así como el tipo de microorganismos, se puede generar simultáneamente ácido acético y ácido butírico, obteniendo un rendimiento teórico entre 2 y 4 mol de biohidrógeno por cada molécula de glucosa consumido (Blanco & Rodríguez, 2012). En este proceso se sigue el mismo camino que la producción del ácido acético y ácido butírico convencional, hasta la formación de Acetil-CoA, a partir de este punto difiere y sigue un rumbo cíclico; el acetil-CoA es transformado a butiril-CoA mediante el complejo enzimático; flavoproteína de transferencia de electrones butiril-CoA deshidrogenasa, donde también ocurre la reducción de una molécula de ferredoxina a expensas de dos moléculas de NADH. Posteriormente la ferredoxina reducida dona los electrones obtenidos a la enzima hidrogenasa-FeFe, la cual formara biohidrógeno a partir de los protones (2H⁺) producidos en procesos anteriores (Li *et al.*, 2008). A continuación el butiril-CoA reaccionará con una molécula de ácido acético produciendo una molécula de ácido butírico y una molécula de acetil-CoA, la cual servirá para reiniciar el ciclo (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015). Este proceso es llevado a cabo principalmente por géneros *Clostridium*, *Butyrivibrio* y *Bacillus* (Taheri *et al.*, 2018).

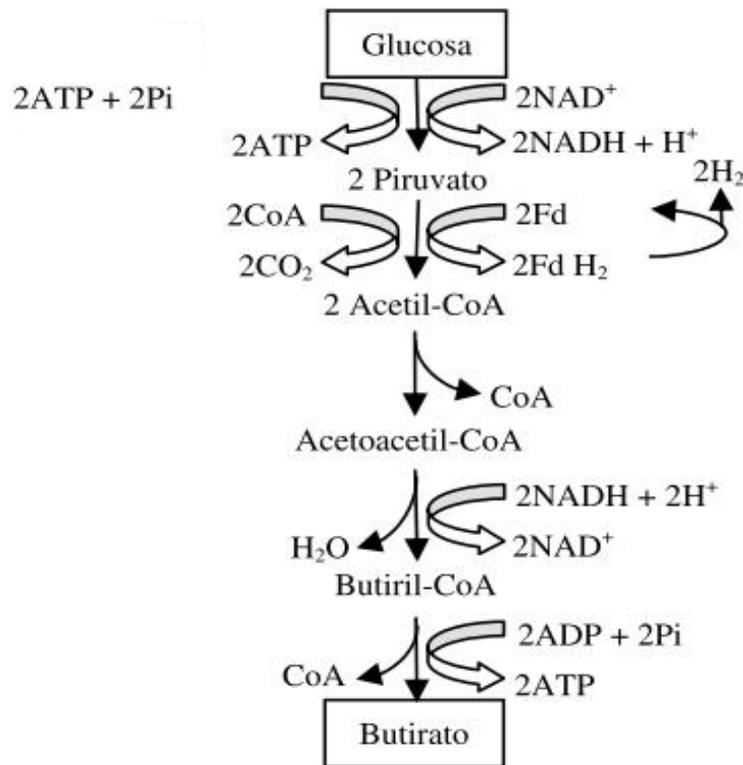


Figura (9). Ruta metabólica de síntesis de ácido butírico mediante fermentación oscura. Síntesis una molécula de butirato y generación de biohidrógeno a partir de glucosa (Blanco & Rodríguez, 2012).

A partir de las rutas de producción de biohidrógeno previamente descritas, se ramifican otras rutas alternas en las cuáles se producen ácidos orgánicos y solventes, que pueden tener una nula producción de biohidrógeno o en algunos casos consumir el biohidrógeno producido por las rutas principales (Saady, 2013). Una de esas rutas es la producción de butanol a partir del compuesto butiril-CoA, intermediario en la producción de ácido butírico, que a expensas de la oxidación de una molécula de NADH, el butiril-CoA se transforma en butanol (Toledo-Alarcón *et al.*, 2018). Este proceso es una ruta de consumo de biohidrógeno y puede llevarse a cabo como continuación de la producción conjunta de acetato-butirato (Taheri *et al.*, 2018), o simplemente ser una fermentación mixta butirato-butanol (Łukajtis *et al.*, 2018). La producción de butanol se ve favorecida por niveles de pH inferiores a 5 (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015), mientras que a niveles iniciales de pH entre 4 y 6 se favorece la producción de ácido butírico y ácido acético. De acuerdo con Herbert y colaboradores en el año 2001, el nivel de pH inicial óptimo para la producción de hidrógeno es 5.5. Por otro lado, cuando el nivel de pH inicial es



superior a 6 la producción de hidrógeno se inhibe (Khanal *et al.*, 2004). La reacción para la producción de butanol se encuentra representada en la ecuación (4) (Kumar *et al.*, 2018).



Ecuación (4)

Otro alcohol que puede ser producido mediante fermentación oscura es el etanol y se deriva a partir de la reducción de Acetil-CoA mediante la oxidación de una molécula de NADH. En comparación con el butanol, la producción de etanol no consume biohidrógeno (Blanco & Rodríguez, 2012; Toledo-Alarcón *et al.*, 2018). Dependiendo de las condiciones, la formación de etanol por fermentación oscura puede llevar a cabo o no, la producción de biohidrógeno. La síntesis de etanol a partir de Acetil-CoA puede reducir a las ferredoxinas, con lo cual se puede producir biohidrógeno. En la producción conjunta de etanol-acetato por fermentación oscura se obtiene un rendimiento de 2 mol de biohidrógeno por mol de glucosa consumida (Taheri *et al.*, 2018). Por otro lado, la fermentación llevada a cabo por microorganismos como *Clostridium barkeri* en la que se lidera solamente la producción de etanol, no hay formación de biohidrógeno (Ghimire *et al.*, 2015). La reacción de generación de etanol y biohidrógeno a través de la fermentación oscura está representada por la siguiente ecuación (5) (Kumar *et al.*, 2018).

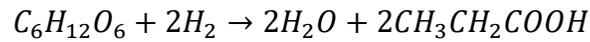


Ecuación (5)

A partir del ácido pirúvico producido por la glucólisis, se desprende otra ruta en la cual las moléculas de piruvato son reducidas en 2 moléculas de lactato mediante la oxidación de moléculas de NADH, posteriormente habrá una reducción de las moléculas de lactato mediante la oxidación de 2 moléculas de NADH, produciendo 2 moléculas de ácido propiónico. Esta ruta es consumidora de biohidrógeno, en la cual se consume un mol de H₂ por cada mol de glucosa que es utilizado para la producción de ácido propiónico (Kim & Kim, 2011). La reacción de la producción de



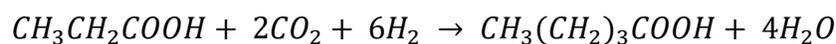
ácido propiónico a partir de una molécula de glucosa y de biohidrógeno está representada en la ecuación (6) (Weber & Lipman, 2019).



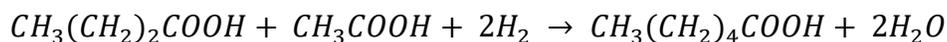
Ecuación (6)

El ácido succínico, es un ácido orgánico que ha sido detectado como producto de la fermentación oscura (Sydney, 2013; Palomo-Briones *et al.*, 2017). La síntesis de este ácido orgánico involucra una serie de reacciones en las cuales se encuentran como intermediarios; el piruvato, oxalacetato, malato y fumarato, además se ha detectado que esta ruta es consumidora de biohidrógeno (F. Zhang *et al.*, 2013). El ácido succínico también puede dar origen al ácido propiónico (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2015) a través una serie de reacciones que involucran una descarboxilación mediada por la enzima metilmalonil-CoA descarboxilasa y posteriormente la acción de la enzima propionato-CoA transferasa dará como resultado al ácido propiónico (E. Hosseini *et al.*, 2011).

Otros ácidos orgánicos que pueden ser producidos dentro de la fermentación oscura y cuya síntesis consume biohidrógeno, son el ácido valérico y el ácido caproico, las reacciones de producción pueden apreciarse en las ecuaciones (7) y (8), respectivamente (Rosa & Silva, 2017; Feng *et al.*, 2018).



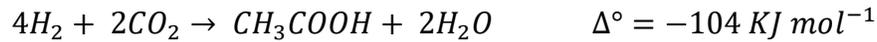
Ecuación (7)



Ecuación (8)

Dentro de las vías metabólicas que pueden estar implicadas en el proceso de fermentación oscura y que pueden consumir H₂ se encuentra la homoacetogénesis, la cual no debe ser confundida con la acetogénesis (producción de ácido acético y H₂ mediada por organismos heterótrofos). La homoacetogénesis produce ácido acético a través de la reducción de O₂ a expensas de una molécula de H₂,

disminuyendo con ello el rendimiento en la producción de biohidrógeno (Saady, 2013; Buitrón *et al.*, 2020). La reacción de homoacetogénesis puede ser visualizada en la ecuación (9) (Castelló *et al.*, 2020). El proceso sintetizado de la homoacetogénesis puede ser observado de en la Figura (10).



Ecuación (9)

Los microorganismos homoacetogénicos pueden estar ampliamente distribuidos en ambientes anaerobios y presentan una problemática de consumo de biohidrógeno dentro de los sistemas de fermentación oscura, ya que estos microorganismos pueden pertenecer a los principales géneros productores de H₂ como *Clostridium* (Montoya-Rosales *et al.*, 2019; Castelló *et al.*, 2020), otros géneros que se han relacionados con la homoacetogénesis son *Acetobacterium*, *Butyribacterium*, *Peptostreptococcus*, *Sporomusa* y *Eubacterium* (Tapia-Venegas *et al.*, 2015).

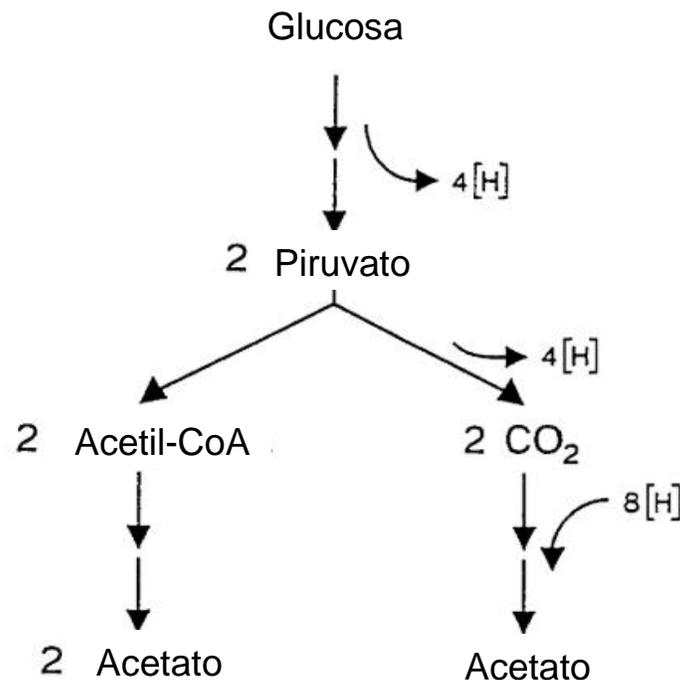


Figura (10). Proceso sintetizado de la homoacetogénesis, tomado y modificado de (Diekert & Wohlfarth, 1994).



3.8.1 Valorización de desechos vía Fermentación Oscura

La valorización de desechos mediante fermentación oscura es una aplicación biotecnológica que tiene ventajas económicas y ambientales, al transformar este tipo de material en productos de alto valor que pueden ser utilizados por la humanidad, en este caso el biohidrógeno (Liguori *et al.*, 2013).

Una de las ventajas de la fermentación oscura es que puede utilizar una amplia gama de substratos ricos en materia orgánica para la producción de biohidrógeno como; biomasa lignocelulósica, residuos agrícolas ricos en almidón, residuos orgánicos municipales, aguas residuales de industrias alimenticias y efluentes industriales (Ghimire *et al.*, 2015; Łukajtis *et al.*, 2018; Sarangi & Nanda, 2020). Esta cualidad de la fermentación oscura es muy importante ya que puede valorizar desechos provenientes de diversos procesos, y al ser bio transformados terminan en un estado más amigable con el ambiente (Skaggs *et al.*, 2018; Srivastava *et al.*, 2020; Syahirah *et al.*, 2020; Rai & Singh, 2016). Por tal motivo otra de las aplicaciones de la fermentación oscura es el tratamiento de aguas residuales; urbanas, agrícolas, así como de las industrias de alimentos y de biomasa (Słupek *et al.*, 2019). El uso de materia prima de bajo costo es esencial para obtener tecnologías biológicas costo-efectivas para la producción de H₂ (Chatellard *et al.*, 2017). En la tabla (3), pueden apreciarse algunos desechos empleados como sustrato para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura.

Residuo empleado como sustrato	Referencia
Bagazo de agave	Montoya-Rosales <i>et al.</i> , 2019
Estiércol porcino	Tian <i>et al.</i> , 2019
Desechos alimenticios de comida rápida	Tian <i>et al.</i> , 2019
Residuos de panadería	Blanco & Rodríguez, 2012
Estiércol de elefante	Blanco & Rodríguez, 2012
Aguas residuales de bodega de arroz	Elbeshbishy <i>et al.</i> , 2017
Aguas residuales de cervecería	Trchounian <i>et al.</i> , 2017
Residuos sólidos municipales industriales que contienen principalmente butirato y acetato	Trchounian <i>et al.</i> , 2017
Aguas residuales de ganado	Łukajtis <i>et al.</i> , 2018
Desperdicio de algodón	Sołowski <i>et al.</i> , 2020



Aguas residuales fábrica de bebidas de café	Balachandar <i>et al.</i> , 2013
Aguas residuales de destilería	Balachandar <i>et al.</i> , 2013
Vinazas tequileras	García-Depraect & León-Becerril, 2018
Vinazas vitivinícolas	Albarrán-Contreras, 2017

Tabla (3). Algunos de los residuos empleados como sustrato en la fermentación oscura, reportados en bibliografía.

En el presente proyecto de investigación se emplearon vinazas vitivinícolas como sustrato en la fermentación oscura, por tal motivo el siguiente apartado provee de información sobre este desecho.

3.8.2 Vinazas vitivinícolas como sustrato en la producción de biohidrógeno

Uno de los productos más antiguos que se conocen, a partir de procesos fermentativos en el cual los microorganismos tienen un papel primordial, es el vino. El vino es una bebida fermentada que ha sido degustada por la humanidad desde hace siglos y aunque al inicio no se sabía de todos los procesos bioquímicos implicados en su elaboración, ni de la participación de los microorganismos, se le considera como uno de los primeros productos biotecnológicos junto con la cerveza, el pan, el vinagre y el queso (Bhatia & Goli, 2018; B. H. Lee, 2015). La evidencia más antigua que se tiene acerca de la elaboración del vino y su almacenamiento data del periodo neolítico, aproximadamente 8500 años antes de nuestra era en Egipto (Li *et al.*, 2018). El vino se obtiene por la fermentación alcohólica total o parcial del jugo de uvas sanas y maduras. Tiene un contenido de etanol entre el 7 y 20 % (v/v), según el tipo de vino (Matei, 2016). Sus componentes endógenos o naturales, provenientes de la uva, así como de los procesos de fermentación, envejecimiento y almacenamiento son; agua, etanol, glicerina, azúcares, alcoholes, ácidos, compuestos fenólicos o polifenoles, compuestos nitrogenados, compuestos volátiles, lípidos, vitaminas y sales minerales. Entre los compuestos añadidos exógenamente a la uva, al mosto o al vino, para favorecer la vinificación se encuentran; sulfitos, enzimas pectolíticas y trazas de metales, los cuales sirven para prevenir la aparición de microorganismos indeseables o alteraciones (Moreno, 2011).



En el año 2018 la producción mundial de vino fue de 2.9×10^{10} L (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2019), mientras que el último dato reportado sobre la producción de vino en México es de 4×10^7 L, colocándose como el 45° lugar en cuanto a producción mundial, además a partir del año 2013 la tasa de crecimiento anual en producción de vino ha sido del 8% y a partir de la Ley de Fomento Vitivinícola promulgada en mayo del 2018, se buscará la duplicación de la superficie de terreno dedicado a la producción de uva y con ello también un aumento considerable en la producción de vinos mexicanos (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2017; Aurand, 2017). Actualmente el estado de Querétaro es el segundo lugar en producción de vino a nivel nacional (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015), obteniendo aproximadamente 2.6×10^6 L de vino al año (Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, 2017). Por otro lado, el continuo crecimiento en la producción conlleva al aumento en la generación de efluentes de esta actividad, ya que se estima que por cada L de vino producido se generan alrededor de 0.2-4 L de efluentes, produciéndose entre 5.2×10^5 y 1×10^7 L de efluentes en Querétaro y a nivel nacional aproximadamente 1.6×10^8 L. Dentro de los efluentes vitivinícolas se encuentran las lías, las cuales son residuos generados en la sedimentación posterior al proceso de fermentación y están compuestas por una fracción sólida (restos de precipitados de biomasa, carbohidratos, proteínas y sales de ácidos orgánicos) y una fracción líquida conformada por el vino residual fermentado, el cual es rico en ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y etanol (Pérez, *et al.*, 2015). Las vinazas vitivinícolas son el residuo obtenido por la destilación de las lías del vino, llevada a cabo para la recuperación de etanol (Zacharof, 2016; Melamane *et al.*, 2007). Están conformadas por una fase líquida y una fase sólida. Entre los componentes de las vinazas se encuentran; agua, microorganismos, sólidos, aproximadamente el 50% de los sólidos disueltos llegan a ser carbohidratos, compuestos no volátiles provenientes de la fermentación, compuestos fenólicos y polifenólicos, compuestos nitrogenados, fósforo, sulfatos, cloruros, alta concentración relativa de sales minerales que le otorgan a las vinazas una alta conductividad electrolítica ($250-300 \text{ dS m}^{-1}$), cenizas, etanol, glicerol, ácido láctico y ácido acético (Pérez, *et al.*, 2015). Debido a que las vinazas vitivinícolas contienen



residuos de la pulpa y cascarilla de la uva, así como del vino, es altamente probable que las vinazas vitivinícolas contengan carbohidratos residuales de estas fuentes (Conde-Bueno *et al.*, 2009). En el vino tinto los carbohidratos que han sido detectados son; arabinosa, ramnosa xilosa, manosa, fructosa, fucosa, galactosa, manitol, melecitosa, sucrosa, glucosa (Bernal *et al.*, 1996) y arabinans, las cuales son polímeros de cadenas de arabinosas (Madalena *et al.*, 2014). Las vinazas son de color oscuro, tienen un nivel de pH en un rango de 3.5 a 5. Su carga de contaminantes orgánicos es muy alta con valores elevados de demanda bioquímica de oxígeno ($35 \times 10^3 - 5 \times 10^4$ mg O₂/L) y demanda química de oxígeno ($7 \times 10^4 - 1.5 \times 10^5$ mg/L). Debido a sus características, las vinazas, son un efluente altamente agresivo y recalcitrante, cuya descarga directa en cuerpos de agua o tierras causa un impacto ambiental (Zavala, 2020; Robles-González *et al.*, 2012). La alta carga recalcitrante de origen orgánico e inorgánico que está presente en las vinazas es un potencial contaminante al ambiente ya que provoca agotamiento de oxígeno, además de aumentar los niveles de salinidad y toxicidad iónica específica para los componentes ambientales del lugar en donde fue depositado el desecho, también se ha demostrado que puede filtrarse a través de la tierra y contaminar aguas subterráneas (Rajagopal *et al.*, 2014).

Los componentes de las vinazas vitivinícolas favorecen el uso de este sustrato en procesos de producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura y al darle un uso importante a este efluente contaminante se obtienen beneficios ambientales acoplados: producción de un biocombustible prometedor y el tratamiento biológico del efluente, reduciendo su impacto ambiental (Buitrón *et al.*, 2020). Además de potenciales beneficios económicos, ya que la producción de biohidrógeno a partir de desechos favorece la rentabilidad y factibilidad de esta tecnología (Chatellard *et al.*, 2017). La composición de vinazas vitivinícolas se puede apreciar en la Tabla (4). El empleo de las vinazas vitivinícolas como sustrato en la producción de biohidrógeno ha sido estudiado en algunas investigaciones, lo cual será explicado en el apartado de Antecedentes.

Parámetro	Vinazas de lias vitivinícolas ¹	Lías de vino blanco ²	Vinazas de Tequila ³	Vinazas de Tequila ⁴
pH	3.8	3.5	3.6	3.4
Sólidos totales (g/L)	171.5	57.5	52.2	50
Sólidos totales volátiles (g/L)	152.7	51.1	48.5	ND
Sólidos suspendidos (g/L)	145.3	35	24.7	ND
Sólidos suspendidos fijos (g/L)	ND	2.2	ND	2
Sólidos suspendidos volátiles (g/L)	141	32.7	ND	7.5
Demanda biológica de oxígeno (g/L)	67.5	55.5	32.1	60
Demanda química de oxígeno (g/L)	122	252.4	72.3	100
Carbono total (g/L)	84.4	ND	ND	ND
Carbono soluble (g/L)	ND	49.6	ND	ND
Nitrógeno orgánico (g/L)	17	ND	ND	0.01
Nitrógeno total (g/L)	17.4	ND	0.2	0.05
Nitrógeno amoniacal (g/L)	0.5	ND	ND	0.04
Nitrógeno soluble total (g/L)	ND	0.5	ND	ND
Fósforo total (g/L)	7.4	0.35	ND	0.7
Fósforo soluble total (g/L)	ND	0.28	ND	ND
Sulfatos (g/L)	1.2	0.17	1	ND
Cloruros (g/L)	1.8	0.10	ND	ND
Carbohidratos totales (g/L)	1.5	33	25.1	ND
Carbohidratos solubles (g/L)	1.2x10 ⁻²	ND	ND	ND
Total, de Proteínas (g/L)	32.2	ND	ND	ND
Total, de lípidos (g/L)	12.25	ND	ND	ND
Potasio (g/L)	0.2	ND	ND	.65
Sodio(g/L)	0.08	ND	ND	ND
Calcio (g/L)	0.24	ND	ND	ND
Magnesio (g/L)	0.05	ND	ND	0.3
Hierro total (g/L)	ND	1.8x10 ⁻⁴	ND	0.04
Cobre (g/L)	1.2x10 ⁻³	4.8x10 ⁻⁵	ND	ND
Plomo (g/L)	2x10 ⁻⁵	ND	ND	ND
Zinc (g/L)	0.02	7.3x10 ⁻⁴	ND	1x10 ⁻³
Níquel (g/L)	ND	1.3 x10 ⁻⁴	ND	2x10 ⁻⁵
Cobalto (g/L)	ND	6x10 ⁻⁴	ND	ND
Fenoles solubles (g/L)	ND	0.2	0.35	ND

Tabla (4). Determinación de la composición de vinazas vitivinícolas. ¹Vlyssides *et al.*, 2010; ²Albarrán-Contreras, 2017; ³(García-Depraect *et al.*, 2019) ;(López-López *et al.*, 2010). ND: No determinado

Los componentes principales de las vinazas vitivinícolas; carbohidratos, glicerol, ácidos acético y láctico, han sido empleados como sustrato en investigaciones para la producción de biohidrógeno, algunos de estos trabajos son descritos a continuación, la razón de ello es para proporcionar un antecedente teórico ya que en el presente proyecto de investigación se estudiará el aporte por separado de los



sustratos mencionados, en la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura; Un estudio realizado por Amin y colaboradores en año 2016, evaluó la producción de H₂ empleando como sustratos diferentes carbohidratos; glucosa, fructosa y sacarosa, obteniendo los siguientes resultados respectivamente; 1552, 1487 y 1366 mL de H₂. La reacción estequiométrica al emplear glucosa como sustrato y el rendimiento teórico han sido ampliamente descritos en el apartado 3.8, por otro lado se ha reportado que se obtienen 2.3 mol de H₂ por cada mol de sacarosa empleado (Güne *et al.*, 2017), mientras que al utilizar como sustrato a la fructosa se pueden obtener 1.84 mol de H₂ por cada mol de este carbohidrato (Quéméneur *et al.*, 2011).

El glicerol es un químico valorado por su amplio uso en cosméticos. Puede ser obtenido como desecho de la producción industrial de biodiesel, generando grandes cantidades de este compuesto que requieren de un lugar de depósito (Ntaikou *et al.*, 2010). Se ha reportado la producción de biohidrógeno utilizando glicerol como sustrato, con un rendimiento máximo teórico de 1 mol H₂/mol de glicerol (Lo *et al.*, 2013). Un estudio realizado por investigadores de China y Japón propone una reacción estequiométrica a partir de un experimento en el cual se utilizó un cultivo puro de *Enterobacter*, dicha reacción está representada en la ecuación (10) (Akutsu *et al.*, 2009).



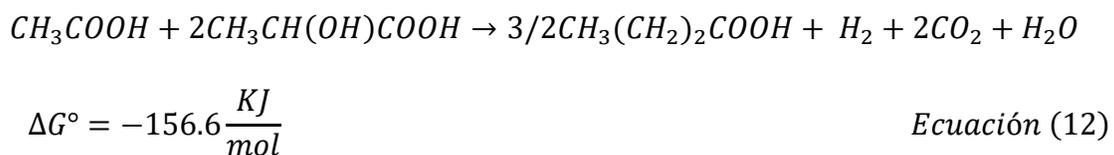
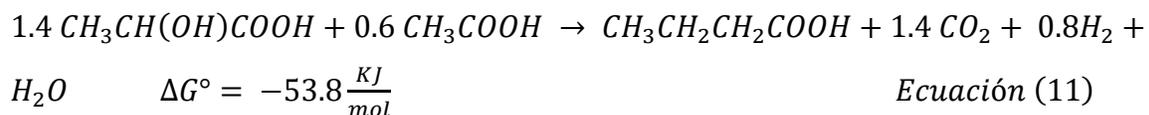
Ecuación (10)

Se han llevado a cabo estudios en los cuáles se ha comprobado la factibilidad de utilizar el glicerol como sustrato para la producción de H₂, por citar algunos ejemplos, Sarma *et al.* (2016) demostraron que se obtiene un mejor rendimiento al emplear glicerol crudo en comparación a glicerol puro, mientras que un estudio realizado por Toledo-Alarcón *et al.* (2020) mostró los efectos que tienen la procedencia del inóculo y el pretratamiento empleado en la producción de H₂, al utilizar glicerol como sustrato. Compararon el inóculo proveniente de un lodo anaerobio (Reactor anaerobio estabilizador de lodos) y el inóculo de un lodo aerobio (Proveniente de un reactor de lodo activado), también compararon el pretratamiento de shock térmico



de 105°C por 2 horas con respecto al pretratamiento de aireación por 4 semanas, los resultados en la producción de H₂ mostraron que el lodo aerobio no requiere pretratamiento y con el inóculo anaerobio el shock término aumenta su desempeño. El mecanismo por el cual puede incorporarse el glicerol como sustrato en la vía glucolítica es mediante el siguiente proceso; la molécula de glicerol sufre una oxidación mediante la reducción de una molécula de NAD⁺ en NADH, dando como resultado una molécula de dihidroxiacetona, esta reacción es catalizada por la enzima glicerol-deshidrogenasa. El siguiente paso consiste en fosforilar a la molécula de dihidroxiacetona a expensas de una molécula de ATP, reacción catalizada por la enzima DHA quinasa, dando como resultado a la molécula dihidroxiacetona-fosfato, la cual forma parte de la glucólisis y rápidamente es isomerizada en la molécula gliceraldehido-3-fosfato continuando con la ruta previamente explicada. Se ha reportado que utilizar el glicerol como sustrato en fermentaciones realizadas por cultivos puros, aumenta la concentración intracelular de ATP y NADH, lo que contribuye a una mayor producción de ácidos orgánicos (Akutsu *et al.*, 2009).

Por otro lado, también se ha estudiado la producción de biohidrógeno utilizando como sustrato una mezcla de ácido acético y ácido láctico, empleando a microorganismos como; *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium diolis* y *Clostridium acetobutylicum* (Matsumoto & Nishimura, 2007). Este proceso fermentativo da como resultado la producción de H₂ y ácido butírico. Aunque aún hay incertidumbre de la ruta metabólica del lactato-acetato en la fermentación oscura, se han propuesto las siguientes reacciones químicas del proceso, representadas en las ecuaciones (11) y (12) (Castelló *et al.*, 2020).





A pesar de esta incertidumbre en la interacción de ambos ácidos, se conoce la forma en la cual el ácido láctico puede ser empleado como sustrato de la fermentación. En un proceso que es llevado a cabo por microorganismos del género *Clostridium*, el cual tiene la enzima lactato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ . Esta enzima cataliza la oxidación de lactato a piruvato, donde también está implicada una flavoproteína transportadora de electrones. Además se produce un protón (H^+), por cada molécula de ácido láctico transformada en piruvato (Meganathan *et al.*, 2007). Se ha comprobado la producción de H_2 empleando como única fuente de carbono al lactato, sin embargo, algunos microorganismos como *Clostridium tyrobutyricum* requieren del acetato como co-sustrato, para poder utilizar al lactato (Júnior *et al.*, 2020).

3.8.3 Factores que pueden afectar el rendimiento en la producción de H_2

Es importante mencionar que los rendimientos reales de la producción de biohidrógeno son menores a los teóricos debido a que los sustratos también son empleados para el mantenimiento y reproducción celular (Ward, 1991; Ghaly *et al.*, 2005), en la ecuación (13) se puede apreciar la reacción que muestra la formación de biomasa en el proceso de producción de H_2 (Chen *et al.*, 2006).



Ecuación (13)

En fermentaciones llevadas a cabo por cultivos mixtos, la presencia de microorganismos consumidores de hidrógeno como; homoacetogénicos, metanogénicos (Castelló *et al.*, 2020) así como la producción de ácido propiónico, ácido valérico, ácido caproico, ácido succínico (Rosa & Silva, 2017; Feng *et al.*, 2018), además de solventes como el etanol y butanol, disminuyen el rendimiento de producción de H_2 en la práctica (Blanco & Rodríguez, 2012; Toledo-Alarcón *et al.*, 2018). Por otro lado, los factores operacionales como; temperatura, nivel de pH, tipo de sustrato, tiempo de retención hidráulico y tasa de carga orgánica también repercuten en la producción de biohidrógeno (Blanco & Rodríguez, 2012). Se ha reportado que los parámetros óptimos para la producción de biohidrógeno mediante



fermentación oscura son; nivel de pH 5.5 (Herbert *et al.*, 2001), temperatura en un rango de 35-37 °C, tiempo de retención hidráulica en un rango de 6-12 horas y tasa de carga orgánica en un rango de 30-125 g DQO/L-d , donde DQO significa Demanda Química de Oxígeno (Cortez Cervantes, 2019).

3.8.4 Otros posibles usos de la fermentación oscura

Los ácidos orgánicos que son producidos en la fermentación oscura pueden ser empleados como sustrato para el proceso de fotofermentación, obteniendo con ello más biohidrógeno (Rai & Singh, 2016), esto puede realizarse al acoplar secuencialmente los dos sistemas de fermentación (Oscura y fotofermentación), con lo cual teóricamente el rendimiento sería 12 mol de H₂ por mol de glucosa consumido (Saratale *et al.*, 2019). Otra alternativa es utilizar los ácidos orgánicos para producir el biocombustible metano de manera similar al proceso de digestión anaeróbica pero mediante dos sistemas separados, en el primero se lleva a cabo la fermentación oscura mientras que en el segundo se lleva a cabo la metanogénesis (Afzal *et al.*, 2017; Albini *et al.*, 2019). Actualmente hay interés por emplear a los ácidos orgánicos como sustrato para la producción de Polihidroxicarboxilatos, los cuales son un material biodegradable que tiene potencial para sustituir a los derivados plásticos del petróleo, esto debido a que los ácidos orgánicos son precursores metabólicos directos de los Polihidroxicarboxilatos (Strazzera *et al.*, 2018).

3.9 Determinación de ácidos orgánicos y solventes mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia HPLC

La Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, (HPLC, por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography*), con detección de modo dual; Detector UV (Radiación ultravioleta) y RI (Índice de refracción), tiene la capacidad de analizar ácidos grasos y solventes en matrices complejas (Vasconcelos de Sá *et al.*, 2011). Es un tipo de cromatografía líquida usada para la separación y cuantificación de compuestos que han sido disueltos en una solución (Kiani *et al.*, 2018). El detector UV es un detector analítico de propiedades específicas, el cual responde a analitos que absorben luz UV a una particular longitud de onda, se considera específico,



respondiendo solo a compuestos con cromóforos a longitudes de onda UV bajas (<210 nm), rango donde casi todos los compuestos orgánicos absorben luz, por otro lado los detectores RI miden la diferencia entre el índice de refracción óptica entre la fase móvil y la muestra, no se requiere ningún cromóforo en la molécula de soluto, por esta razón la detección de RI también se ha utilizado para el análisis de azúcares, triglicéridos y ácidos orgánicos (Swartz, 2010). El uso de esta prueba dentro de los estudios de producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura ha sido ampliamente reportado en la bibliografía para la determinación de la concentración de los componentes presentes en los sustratos, así como la concentración de ácidos orgánicos y solventes producidos. (Sydney, 2013; Krysteva *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2019; Yang & Wang, 2019).

3.10 La importancia de la Demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) se define como el número de equivalentes de oxígeno necesarios para oxidar los materiales orgánicos en el agua (Latif & Dickert, 2015), es una medida de la contaminación en términos de la concentración total de sustancias que pueden oxidarse en el agua, dando una medida de la materia orgánica total (Okoro & Nwaiwu, 2017). La demanda química de oxígeno es una medida de contaminación orgánica en aguas, principalmente de desechos humanos, industriales y animales (Ongley, 2009). La base de la prueba de DQO es que casi todos los compuestos orgánicos pueden oxidarse completamente a dióxido de carbono con un agente oxidante fuerte en condiciones ácidas, la cantidad de agente oxidante que se necesita para oxidar completamente el material orgánico se compara con la cantidad equivalente de oxígeno, un agente común es el dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), en el curso de la reacción de óxido-reducción cada átomo de cromo pasa de un estado de oxidación de +6 a +3 en el ion liberado Cr^{3+} , esto significa que cada ion dicromato tiene una ganancia de 6 electrones, por otro lado el estado de oxidación del oxígeno en la molécula O_2 es 0, mientras que el estado de oxidación del oxígeno en el producto de combustión (CO_2) es -4, por tal motivo para determinar el valor de DQO se debe introducir un exceso de ion dicromato ya que después de completarse la reacción se mide la cantidad en exceso



de dicromato al realizar una valoración con sulfato de amonio ferroso (titulante), la DQO puede expresarse en miligramos por litro (mg/L) y gramos por litro (g/L) (Schmitz, 2016). Al determinar la DQO durante el proceso de fermentación se puede obtener información acerca de la remoción de la carga de carbono que estaba presente en el desecho empleado como sustrato y evaluar el potencial del proceso como tratamiento de aguas residuales (Arcila & Buitrón, 2016).

Los gramos de Demanda Química de Oxígeno equivalente (gDQO_e) son el resultado de convertir los gramos de un compuesto químico, a su equivalente en DQO, mediante las siguientes ecuaciones, basadas en las reacciones de oxidación promedio de los compuestos analizados y el agua-oxígeno como aceptor de electrones, estas ecuaciones son particulares de cada compuesto; ácido acético (Ecuación 14), ácido butírico (Ecuación 15), ácido láctico (16), ácido propiónico (Ecuación 17), ácido valérico (Ecuación 18), ácido caproico (Ecuación 19) y H₂ (Ecuación 20) (Carrillo-Reyes *et al.*, 2019). La importancia de esta conversión es para poder realizar cálculos sobre la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura en los cuales se ven implicados el sustrato y los ácidos orgánicos producidos por este proceso (H. S. Lee & Rittmann, 2009). Además, cabe resaltar que este formato de dimensiones es ampliamente utilizado en estudios de producción de biohidrógeno, ya que se muestran las concentraciones de los sustratos y otros compuestos evaluados en gDQO/L (Amin *et al.*, 2016; Buitrón *et al.*, 2020; García-Depraect & León-Becerril, 2018; Moreno *et al.*, 2015), lo que es importante para realizar referencias y comparaciones en el presente proyecto de investigación.

$$\frac{mg\ DQO_e\ \text{ácido acético}}{L} = \left| \frac{X\ mg\ \text{á.acético}}{L} \right| \left| \frac{1\ mmol}{60\ mg\ \text{á.acético}} \right| \left| \frac{8\ meq\ e^-}{1\ mmol\ \text{á.acético}} \right| \left| \frac{8\ mg\ DO}{1\ meq\ e^-} \right|$$

Ecuación (14)

$$\frac{mg\ DQO_e\ \text{ácido butírico}}{L} = \left| \frac{X\ mg\ \text{á.butírico}}{L} \right| \left| \frac{1\ mmol}{88\ mg\ \text{á.butírico}} \right| \left| \frac{20\ meq\ e^-}{1\ mmol\ \text{á.butírico}} \right| \left| \frac{8\ mg\ DO}{1\ meq\ e^-} \right|$$



Ecuación (15)

$$\frac{mg\ DQOe\ \text{ácido láctico}}{L} = \left| \frac{X\ mg\ \text{á.láctico}}{L} \right| \left| \frac{1\ mmol}{90\ mg\ \text{á.láctico}} \right| \left| \frac{12\ meq\ e^-}{1\ mmol\ \text{á.láctico}} \right| \left| \frac{8\ mg\ DO}{1\ meq\ e^-} \right|$$

Ecuación (16)

$$\frac{mg\ DQOe\ \text{ácido propiónico}}{L} = \left| \frac{X\ mg\ \text{á.propiónico}}{L} \right| \left| \frac{1\ mmol}{74\ mg\ \text{á.propiónico}} \right| \left| \frac{14\ meq\ e^-}{1\ mmol\ \text{á.propiónico}} \right| \left| \frac{8\ mg\ DO}{1\ meq\ e^-} \right|$$

Ecuación (17)

$$\frac{mg\ DQOe\ \text{ácido valérico}}{L} = \left| \frac{X\ mg\ \text{á.valérico}}{L} \right| \left| \frac{1\ mmol}{102\ mg\ \text{á.valérico}} \right| \left| \frac{12\ meq\ e^-}{1\ mmol\ \text{á.valérico}} \right| \left| \frac{8\ mg\ DO}{1\ meq\ e^-} \right|$$

Ecuación (18)

$$\frac{mg\ DQOe\ \text{ácido caproico}}{L} = \left| \frac{X\ mg\ \text{á.caproico}}{L} \right| \left| \frac{1\ mmol}{116\ mg\ \text{á.caproico}} \right| \left| \frac{24\ meq\ e^-}{1\ mmol\ \text{á.caproico}} \right| \left| \frac{8\ mg\ DO}{1\ meq\ e^-} \right|$$

Ecuación (19)

$$mg\ DQO\ H_2 = |X\ mL\ H_2| \left| \frac{1\ mmol}{22.4\ mL\ H_2} \right| \left| \frac{2\ meq\ e^-}{1\ mmol\ H_2} \right| \left| \frac{8\ mg\ DO}{1\ meq\ e^-} \right|$$

Ecuación (20)

Donde X mg representa la concentración de los ácidos orgánicos, meq representa miliequivalente, e⁻ representa electrón, DO representa demanda de oxígeno y X mL H₂ representa el volumen de biohidrógeno producido.



3.11 Método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico para la determinación de carbohidratos

Los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, incluyendo los éteres metílicos con grupos reductores libres, dan una coloración amarilla anaranjada cuando son tratados con fenol y ácido sulfúrico. La reacción es sensible y el color es estable (Dubois *et al.*, 1956). La adición de ácido sulfúrico a soluciones acuosas de carbohidratos, provoca la deshidratación de estas moléculas con la eliminación de 3 mol de agua, formando derivados del furfural y el 5-hidroximetilfurfural, los cuales interactúan con el fenol, produciendo complejos que permiten la coloración de la solución y por lo tanto facilitan la cuantificación de los carbohidratos a través de espectrofotometría (López-legarda *et al.*, 2017). El uso de esta prueba dentro de los estudios de producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura ha sido reportado en la bibliografía. (Cisneros-Pérez *et al.*, 2017; Carrillo-Reyes *et al.*, 2019; Ohnishi *et al.*, 2010).

3.12 Determinación de Sólidos suspendidos

El término de sólidos suspendidos (SS) se refiere a la masa (en g) o concentración (mg/L) de materia inorgánica y orgánica que está retenida en el agua, los SS están compuestos típicamente por partículas finas con un diámetro menor a 62 μm (micrómetros), todos los cuerpos de agua contienen SS en condiciones naturales, sin embargo debido a perturbaciones antropogénicas, las concentraciones pueden aumentar, siendo un parámetro de contaminación del agua (Bilotta & Brazier, 2008). De acuerdo con las definiciones establecidas por la norma mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015 sobre análisis de agua, los Sólidos suspendidos totales es el material constituido por los sólidos sedimentables, los sólidos suspendidos y coloidales que son retenidos en un filtro de fibra de vidrio con poro de 1.5 μm secado y llevado a masa constante a una temperatura de 105°C. Los sólidos suspendidos volátiles son aquellos suspendidos que se volatilizan en la calcinación a 550°C. Los sólidos totales volátiles es la cantidad de materia orgánica e inorgánica que se volatiliza por el efecto de la calcinación a 550°C. El método estándar para el análisis de agua reportado por Eaton y colaboradores en el año



2005 fue utilizado en el presente proyecto de tesis para la determinación de los sólidos solubles, el proceso en detalle será explicado en la sección 8.4. La determinación de sólidos suspendidos ha sido reportada en estudios de producción de biohidrógeno (Arantes *et al.*, 2020).

3.13 Cromatografía de gases para determinación de la composición de biogás

La cromatografía analítica de gases es una técnica de separación de componentes de una mezcla, con el propósito de obtener información de su composición y cantidades moleculares, la fase móvil es un gas, comúnmente nitrógeno (Blumberg, 2012). La cromatografía de gases (CG) es la principal técnica para la separación y análisis de compuestos volátiles, ha sido utilizada para analizar, gases, líquidos y sólidos, durante la CG la muestra está vaporizada y acarreada por la fase móvil gaseosa a través de la columna, los componentes de la muestra (Solutos o analitos) son separados en base a su presiones de vapor relativas, además de sus afinidades por la fase estacionaria (McNair *et al.*, 2019). La mezcla de biogás producida por el proceso de fermentación oscura contiene H_2 y CO_2 por lo cuál es importante cuantificar la cantidad presente de cada gas mediante esta técnica (Bélafi-Bakó *et al.*, 2006). En la bibliografía se ha reportado el uso de esta prueba analítica para la determinación de H_2 en el proceso de fermentación oscura (Słupek *et al.*, 2019).

3.14 Secuenciación mediante Illumina

Secuenciación por síntesis basada en la detección de nucleótidos terminadores reversibles fosforescentes, incorporados en la secuencia en crecimiento. Sus ventajas sobre la piro secuenciación son: mayor resolución, proceso más barato, mayor cobertura de secuencia (Bokulich & Science, 2012). La tecnología de biblioteca y secuenciación por síntesis de Illumina se basa en 4 pasos; preparación de bibliotecas, generación/ amplificación de grupos clonales a partir de bibliotecas, secuenciación profunda y masivamente paralela, interpretar e informar el contexto biológico (Ravi *et al.*, 2018). Entre sus aplicaciones se encuentra secuenciación de genomas pequeños, metagenómica del 16S, secuenciación de



ARN, re-secuenciación dirigida y cribado genético preimplantacional (PGS) (Illumina, 2018).

3.15 Análisis de la estructura de la comunidad microbiana

La metagenómica (también conocida como genómica ambiental y comunitaria) es el análisis genómico de microorganismos mediante extracción directa y clonación del ácido desoxirribonucleico (ADN), proveniente de un ensamblaje de microorganismos, con lo cual se puede obtener información acerca de los miembros pertenecientes a una comunidad microbiana (Handelsman, 2004). En 1977 Woese y colaboradores establecieron que era idóneo utilizar la subunidad pequeña del gen ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) para inferir relaciones filogenéticas entre organismos procariotas (Woese & Fox, 1977), propiedad que posteriormente se verificó que podía ser aplicada a organismos eucariotas, por tal motivo en la actualidad este gen es el más utilizado para el análisis de composición filogenética comunitaria, además el aumento de la secuenciación ADN de alto rendimiento significó un gran avance en estudios de ecología microbiana (Hugerth & Andersson, 2017).

La secuenciación del ARNr 16S ha demostrado ser de gran utilidad para describir y caracterizar comunidades microbianas, ya que permite la identificación de microorganismos cultivables y no cultivables, estos últimos pueden llegar a representar aproximadamente el 99% de microorganismos presentes en una muestra (Rodicio & Mendoza, 2004). Para que una región de ADN sea considerada como un marcador molecular requiere cumplir ciertos requisitos; tener una variabilidad y una divergencia genética significativa, poseer sitios conservados adyacentes que permitan el diseño de iniciadores universales para poder ser amplificada mediante PCR y tener una longitud adecuada que permita la extracción y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa (Lopez & Erickson, 2012). Debido a estas características deseables, el gen ARNr 16S es una buena opción para la clasificación de bacterias, también ha sido utilizado en la reconstrucción de relaciones filogenéticas (Baker *et al.*, 2003). El ARNr 16S es un polirribonucleótido muy antiguo que se encuentra en la subunidad pequeña (30S) del ribosoma



bacteriano, su secuencia es de aproximadamente 1500 nucleótidos y en ciertas regiones de su secuencia puede adquirir una estructura secundaria (asas y hélices), es codificado por el gen *rrs*, y ha mantenido su función original. Contiene 9 regiones hipervariables que aportan la información útil para estudios de filogenética y taxonomía. Dentro de los ARNr 16S se encuentran secuencias denominadas oligonucleótidos firma, las cuales son secuencias cortas específicas que aparecen en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético y muy rara vez llegan a estar presentes en otros grupos, incluso en grupos muy próximos. Por esta razón el ARNr 16S permiten diferenciar a organismos alejados y próximos entre sí a nivel de género. Sin embargo, solamente la comparación de los genomas completos será la que aportará el dato exacto de las relaciones evolutivas entre organismos comparados. También se recomienda que a parte de la secuenciación del ARNr 16S se utilicen criterios fenotípicos para la identificación definitiva a nivel de especie (Valenzuela-González *et al.*, 2015; Rodicio & Mendoza, 2004).

3.15.1 Unidades operacionales taxonómicas (OTUS) y Variantes de secuencia de amplicon (ASVs)

Son definidos como clústeres de secuencias similares de ARNr 16S/18S y son utilizados para realizar aproximaciones teórico-agnósticas de taxones microbianos. Para caracterizar la composición de comunidades microbianas, frecuentemente se secuencian y cuantifican genes marcadores específicos, particularmente las subunidades pequeñas del gen ARNr. Un paso crucial es la agrupación de secuencias en Unidades operacionales taxonómicas (OTUs) de organismos relativamente cercanos (Schmidt *et al.*, 2014). El análisis de los amplicones 16S inicia con el uso de primers diseñados para amplificar regiones hipervariables del gen ARNr 16S (típicamente las regiones V1-V3 o V3-V5) y posteriormente las secuencias son agrupadas en OTUs basadas en su similitud, generalmente ha valores de por lo menos 97%. Para un clúster OTU formado, una secuencia es seleccionada como representativa, la cual es anotada utilizando un método de clasificación 16S y todas las secuencias dentro del clúster OTU heredan esa anotación (Nguyen *et al.*, 2016).



En base a mejorar los métodos de selección de OTUS, se ha desarrollado un nuevo método llamado Variantes de secuencia de amplicon (ASV), el cual se implementa en el paquete de R; Algoritmo de reducción de ruido de amplicon divisivo, *Divisive Amplicon Denoising Algorithm* (Por sus siglas en inglés DADA2) (Callahan *et al.*, 2016). Los ASV son un término análogo de OTU, sin embargo, se refiere a una secuencia única que se asigna a un grupo taxonómico. Cada ASV se calcula en cada muestra y la presencia de la taxonomía identificada es registrada. Los métodos ASV infieren las secuencias biológicas en la muestra antes de la introducción de los errores de amplificación y secuenciación, distinguiendo las variantes de secuencia que difieren en tan solo un nucleótido. Recientemente existe un uso preferencial de los ASV sobre las OTU debido a que tienen una mayor reproducibilidad y exhaustividad. Además, también se ha comprobado que existe un mayor control de los errores mediante el uso de ASV, ya que los errores pueden resolverse a nivel de un solo nucleótido (Capunitan, 2018 , Callahan *et al.*, 2017).

El proceso llevado a cabo por DADA2 puede ser resumido de la siguiente manera; Inicialmente divide los amplicones considerando su distribución de abundancia (ya que las lecturas más comunes tienen más probabilidades de ser secuencias verdaderas) y la distancia de secuencia de otras lecturas (ya que se espera que los errores ocurran pocas veces por lectura). Luego, utiliza los clústeres generados y las puntuaciones de calidad de las bases, producidas por la plataforma de secuenciación, para calcular un modelo de error de sustitución condicionando a las puntuaciones de calidad para la secuenciación en cuestión. Finalmente, utiliza este modelo de error para “corregir” lecturas, es decir, asignar lecturas de baja frecuencia a lecturas de frecuencia más alta, las cuales podrían derivarse con alta probabilidad por sustitución (Hugerth & Andersson, 2017). DADA2 sirve para modelar y corregir errores de amplicon secuenciados por el equipo Illumina. DADA 2 realiza inferencias exactas de las secuencias muestra y resuelve diferencias de tan solo 1 nucleótido en varias comunidades simuladas (Callahan *et al.*, 2016). En la literatura se ha reportado el uso de DADA2 y ASV para la identificación de la comunidad microbiana en un estudio de producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura (Cieciura-Włoch *et al.*, 2020).



4. ANTECEDENTES

En el año 2010 un estudio realizado en Bulgaria demostró que el uso de vinazas vitivinícolas como sustrato para la producción de biohidrógeno tiene buenos rendimientos, obteniéndose 65.41 mmol de biohidrógeno por L de vinaza utilizado, al emplear un cultivo mixto conformado por los microorganismos *Rhodobacter sphaeroides* y *Clostridium butyricum*, donde las cinéticas del proceso fermentativo cooperativo de estas bacterias mostraron una rápida y efectiva asimilación de los compuestos estudiados; ácido málico, ácido láctico, azúcares residuales, ácido tartárico, ácido cítrico. Se obtuvo un mejor rendimiento de producción de biohidrógeno cuando se empleó el cultivo mixto, en comparación con los rendimientos obtenidos al realizar el proceso de fermentación con los microorganismos por separado; 27.41 y 25.49 mmol de H₂ por L de vinaza utilizado, al emplear a *Rhodobacter sphaeroides* y *Clostridium butyricum* respectivamente (Krysteva *et al.*, 2010).

En el año 2017 un estudio realizado en México demostró que es posible la producción de biohidrógeno vía fermentación oscura empleando lías vitivinícolas como sustrato, obteniendo una tasa específica de producción de hidrógeno de 44 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹. Este estudio también aportó que la relación sustrato-biomasa debe mantenerse baja (con un valor óptimo de 0.16), esto debido a que las vinazas vitivinícolas al ser un sustrato complejo y contener compuestos como etanol, pueden inhibir a los microorganismos, por lo tanto, se recomienda realizar una dilución de las vinazas de por lo menos 1 a 5 para una óptima producción de hidrógeno. Otra contribución de este estudio señala que se obtienen mejores resultados de productividad si se opera el biorreactor con recirculación de flujo ascendente de gas (a una velocidad de 28.6 m d⁻¹), en comparación con operar el biorreactor solamente con recirculación del líquido, obteniendo una productividad de 62 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹ y 22 mL H₂ L⁻¹ h⁻¹, respectivamente para cada estrategia de recirculación (Albarrán-Contreras, 2017). En un estudio posterior a ese trabajo se realizó la caracterización microbiana por secuenciación del gen ADNr 16S de la biomasa empleada por Albarrán-Contreras en 2017, demostrando que en la operación del biorreactor con



recirculación gaseosa se promueve el desarrollo de microorganismos relacionados con *Megasphaera elsdenii* y decrece la abundancia de bacterias consumidoras de hidrógeno; *Clostridium carboxidivorans* y *Clostridium ljungdahlii*, las cuales están asociados a rutas metabólicas de homoacetogénesis (Buitrón *et al.*, 2020). En el año 2018 un estudio realizado por un grupo de investigadores del Instituto de Ingeniería de la UNAM demostró el potencial de efluentes vitivinícolas como sustrato para un proceso fermentativo secuencial de producción de biohidrógeno y metano. Donde se obtuvo un rendimiento máximo de 528 mL de H₂ por L de lías vitivinícolas empleadas. También demostraron que la adición de nutrientes al efluente como; N-NH₄, Mg, Fe, Co, Mn, I, Ni y Zn, favorece la producción de ácidos reducidos adicionales, en lugar de la producción de biohidrógeno. En este sentido, el potencial de producción de efluentes sin adición de nutrientes tuvo un rango 1.6 - 1.9 mejor que el potencial de producción de efluentes con adición de nutrientes (Carrillo-Reyes, Albarrán-Contreras, *et al.*, 2019).

Actualmente se conoce el aporte que tienen los componentes presentes en algunos sustratos utilizados para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura. Tal es el caso del suero de queso, empleado como sustrato en un estudio realizado en el año 2019, en donde mediante un experimento realizado en un biorreactor anaerobio de lecho fijo acidogénico, se obtuvo producción en volumen de biohidrógeno de 3.8 L) vía fermentación oscura. Al realizar el análisis de cinéticas de consumo de sustrato y al análisis de cinéticas de producción de metabolitos se caracterizaron las transformaciones metabólicas envueltas en la producción de hidrógeno utilizando ese sustrato. Los resultados mostraron que el 75% de la producción de biohidrógeno provino de metabolizar dos componentes del suero de queso; el ácido acético y el ácido láctico, por otro lado, también se determinó el que ácido orgánico mayormente producido fue el ácido butírico (15 gDQOe/L). Debido a la naturaleza del sustrato empleado, la colonización del biorreactor por parte de bacterias ácido-lácticas se puede ver favorecida (Blanco *et al.*, 2019).

En cuanto a vinazas, se realizó un estudio en el año 2018 en donde se utilizó como sustrato vinazas tequileras para la producción de biohidrógeno mediante



fermentación oscura (4862 mL de biohidrógeno por L de vinazas de tequila empleado). En este estudio se empleó un enfoque integral que consideró el rendimiento operativo, el análisis de la cinética de consumo de sustratos, el análisis de la cinética de producción de ácidos orgánicos y la ecología microbiana, para la comprensión de la producción de biohidrógeno a partir de vinazas tequileras. El perfil metabólico y análisis de correlación reflejaron que la producción de H_2 está asociada con el consumo de 2 componentes de las vinazas vitivinícolas; el ácido láctico (Concentración inicial de 7 g/L) y el ácido acético (Concentración inicial de 8 g/L), mientras que el ácido butírico fue el metabolito mayormente producido en este proceso de fermentación (6 g/L). Se realizó la extracción de ADN de la comunidad microbiana y se secuenciaron las regiones variables del gen ARNr 16S mediante Illumina MiSeq, los resultados revelaron que los microorganismos *Clostridium beijerinckii* (60% del total de bacterias productoras de H_2), *Streptococcus sp* (90% del total de bacterias ácido lácticas) y *Acetobacter lovaniensis* (89.4% del total de acetobacterias), fueron las especies con mayor abundancia relativa cuando la producción de H_2 fue alta (8752 mL). Sus resultados sugieren que las rutas acetoláctica pueden ser potencialmente utilizadas para la producción eficiente de biohidrógeno a partir de vinazas tequileras (García-Depraect & León-Becerril, 2018).

Un estudio realizado por Cieciora-Włoch y colaboradores (2020) evaluó la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura empleando como sustrato pulpa de remolacha azucarera hidrolizada adicionada con hierro. Su mayor rendimiento de producción de biohidrógeno fue 200 L H_2 /Kg SV (Sólidos volátiles), mientras que los principales ácidos orgánicos producidos fueron; ácido acético, ácido láctico y ácido caproico. En este estudio se realizó la extracción de ADN de la comunidad microbiana y se secuenciaron las regiones hipervariables V3-V4 del gen ARNr 16S mediante Illumina MiSeq. Para el análisis de los resultados de secuenciamiento se utilizó el programa; Perspectivas cuantitativas en ecología microbiana, Quantitative Insights in Microbial Ecology (Qiime2), junto con el paquete de acceso abierto DADA2 para la obtención de ASV. El análisis mostró un balance entre los microorganismos productores de hidrógeno pertenecientes al orden *Clostridiales* y bacterias ácido lácticas (Abundancia relativa aproximadamente del



60%). Además se identificó la presencia del género *Methanosphaera* (Abundancia relativa aproximadamente del 6%), productor de metano.

Un estudio realizado por Yang y Wang en el año 2019 evaluó los cambios en la comunidad microbiana durante el proceso de fermentación oscura empleando como sustrato glucosa, el inóculo fue obtenido un lodo digerido anaeróbicamente. Se tomaron muestras de la biomasa para identificar a los generos con mayor abundancia relativa en; el inóculo, a las 6 horas de fermentación, 12 horas y 48 horas (Fín de la fermentación). Para estos analisis se empleó la secuenciación de regiones variables del gen ARNr 16S mediante Illumina MiSeq, los resultados mostraron que en el inóculo los géneros con mayor abundancia relativa fueron *Proteiniphilum* (16.6 %), *Petrimonas* (11.3%), *Candidatus Caldatribacterium* (8.3%), *Sedimentibacter* (7.9%) y *Actinomyces* (6.1%), mientras que al final de la fermentación los géneros con mayor abundancia relativa fueron *Clostridium* (68.3%), *Paraclostridium* (20.2%) y *Paeniclostridium* (3.9%). En este estudio se pudo observar que el 60% de las OTUs observadas en el inóculo desaparecieron durante el proceso de fermentación oscura, lo cual significa que disminuyó la diversidad microbiana, sin embargo la abundancia relativa de los generos responsables de la producción de hidrógeno aumentó, la explicación de los autores para este fenómeno es que el sustrato propició una fuerte y selectiva competencia entre los microorganismos, además el cambio en el nivel de pH por la producción de ácidos orgánicos, seleccionó a los microroganismos más adecuados al medio ambiente, los ácidos orgánicos que tuvieron mayor producción fueron; ácido acético (1.7 g/L), ácido butírico (2.1 g/L) y ácido propiónico (.2 g/L), mientras que la producción de biohidrógeno fue de 174.8 mL. Otro estudio en el cuál se ha empleado la secuenciación de regiones variables del gen ARNr 16S mediante Illumina MiSeq es el realizado por Zhang y colaboradores en el año 2016 en donde analizaron la comunidad microbiana de un cultivo mixto extremófilo durante la producción de biohidrógeno en un quimiostato, siendo los géneros con mayor abundancia relativa; *Caldicellulosiruptor* (50-60%) y *Thermoanaerobacter* (40-45%).



En la actualidad no se conoce el aporte que tienen los componentes presentes en las vinazas vitivinícolas, para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura. Tampoco se conoce como repercuten estos componentes en la comunidad microbiana presente en la fermentación oscura de este sustrato. Todo ello representa un problema en la comprensión de la producción de biohidrógeno a partir de vinazas vitivinícolas, lo cual podría limitar la optimización de este proceso para la obtención de mejores rendimientos de biohidrógeno, así como comprometer la factibilidad de ser usado como un sustrato eficiente.



5. JUSTIFICACIÓN

La utilización de desechos contaminantes como lo son las vinazas vitivinícolas, en procesos de producción de biohidrógeno, es una estrategia que tiene beneficios ambientales, tales como: la valorización del desecho mediante su transformación en un producto de valor agregado, y la reducción de su impacto ambiental. El uso de desechos producidos a gran escala, como lo son las vinazas vitivinícolas, hace que su aplicación como sustrato en la fermentación oscura sea económicamente factible. Al estudiar el proceso de fermentación oscura empleando como sustratos a las vinazas vitivinícolas y sus componentes por separado, en experimentos de cinéticas de consumo de sustrato y producción de metabolitos, se obtendrá conocimiento acerca de la contribución que aportan dichos componentes en la producción de; biohidrógeno, ácidos orgánicos y solventes. Además, la extracción de ADN de la comunidad microbiana y su análisis permitirán correlacionar a los microorganismos implicados en este proceso. Con esta información, habrá una mejor comprensión del proceso y podrá ser utilizada dentro del conocimiento teórico en futuros proyectos de investigación sobre la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura empleando como sustrato a las vinazas vitivinícolas.

6. HIPÓTESIS

Los componentes de las vinazas vitivinícolas tendrán diferente potencial de producción de biohidrógeno y se obtendrá una mayor producción de 1 tipo de ácido orgánico con respecto a los demás metabolitos obtenidos en el proceso de fermentación oscura estudiado. Los diferentes componentes de las vinazas podrán modificar la composición microbiana.



7. OBJETIVOS

General

Evaluar el potencial de producción de biohidrógeno a partir de los diferentes compuestos presentes en las vinazas vitivinícolas, así como determinar los microorganismos implicados en dicha producción.

Específicos

- Identificar el componente determinante en la producción de hidrógeno utilizando vinazas vitivinícolas como sustrato.
- Identificar el principal ácido orgánico producido al emplear como sustrato a las vinazas vitivinícolas en el proceso de fermentación oscura.
- Identificar los géneros bacterianos presentes en las comunidades microbianas resultantes y relacionarlos con el proceso de producción de H₂.



8. METODOLOGÍA

8.1 Inóculo

Para la obtención del inóculo se extrajo biomasa proveniente de un biorreactor tipo filtro percolador escala piloto, utilizado para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura, el cual empleó como sustratos; vinazas vitivinícolas provenientes de una bodega ubicada en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro, México y sustrato sintético que simulaba las concentraciones de los compuestos presentes en las vinazas, ácido láctico y acético, glicerol y carbohidratos (Zavala Méndez, 2020), es importante mencionar que el inóculo de este biorreactor fue obtenido por fermentación natural del sustrato, el cual consiste en dejar fermentar el sustrato por 3 días a 25 °C en un recipiente abierto de acuerdo con Fernandes y colaboradores (2013).

La biomasa que fue extraída del biorreactor tipo filtro percolador escala piloto para el inóculo del presente proyecto de investigación se encontraba suspendida en 1 L de sustrato de alimentación, así como adherida a soportes (HAS filter media, 963 m²/m³, 0.95 g/cm³) y fue almacenada en un recipiente semicerrado, en oscuridad a temperatura ambiente por 48 horas.

8.2 Sustratos

Considerando la composición de las vinazas vitivinícolas, y las rutas metabólicas reportadas para la producción de hidrógeno, se evaluaron 5 sustratos, cada uno de ellos fue preparado para evaluar el aporte específico de uno o dos de los componentes principales de las vinazas vitivinícolas en la producción de H₂. La determinación de las concentraciones de los componentes de cada sustrato se realizó en rangos similares a la composición que tienen las vinazas vitivinícolas al ser diluidas 1:2 con agua. Se recomienda la dilución de los efluentes vitivinícolas para la producción de H₂, ya que se ha reportado que su uso en crudo puede disminuir la producción de hidrógeno (Albarrán-Contreras, 2017; Cortez Cervantes, 2019). La concentración de los componentes de las vinazas vitivinícolas empleadas como sustrato al diluirse 1:2 con agua, se muestra en la Tabla (5).



Concentración en g/L

	Glicerol	Ácido acético	Ácido láctico	Carbohidratos	Ácido propiónico	Ácido Butírico	*Ácidos orgánicos C6-C5	**Otros
Vinazas vitivinícolas	12.4	3.98	3.43	1.49	.57	0.10	0.04	0.09

Tabla (5). Concentraciones iniciales en g/L de los componentes presentes en las vinazas vitivinícolas empleadas como sustrato. *Valérico, Isovalérico y Caproato **Butanol, etanol y succínico. ***Ace-Lac: Acético-Láctico; Car: Carbohidratos; Gli-Car: Glicerol-Carbohidratos; Gli: Glicerol.

En la Tabla 6, se puede observar los componentes utilizados en la elaboración de los 5 sustratos a evaluar en el presente proyecto de investigación.

Sustrato	Volumen aforado de agua destilada	Concentración de componentes	Procedencia de los reactivos
1 Aceto/Láctico	360 mL	Ácido acético 3.98 g/L Ácido láctico 3.43 g/L	Ácido acético glacial 99% Golden Bell Reactivos, No Código 20100. Ácido láctico 88% Golden Bell reactivos, No. Código 20800
2 Carbohidratos	360 mL	Sacarosa 1.49 g/L	Sacarosa grado alimenticio
3 Carbohidratos/Glicerol	360 mL	Sacarosa 1.49 g/L Glicerol 12.4 g/L	Sacarosa grado alimenticio Glicerol grado alimenticio 99%, La corona
4 Glicerol	360 mL	Glicerol 12.4 g/L	Glicerol grado alimenticio 99%, La corona
5 Vinazas	160 mL	200 mL de vinazas	Vinazas vitivinícolas, bodega en Ezequiel Montes, Querétaro, México

Tabla (6). Componentes utilizados en la elaboración de los sustratos a evaluar en el presente proyecto de investigación.



Después de preparar los sustratos anteriormente mencionados, se adicionaron 40 mL de inóculo, resultando cada sustrato con un volumen de trabajo de 400 mL. A continuación, se analizó la concentración inicial (Mediante la metodología explicada en la Sección 8.4) de los componentes presentes en cada uno de los sustratos resultantes, así como la concentración de otros residuales que deben su presencia a la adición del inóculo (Secciones 8.1 y 8.3), esta información se puede apreciar en la Tabla (7).

Sustrato***	Concentración en g/L							
	Glicerol	Ácido acético	Ácido láctico	Carbohidratos	Ácido propiónico	Ácido Butírico	*Ácidos orgánicos C6-C5	**Otros
Ace/Lac	0.45	6.5	10.4	0	0	0.31	0.12	0.13
Car	0.71	0.13	0.97	1.65	0	0.28	0.2	0.1
Car/Gli	15.6	0.6	1.2	1.68	0	0.31	0.5	6x10 ⁻³
Gli	13.36	0.10	0.37	0	0	0.2	0.06	0
Vin	17.46	3.34	2.34	2.84	0.54	0.24	0.03	0.92

Tabla (7). Concentraciones iniciales en g/L de los componentes presentes en los diferentes sustratos evaluados. *Valérico, Isovalérico y Caproato **Butanol, etanol y succínico. ***Ace-Lac: Acético-Láctico; Car: Carbohidratos; Gli-Car: Glicerol-Carbohidratos; Gli: Glicerol.

La concentración de cada componente presente en los sustratos fue definida en base a la composición de las vinazas vitivinícolas diluidas 1:2, que fueron empleadas como sustrato en el presente proyecto de investigación, sin embargo, en la elaboración de los 5 sustratos, al realizar la adición del inóculo proveniente del biorreactor tipo filtro percolador escala piloto, las concentraciones de dichos componentes resultaron modificadas, esto debido a residuos del sustrato de alimentación del biorreactor, los cuales se encuentran en el líquido de donde fue obtenida la biomasa del inóculo lo cual puede apreciarse en las Tablas (6) y (7).



8.3 Cinéticas de producción de biohidrógeno con diferentes sustratos

Las cinéticas de consumo de los sustratos previamente preparados se obtuvieron a partir de experimentos en lote en el Sistema de Prueba de Potencial de Metano, *Methane Potential Test System* (Por sus siglas en inglés AMPTS II) (Bioprocess Control, Suecia) (Figura 11), el cual es un sistema automático que registra las productividades de hidrógeno en línea siguiendo las recomendaciones del fabricante. El potencial de producción de biohidrógeno empleando al AMPTS II, ha sido reportado por Carrillo y colaboradores (2019), cuyo método introduce el primer protocolo validado internacionalmente, evaluado por 8 laboratorios independientes de 5 países diferentes, dicha metodología fue la base para el proceso experimental del presente proyecto de investigación al realizar las cinéticas de consumo de sustratos y la producción de biohidrógeno.

Se evaluaron los sustratos antes mencionados (Sección 8.2), en botellas de vidrio que tienen un volumen de 600 mL, mientras que el volumen de trabajo fue de 400 mL. A cada botella se le adicionaron 65 empaques (HAS filter media, 963 m²/m³, 0.95 g/cm³) que actúan como soportes para la biomasa, estos empaques provienen del biorreactor tipo filtro percolador por lo cual también contienen inóculo adherido (Zavala Méndez, 2020). El pH inicial se ajustó a 5.5 con NaOH 5N y con HCl 5N, debido a que diversas fuentes bibliográficas mencionan que este nivel de pH es el óptimo para la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura (Afzal *et al.*, 2017; Cortez Cervantes, 2019; Herbert *et al.*, 2001). Después de cerrar las botellas, se desplazó la atmósfera de cada una con N₂ durante 15 s para mantener condiciones anaerobias. Los experimentos se incubaron a 37°C y una agitación intermitente de 120 rpm (60 s prendido/180 s apagado). El equipo cuenta con una trampa de CO₂ por lo tanto el volumen de biogás registrado fue únicamente biohidrógeno (Carrillo-Reyes *et al.*, 2019).

En cada replica se tomaron diariamente 3 muestras de 3mL del medio para determinar la composición de ácidos grasos volátiles (AGVs) y carbohidratos solubles, durante un periodo de 118 h (5 días aproximadamente). Por cada muestra tomada se adicionaron 3 ml de agua destilada a las botellas. Al final de la cinética

se tomaron muestras para determinar composición de biogás (con ayuda de una jeringa se tomó un volumen de 4 ml, succionando y desplazando el biogás tres veces, para asegurar homogeneidad); se tomaron muestras líquidas para determinar composición de sólidos suspendidos totales (SST) y demanda química de oxígeno (DQO). Adicionalmente se conservó una muestra de biomasa por cada botella para la caracterización de la comunidad bacteriana (Cortez Cervantes, 2019).

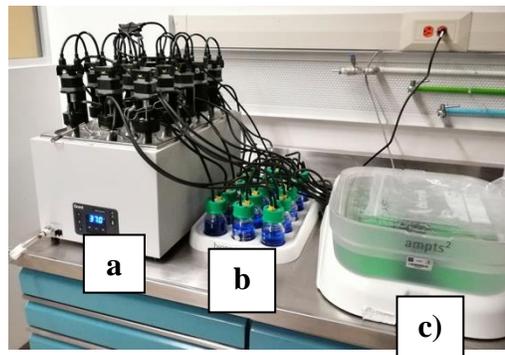
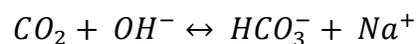
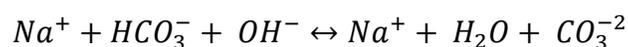


Figura (11). Sistema automático AMPTS II. a) Unidad de incubación de muestras, b)

En el Sistema automático AMPTS II, Figura (11), el biogás producido (Mezcla de Hidrógeno y CO₂) en la unidad de incubación de muestras Figura 11, inciso a), pasa a través de conectores a la unidad de absorción de CO₂, Figura 11, inciso b), cuyos contenedores contienen una solución 3 M de NaOH, además de un indicador de pH; timolftaleína (La cual otorga a la solución de un color azul cuando el nivel de pH es mayor a 10.5, es incoloro en soluciones ácidas y a niveles de pH cercanos a 0 es de color rojo) (Carrillo-Reyes *et al.*, 2019). El hidróxido de sodio en solución acuosa se encuentra completamente ionizado en Na⁺ y OH⁻. El CO₂ gaseoso al entrar en contacto con la solución se vuelve CO₂ acuoso. El CO₂ reaccionará con los hidróxidos, siguiendo las siguientes reacciones; ecuación (21) y ecuación (22) (Cambier, 2017).



Ecuación (21)



Ecuación (22)

Gracias a este mecanismo que funciona como una trampa de CO₂, el dispositivo de medición de volumen de gas detectará únicamente hidrógeno. Figura 11, inciso c).

8.4 Métodos analíticos

Las muestras obtenidas para determinar concentración de AGVs y solventes se acidificaron a un nivel de pH menor a 2 utilizando HCl, posteriormente fueron filtradas a 0.45 μm para su análisis. Los AGVs y solventes se determinaron empleando un equipo de Cromatografía líquida de alta eficacia, *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC (1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Figura 12) equipado con un detector de matriz de diodos y de índice de refracción UV-Vis y RID, acoplado a una columna AMINEX HPX-87 H (300 x 7.8 mm, BioRad Laboratories, EUA), cuya temperatura fue de 50°C. Se utilizó H₂SO₄ 5mM como fase móvil, a 0.6 mL/min. La importancia de esta prueba en el presente proyecto de tesis radica en que permite obtener las concentraciones en g/L de los compuestos presentes en los sustratos y la concentración de los metabolitos obtenidos en las cinéticas de producción de biohidrógeno; ácidos grasos y solventes.



Figura (12). HPLC (1260, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Para determinar la concentración de carbohidratos y demanda química de oxígeno soluble (DQOs) se tomaron 0.5 ml de la muestra (a la dilución adecuada) y se adicionaron a 0.5 ml de fenol y 2 ml de H₂SO₄, en tubos de vidrio. La solución se



dejó enfriar y posteriormente se leyó su absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro, como lo indica en método de colorimétrico fenol - ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). La DQOs se determinó de acuerdo con el método Hach 435 (Hach-Company, 2014), basado en el método del dicromato a flujo cerrado, el principio de esta prueba fue descrito en la sección 3.9.

Para la determinación de total de sólidos en suspensión (SST), sólidos suspendidos fijos (SSF) y sólidos en suspensión volátiles (SSV), se utilizaron métodos estándar para el análisis de agua (Eaton *et al.*, 2005). En breve, se utilizaron filtros de papel Whatman de fibra de vidrio de 5.5 cm de diámetro, los cuales fueron colocados en un dispositivo múltiple de filtrado o matraz Kitasato, conectado a una línea de vacío y fueron sometidos a 3 lavados con agua destilada. Los filtros fueron colocados en charolas de aluminio dentro de una estufa de secado a 105°C por 20 minutos, posteriormente fueron introducidos durante 15 minutos en una mufla ajustada a 500°C, el tercer paso consistió en colocar de nuevo los filtros en la estufa por 20 minutos y a continuación fueron introducidos en un desecador por 20 minutos. Pasado este tiempo, fueron pesados en balanza analítica, siendo considerado el peso constante de los filtros. Se colocaron 20 mL de la muestra a analizar sobre los filtros y fueron colocados en la estufa por 12 horas. Pasado ese lapso fueron retirados de la estufa e introducidos en el desecador por 20 minutos, los filtros fueron pesados en balanza analítica (Peso del filtro + peso de la muestra). Posteriormente los filtros fueron introducidos en la mufla por 20 minutos, seguidos por 20 minutos en la estufa y el paso final fue colocarlos 20 minutos en el desecador (Peso del filtro + peso de cenizas).

Las muestras de biogás fueron analizadas en un cromatógrafo de gases (8610 C, SRI Instruments, Torrance, CA, USA) (Figura 13) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columna empacadas (ambas de 6 pies x 1/8 pulgada, una de sílice gel y la otra de tamiz molecular 13x), el gas acarreador fue nitrógeno a una velocidad de 20 mL/min, las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 90°C y 150°C, respectivamente. La temperatura de la columna se

mantuvo a 40°C durante cuatro minutos y se incrementó hasta 110°C a una velocidad de 20°C/min, esta temperatura se mantuvo durante 1.5 minutos.

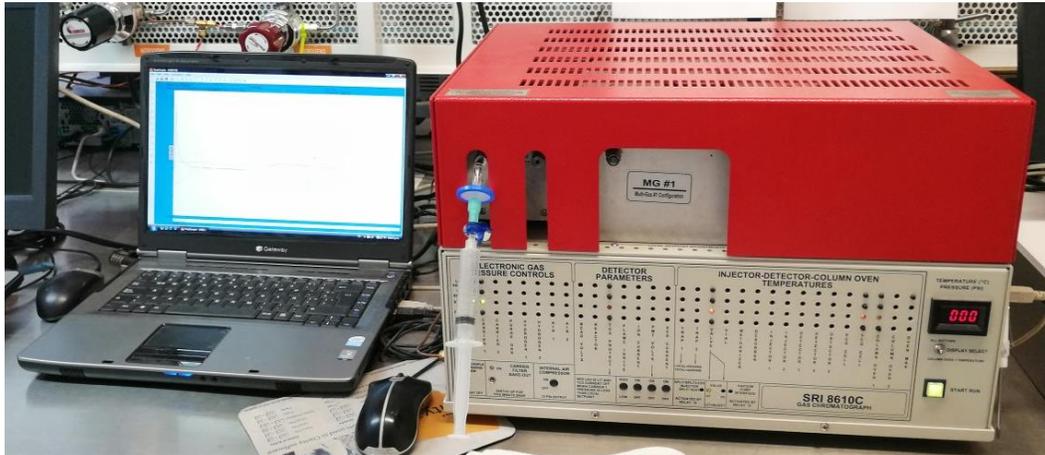


Figura (13). Cromatógrafo de gases (8610 C, SRI Instruments, Torrance, CA, USA)

8.5 Caracterización microbiana

Para caracterizar la composición microbiana presente en cada uno de los sustratos evaluados, se tomó una muestra de biomasa de cada una de las botellas al final del experimento de cinéticas de producción de H₂ y se conservaron a -20°C hasta la extracción de ADN. Se extrajo ADN metagenómico utilizando el kit de aislamiento DNeasy PowerSoil Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Alemania). La concentración del ADN metagenómico extraído se cuantificó por espectrofotometría utilizando un NANODrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). Las 15 muestras de ADN fueron enviadas al laboratorio de Investigación y Pruebas (RTL, Lubbock, EE.UU.), para la secuenciación de Illumina MiSeq. Las regiones V1-V2 del gen ARNr 16S fueron amplificadas utilizando los cebadores para bacterias 28F (GAGTTTGATCNTGGCTCAG) y 388R (TGCTGCCTCCCGTAGGAGT) del gen 16s rADN (Barragán *et al.*, 2017; Zavala, 2020).

8.6 Análisis de resultados de secuenciación

Los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando el programa RStudio versión 1.2.5033 (RStudioTeam, 2019), junto con el paquete de acceso abierto DADA2 (Callahan *et al.*, 2016), el cual implementa el flujo de trabajo completo del amplicon, llevándose a cabo el siguiente proceso;



- Filtrado: descartar lecturas si es probable que tenga más de 2 bases erróneas, eliminación de cualquier lectura que coincida con el genoma del bacteriófago PhiX (Generalmente se agrega en la secuenciación Illumina para el monitoreo de calidad), recortar todas las bases después del primer puntaje de calidad de 2 que aparece en una lectura, eliminar cualquier secuencia que contenga bases ambiguas, establecer el tamaño; las muestras se filtraron recortando 10 bases a la izquierda, así como en la base 250 y 220 a la derecha, para forward y reverse, respectivamente, esto con el motivo de mantener los puntajes de calidad aproximadamente por encima de 35 en general (Puntaje de calidad con valor de 30 = tasa de error esperada de 1 en 1,000 bases).
- Eliminación de duplicaciones: De todas las secuencias idénticas que se presenten, solo se mantiene y procesa una de ellas. También se genera un perfil de puntaje de calidad para esa secuencia procesada que está basado en los puntajes de calidad promedio de cada base de todas las secuencias que fueron idénticas de la misma.
- Inferencia de variantes de secuencia de amplicon (ASV): incorporar los perfiles de calidad consenso y la abundancia de cada secuencia única, determinar la probabilidad de que cada secuencia sea de origen biológico o espuria.
- Fusión de lecturas de pares emparejados
- Construcción de grupos de secuencia o ASVs
- Identificación y eliminación de quimeras. Del secuenciamiento de las 16 muestras se obtuvieron 6.8×10^5 lecturas del gen 16S ADNr, con un promedio de 42492 lecturas por muestra. Se recuperaron un promedio de 27973 lecturas por muestra.
- Clasificación taxonómica

Con este proceso se proporciona información sobre la estructura de la población microbiana (Callahan *et al.*, 2016) (Moreno-Perlin & Carrillo-Reyes, 2020).



9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Efecto de los diferentes sustratos en la producción de biohidrógeno

Durante los experimentos en lote, se alcanzó un volumen de producción máximo de 237 mL de biohidrógeno, cuando el sustrato empleado fue vinazas vitivinícolas, lo cual puede apreciarse en la Figura (14), Figura (15) y en la Tabla (8), obteniendo un rendimiento experimental de producción de 1182 mL de biohidrógeno por L de vinazas, siendo 39% mayor que el rendimiento obtenido por Moreno y colaboradores en el año 2015, que al emplear vinazas de tequila obtuvieron un rendimiento de 721 mL de biohidrógeno por L de vinaza. Sin embargo, el rendimiento obtenido en el presente proyecto de investigación fue 3 veces inferior al rendimiento experimental obtenido por García-Depraect & León-Becerril (2018), el cual fue de 4862 mL de biohidrógeno por L de vinazas de tequila empleado. Las vinazas de tequila comparten similitud en cuanto características con las vinazas vitivinícolas (Albarrán-Contreras, 2017), sin embargo como se puede apreciar en la Tabla 4 de la sección 3.8.2 la concentración de sus componentes es diferente, esto sería una atribución a la diferencia entre los rendimientos en la producción de H₂ al comparar los trabajos de investigación. Otras razones podrían atribuirse al origen del inóculo, Moreno y colaboradores en el año 2015 emplearon biomasa proveniente de un lodo anaerobio, mientras que García-Depraect & León-Becerril en el 2018 emplearon un consorcio codificado como PTA-124566 por la Colección Americana de Cultivos Tipo, *American Type Culture Collection* (ATCC), por otro lado en el presente proyecto de investigación el inóculo proviene de un biorreactor tipo filtro percolador escala piloto cuya biomasa originalmente fue obtenida a través de fermentación natural del sustrato. De acuerdo con Akutsu y colaboradores en el año 2009, el inóculo y el sustrato empleado tienen una influencia significativa en el rendimiento de producción de H₂, estos rendimientos pueden variar de un inóculo a otro y entre sustratos diferentes, debido a la naturaleza de este y a la comunidad microbiana que esté implicada en la biomasa.

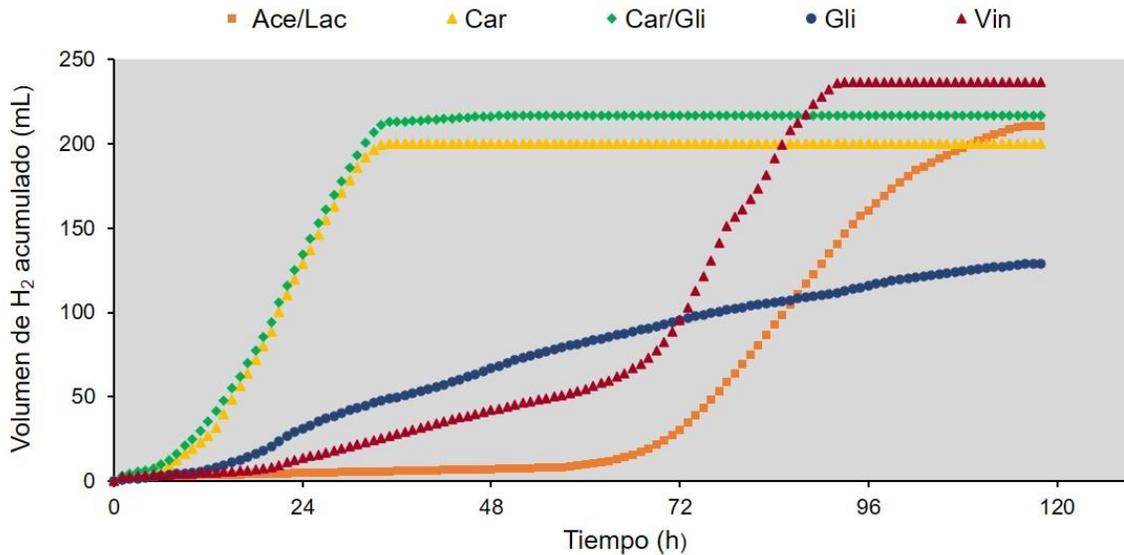


Figura (14). Volumen de biogás producido por sustrato empleado. Ace/Lac: Sustrato de Ácidos Acético y Láctico, Car: Sustrato de Carbohidratos, Car/Gli: Sustrato de Carbohidratos y Glicerol, Gli: Sustrato de Glicerol, Vin: Sustrato de Vinazas.

La determinación de la composición de biogás mostró que además de H_2 , el otro producto gaseoso fue CO_2 , el cual no está representado en la Figura (14), debido a la trampa de dióxido de carbono del equipo AMPTS II, por lo tanto, los datos graficados corresponden a producción neta de biohidrógeno, tampoco fue detectada la presencia de metano, lo cual significa que no hay presencia de microorganismos metanogénicos y por lo tanto el proceso de fermentación oscura se llevó a cabo de manera adecuada, sin continuar con proceso de digestión anaerobia.

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, de los volúmenes máximos producidos de biohidrógeno en los diferentes sustratos evaluados, se comprobó que no hay una diferencia significativa entre ellos (ANOVA, valor de $P=0.0002845$, valor de $\alpha=0.05$). El sustrato Carbohidratos-Glicerol obtuvo la segunda mayor producción de biohidrógeno, además de que su comportamiento en todas las fases; Lag, exponencial y estacionaria (esta denominación también se ha reportado en bibliografía, para las fases de producción de biohidrógeno; Davila-Vazquez *et al.*, 2008; García-Depraect *et al.*, 2019; Carrillo-Reyes *et al.*, 2019) fue muy similar al desempeño obtenido por el sustrato de Carbohidratos, resultando en una producción 7.5% mayor con respecto a este sustrato, (Diferencia no significativa,



ANOVA, valor de $P= 0.0002845$, valor de $\alpha= 0.05$), lo cual se puede apreciar en la Figura (14). Por lo que se infiere que el desempeño del sustrato Carbohidratos-Glicerol está fuertemente determinado por el consumo del primer componente del sustrato; Carbohidratos, a pesar de encontrarse en menor concentración inicial que el Glicerol (las concentraciones iniciales de ambos sustratos pueden apreciarse en la Tabla 5). Las productividades de H_2 de los sustratos Carbohidratos y Glicerol/Carbohidratos fueron 200.23 mL y 216.63 mL respectivamente, las cuales fueron menores a la reportada por Amin y colaboradores en el año 2016, donde al emplear sacarosa como sustrato, obtuvieron una producción de 1365.7 mL. La producción máxima de mL de H_2 de los diferentes sustratos puede ser visualizada en la Tabla 8. La fase lag del sustrato Carbohidratos y el sustrato Glicerol/Carbohidratos tuvieron una duración de 11 horas, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Amin y colaboradores (2016) cuya fase lag fue de 8.7 horas, al emplear sacarosa como sustrato. Las bajas duraciones de la fase lag se explican mediante la alta disponibilidad de los carbohidratos en el sustrato sintético y por lo tanto la facilidad con la cual los microorganismos pueden utilizarlos, en este sentido la sacarosa empleada como sustrato, está compuesta por glucosa y fructosa, monosacáridos que de acuerdo con Quéméneur y colaboradores en el año 2011, son los carbohidratos que mejor rendimiento tienen en la producción de biohidrógeno. Mientras que, en las vinazas (cuya fase lag dura 75 horas) los carbohidratos pueden encontrarse en estructuras más complejas lo que dificulta el acceso a ellos. Por ejemplo las arabinans, las cuales son pequeños polímeros de cadenas de arabinosas, estos polímeros han sido detectados en el final del proceso de fermentación y también en el vino tinto (Madalena *et al.*, 2014), por otro lado en desechos vitivinícolas también se han detectado carbohidratos de naturaleza celulósica y hemicelulósica (Zacharof, 2016).

Otro parámetro en el cual se puede visualizar el efecto que tienen los carbohidratos es el valor de velocidad (mL H_2 / h) de producción de H_2 en la fase exponencial (R_{max}) del sustrato Carbohidratos y el sustrato Carbohidratos-Glicerol, el cual se puede visualizar en las Figuras (14), (16) y Tabla (9). R_{max} es el valor de la pendiente de la fase exponencial, este valor fue obtenido mediante regresión lineal



en Excel, el valor de R^2 de las rectas generadas fue de .99, el valor de 1 significa una recta perfecta. Los valores de R_{max} del sustrato Carbohidratos y el sustrato Carbohidratos/Glicerol son mayores en comparación al valor obtenido cuando se emplea como sustrato principal al glicerol, en donde no hubo presencia de carbohidratos. A pesar de ello, el valor de R_{max} para ambos sustratos fue menor que el obtenido por Amin y colaboradores en el año 2016, donde al emplear sacarosa como sustrato obtuvieron un valor de R_{max} de 278.5 mL /h. Es importante destacar que el valor de R_{max} de los sustratos Acético-Láctico (producción de H_2 máxima= 210.4 mL), sustrato Carbohidratos y sustrato Carbohidratos-Glicerol, son cercanos al valor de R_{max} de la segunda fase exponencial del sustrato Vinazas, mientras que el valor de R_{max} del sustrato Glicerol (cuyo valor fue el menor de todos los sustratos evaluados, 1.14 mL/h) es similar al valor de R_{max} de la primera fase exponencial del sustrato vinazas, teniendo una diferencia de solo 4.21 % entre sí. Por otro lado, la duración de la fase lag obtenida en el sustrato Ace/Lac es similar a la duración de la fase lag obtenida en el sustrato Vinazas, existiendo entre ellas solo una diferencia del 0.4%. Estas duraciones fueron 21% menor que la obtenida por García-Depraect y colaboradores en el año 2019 donde la fase lag fue de 94 horas al emplear vinazas de tequila. Todos estos resultados contrastan con la duración de la fase lag obtenida por Matsumoto & Nishimura (2007), donde evaluaron la producción de biohidrógeno a partir de una mezcla de ácido acético y láctico con concentraciones iniciales de 2 g/L y 0.5 g/L, respectivamente obteniendo una fase lag de aproximadamente de 4 horas. Por otro lado al comparar los rendimientos experimentales, el sustrato Aceto/Láctico tuvo un rendimiento de 526 mL H_2 /L_{sustrato}, el sustrato Carbohidratos 500 mL H_2 /L_{sustrato}, el sustrato Carbohidratos/Glicerol 541.57 mL H_2 /L_{sustrato}, el sustrato Glicerol 322.5 mL H_2 /L_{sustrato} y las vinazas vitivinícolas 1182 mL H_2 /L_{sustrato} en este sentido es importante denotar que valores altos de R_{max} y bajas duraciones de la fase lag no siempre están asociadas con la producción máxima de biohidrógeno ni con los rendimientos más altos por L de sustrato empleado, lo cual concuerda con lo reportado por Moreno-Andrade y colaboradores (2015).

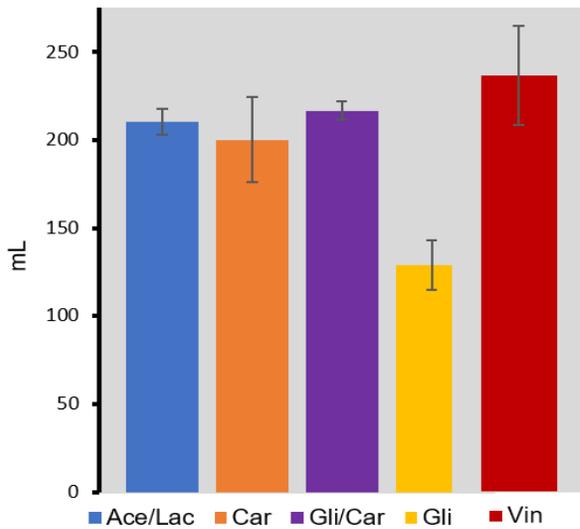


Figura (15). Volumen máximo de biohidrógeno producido por sustrato. Hmax

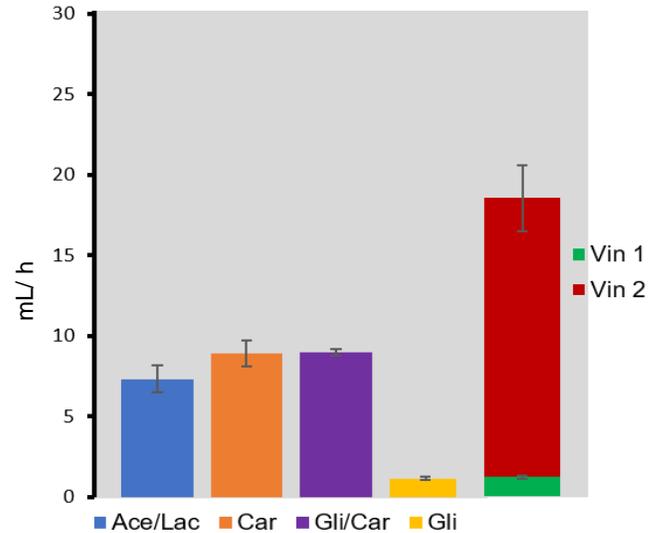


Figura (16). Valor de la fase exponencial de producción de biohidrógeno por sustrato. Rmax

Sustrato	Volumen máximo de biohidrógeno producido por sustrato
Acético-Láctico	210.4
Carbohidratos	200.23
Carbohidratos-Glicerol	216.363
Glicerol	129
Vinazas	236.56

Tabla (8). Valores de volumen máximo de biohidrógeno producido por sustrato.

Sustrato	Valor de Rmax (mL/h)
Acético-Láctico	7.33
Carbohidratos	8.93
Carbohidratos-Glicerol	9
Glicerol	1.14



Vinazas Pendiente 1	1.20
Vinazas Pendiente 2	17.33

Tabla (9). Valores de Rmax (mL/h) para cada sustrato evaluado

En cuanto a los análisis para determinar la concentración de sólidos, los sustratos sintéticos tuvieron resultados muy similares entre sí, mientras que el sustrato de vinazas vitivinícolas en los 3 tipos de determinación de sólidos se obtuvieron mayores concentraciones, debido a que este sustrato de manera natural contiene sólidos provenientes del proceso de producción de vino. Estos valores están representados en la Tabla (10). De acuerdo a datos presentados por Bilotta y Brazier en el año 2008 uno de los límites permitidos de concentración de sólidos suspendidos en el agua es de 250 mg/L, los valores obtenidos en el efluente al final de fermentación oscura en el presente proyecto de investigación son mayores a ese límite, por cual se hace la recomendación de utilizar dichos residuos como sustrato en un proceso de fotofermentación, ya que se ha demostrado que al acoplar ambos procesos se puede reducir en mayor medida la carga orgánica del sustrato (Rai & Singh, 2016). Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) son un parametro que proporciona información de la concentración de biomasa y microorganismos (Lin *et al.*, 2011), entre los sustratos sintéticos este valor no tuvo una diferencia mayor a .12 g/L, mientras que en el sustrato de vinazas vitivinícolas este valor fue entre 80.34% y 73.6% mayor que el obtenido en los 4 sustratos anteriores, por lo cuál se podrían realizar dos inferencias; i) Las vinazas vitivinícolas tenían una carga natural importante de biomasa y por lo tanto de microorganismos, 2) Las vitivinícolas propiciaron un aumento en la concentración de biomasa durante el proceso de fermentación oscura. Lin y colaboradores en el año 2011 registraron una concentración de SSV de 4.99 g/L al emplear como inóculo una microflora mixta de semillas en un biorreactor escala piloto para la producción de H₂ usando como sustrato sacarosa, mientras que en el presente proyecto de tesis al emplear un inóculo proveniente de un biorreactor tipo filtro percolador escala piloto, cuya



biomasa originalmente fue obtenida por fermentación natural, se obtuvo una concentración de SSV de 1.78 g/L, utilizando como sustrato vinazas vitivinícolas.

Sustrato	SST (g/L)	SSF (g/L)	SSV (g/L)
Acético-Láctico	0.47 ± .03	0.12 ± .02	0.35 ± .04
Carbohidratos	0.48 ± 5.x10 ⁻³	0.04 ± 5.x10 ⁻³	0.43 ± 1.x10 ⁻³
Carbohidratos-Glicerol	0.47 ± .02	0.03 ± 8.x10 ⁻³	0.44 ± .013
Glicerol	0.49 ± .03	0.026 ± .01	0.47 ± .03
Vinazas	2.01 ± .12	0.23 ± .03	1.78 ± .1

Tabla (10). Valores de concentración de Total de sólidos solubles (SST), Sólidos solubles fijos (SSF), Sólidos solubles volátiles (SSV), al final de las cinéticas de los sustratos evaluados.

9.2 Cinética de consumo de sustratos y producción de metabolitos

De acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación de ácidos grasos volátiles y solventes mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), se obtuvieron las siguientes Figuras (17), (18), (19), (20) y (21), en donde se representa la cinética de consumo de componentes presentes en los sustratos Aceto-Láctico, Carbohidratos, Carbohidratos-Glicerol, Glicerol y Vinazas respectivamente. Así como la producción de biohidrógeno y metabolitos con respecto al tiempo.

En la Figura (17) se puede observar que al emplear como sustrato principal una mezcla de ácido acético y ácido láctico (Sustrato Aceto/Láctico), se observa un consumo gradual y similar de estos componentes del sustrato hasta llegar a las 74 horas de experimento, donde termina la fase lag y comienza la fase exponencial de producción de biohidrógeno, aumentando también exponencialmente la producción de ácido butírico. Se obtuvieron 1.03 g (Obteniendo una concentración final de 5.24 gDQOe/L) de ácido butírico a partir de las concentraciones iniciales de los ácidos acético y láctico, siendo la mayor concentración obtenida por los sustratos sintéticos y solo detrás de las vinazas vitivinícolas por una diferencia del 4.9 %. Esta información coincide con lo reportado por Diez-Gonzales y colaboradores en el año



1995, en donde a partir de emplear ácido láctico y ácido acético como cosustrato, se obtiene una producción de biohidrógeno y ácido butírico. A partir del inicio de la fase exponencial ocurre otro fenómeno, en el cual el ácido láctico sigue degradándose para la producción de ácidos orgánicos y H_2 , pero por otro lado el ácido acético probablemente entra en un estado de equilibrio en el cual es consumido para la producción de otros ácidos orgánicos y biohidrógeno, pero a la vez, también es un metabolito producido probablemente por la metabolización del lactato, ya que partir de la hora 73 su concentración empieza a oscilar entre los 3.6 y 4 g DQOe/L. En algunos estudios se ha demostrado que al fermentar lactato se pueden obtener otros ácidos orgánicos a parte del ácido butírico como; ácido acético, propiónico y valérico (Sikora *et al.*, 2013), esto coincide con los datos representados en la Figura (17) en donde la producción de ácidos orgánicos como valérico, isovalérico y caproico está representada por el conjunto C5-C6, además que la fermentación del lactato podría contribuir en alguna proporción a la regeneración de ácido acético. A las 73 horas del experimento, había en el sustrato 2.53 g de ácido láctico, mientras que a las 117 horas solo quedaban 2.4×10^{-2} g, esto coincide con la fase exponencial de producción de H_2 de este sustrato. Por otro lado, también hubo producción de ácido propiónico, el cual comienza a ser producido de manera exponencial a la par de la producción exponencial de H_2 , esto se explica de acuerdo con la literatura en la cual se menciona que la producción de ácido propiónico es una ruta de consumo de biohidrógeno, donde se utiliza un mol de H_2 para producir un mol de ácido propiónico, debido a ello el rendimiento de producción del biocombustible puede verse afectado (Kim & Kim, 2011). En el presente trabajo de investigación al emplear el sustrato de Aceto-Láctico hubo producción de ácido propiónico de 2×10^{-2} g (Finalizando en una concentración de 0.1 g DQOe/L). En el consumo de este sustrato también se detectó que hubo producción de ácido succínico (0.18 g), quedando en una concentración final de .52 g DQOe/L. El ácido succínico se encuentra representado en la Figura (17), en la gráfica denominada como Otros, este conjunto de Otros abarca además a los solventes Etanol y butanol. En la literatura se ha reportado que la síntesis de ácido succínico y butanol durante el proceso de fermentación oscura implica el consumo

de H₂ (Sydney, 2013; Palomo-Briones *et al.*, 2017; Taheri *et al.*, 2018), mientras que por otro lado la producción de etanol, no consume H₂, ni lo produce a menos que se den ciertas condiciones especiales (Blanco & Rodríguez, 2012; Toledo-Alarcón *et al.*, 2018), esta información está descrita en el marco teórico, sección 3.8.

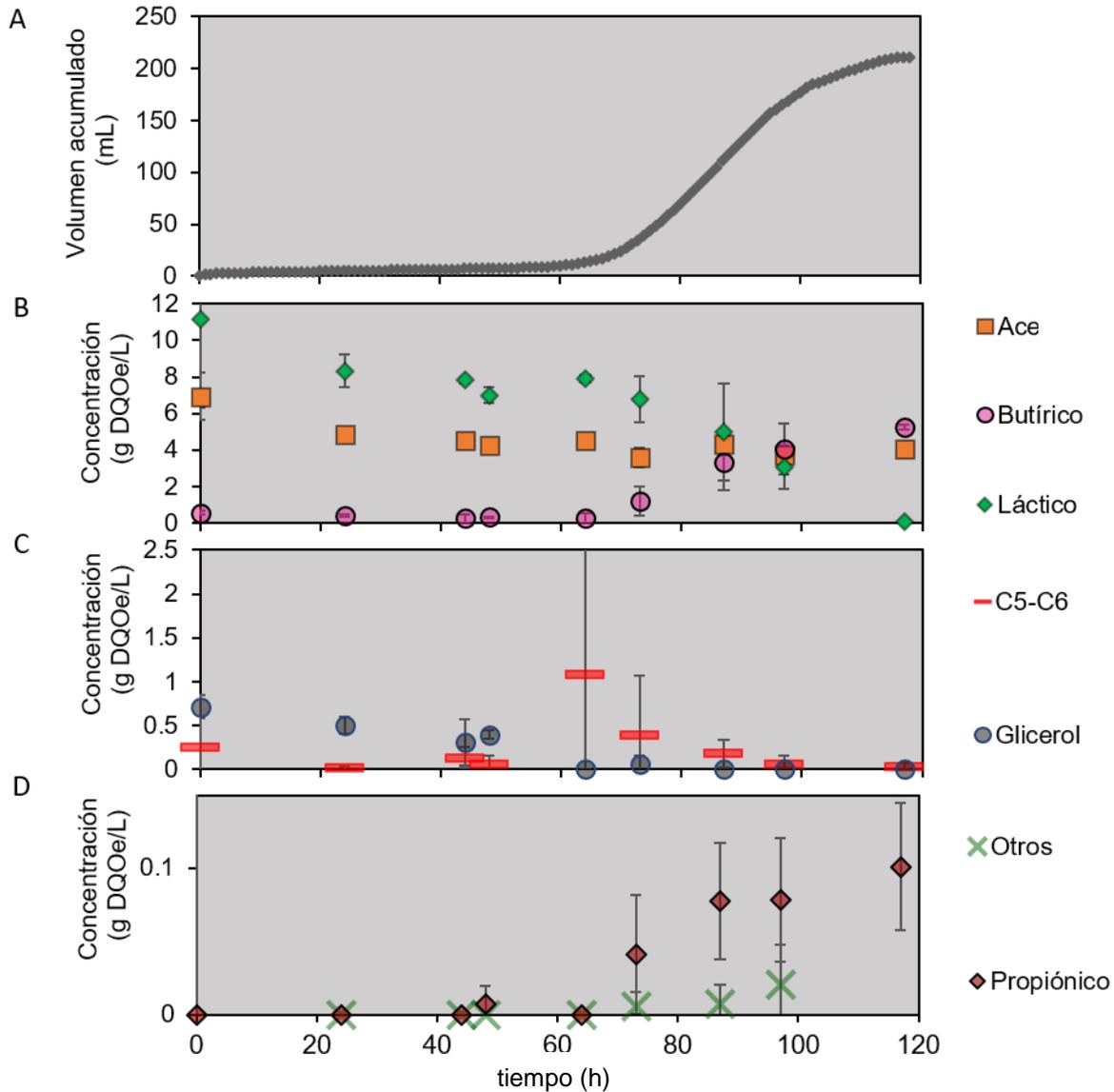


Figura (17). Metabolitos presentes en cinética de consumo usando el sustrato 1 Ácido acético y ácido láctico. Demanda Química de Oxígeno equivalente (DQOe), A) Volumen acumulado (mL), B) Concentración (g DQOe/L), C) Concentración (g DQOe/L), D) Concentración (g DQOe/L). C5-C6 = valérico, isovalérico y caproico. Otros= Etanol. Butanol y succínico.



Al emplear el sustrato Carbohidratos, específicamente sacarosa, se puede observar el consumo de este compuesto con respecto al tiempo en la Figura (18), mientras que los metabolitos; ácido butírico, ácido acético y ácido valérico son sintetizados, obteniendo concentraciones finales de 1.07 g/L (1.93 g DQOe/L), 0.31 g/L (0.33 g DQOe/L) y .62 g/L (1.26 g DQOe/L) respectivamente. Esto coincide con Amin y colaboradores en el año 2016, en donde al fermentar sacarosa y sus componentes por separado (glucosa y fructosa), los principales ácidos orgánicos obtenidos son los ácidos butírico, acético y valérico, obteniendo concentraciones finales de 1.4 g/L (2.5 g DQOe/L), 1.6 g/L (1.7 g DQOe/L) y 0.1 g/L (0.2 g DQOe/L) respectivamente a partir de concentraciones iniciales de 7.1 g/L de sacarosa. A las 0 horas del experimento, había en el sustrato 0.66 g de carbohidratos, mientras que a las 38 horas solo quedaban 2.4×10^{-2} g, este intervalo coincide con la fase exponencial de producción de H_2 de este sustrato. En el sustrato Carbohidratos fue en donde se obtuvo una mayor producción de ácido valérico en comparación a los otros 4 sustratos evaluados en el presente proyecto de investigación. A parte de la producción del ácido valérico, otro ácido orgánico cuya ruta de producción consume H_2 y que fue detectado al fermentar este sustrato, es el ácido propiónico el cual tuvo una concentración final de 9×10^{-2} g/L (0.13 g DQOe/L), la cual fue 96.7% menor que la obtenida al emplear como sustrato a los ácidos acético-láctico (Sustrato Aceto/Láctico). Al emplear el sustrato Carbohidratos, en la Figura (18) se puede apreciar el consumo de glicerol, el cuál es residual de la adición del inóculo (Sección 8.1), sin embargo la concentración inicial de los carbohidratos es 2.32 veces superior a la concentración inicial del glicerol, siendo 1.65 g/L y 0.70 g/L respectivamente, además en el sustrato Carbohidratos solamente se consumieron 0.2 g de glicerol, mientras que en el Sustrato Glicerol-Carbohidratos se consumieron 1.4 g de glicerol.

En la Figura (19) están representados los componentes consumidos y los metabolitos producidos al emplear el sustrato Glicerol-Carbohidratos. En este sustrato se puede apreciar que el consumo de carbohidratos y glicerol corresponden con la producción de biohidrógeno, sin embargo, mientras que los carbohidratos son consumidos casi en su totalidad (Consumo del 97 %), el glicerol tuvo un consumo



del 22.7 %, lo cual puede ser apreciado en la Figura (19), inciso D. Los carbohidratos tuvieron una concentración inicial de 1.64 g/L y al final de la fermentación su concentración fue 4×10^{-2} g/L, mientras que el glicerol tuvo una concentración inicial de 15.59 g/L y al final de la fermentación su concentración fue de 12.05 g/L. A las 0 horas del experimento, había en el sustrato 0.66 g de carbohidratos, mientras que a las 38 horas solo quedaban 2.4×10^{-2} g, este intervalo coincide con la fase exponencial de producción de H_2 de este sustrato. Es importante recalcar algunas diferencias con respecto al sustrato Carbohidratos, por ejemplo, en este caso el ácido acético no es un metabolito producido, si no que a partir de una concentración inicial de 0.6 g/L (0.65 g DQOe/L) se consumió aproximadamente el 41%. El ácido butírico fue el ácido orgánico principalmente producido alcanzando una producción 8.55% mayor que la obtenida por el sustrato Carbohidratos (Concentraciones finales de ácido butírico respectivas de cada sustrato 2.12 g DQOe/L y 1.93 g DQOe/L), esta diferencia puede deberse a la metabolización del glicerol, el cual dio como resultado una mayor producción de ácido butírico, ya que la concentración de carbohidratos en ambos sustratos es muy similar. Es interesante que no hubiera producción de ácido valérico como en los sustratos previos, mientras que las concentraciones finales de los ácidos succínico y propiónico fueron; 2×10^{-2} g/L (1.6×10^{-2} gDQOe/L) y 0.1 g/L (0.2 g DQOe/L).

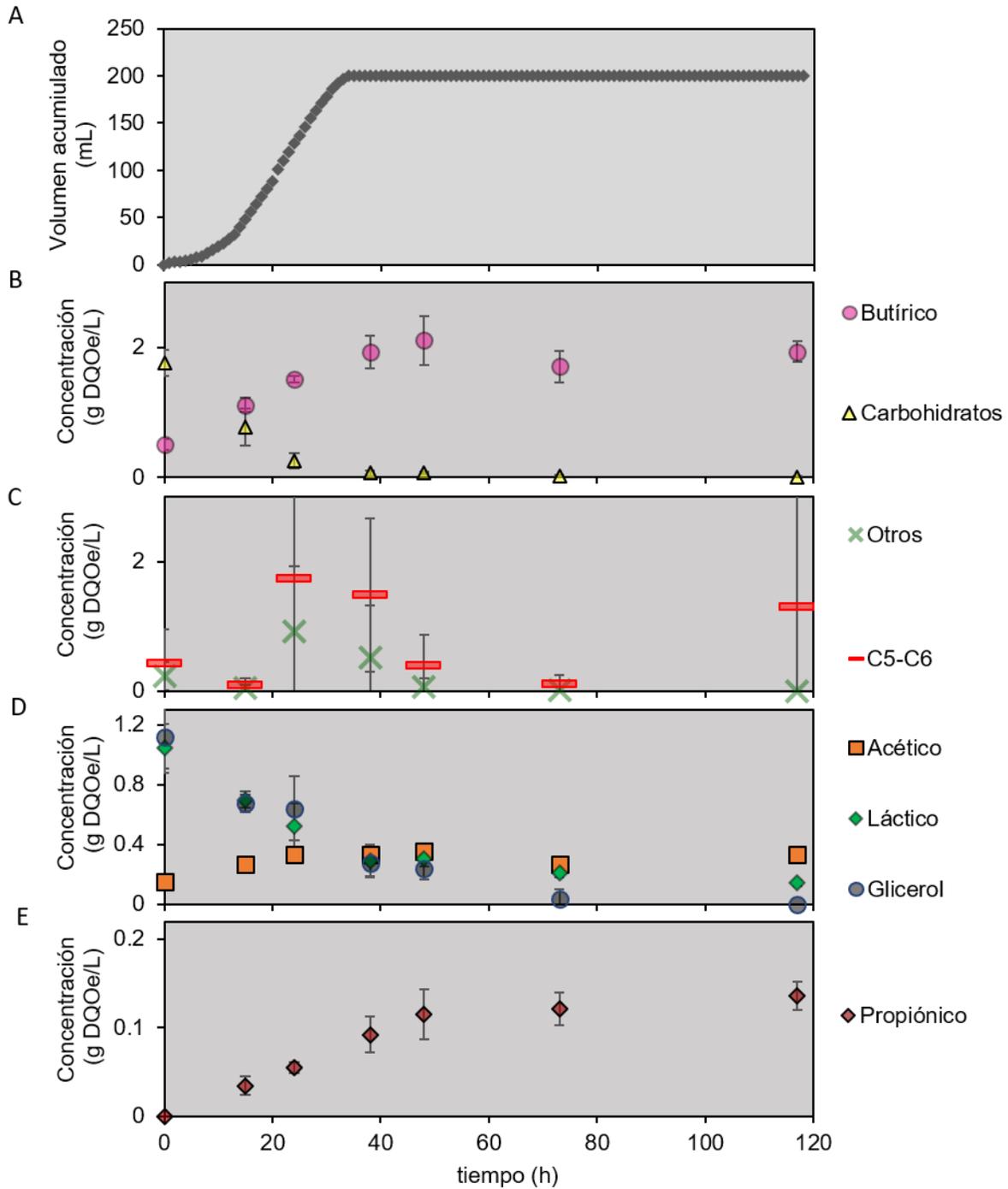


Figura (18). Metabolitos presentes en cinética de consumo usando el Sustrato 2 Carbohidratos. Demanda Química de Oxígeno equivalente (DQOe), A) Volumen acumulado (mL), B) Concentración (g DQOe/L), C) Concentración (g DQOe/L), D) Concentración (g DQOe/L). C5-C6 = valérico, isovalérico y caproico. Otros= Etanol, Butanol y succínico

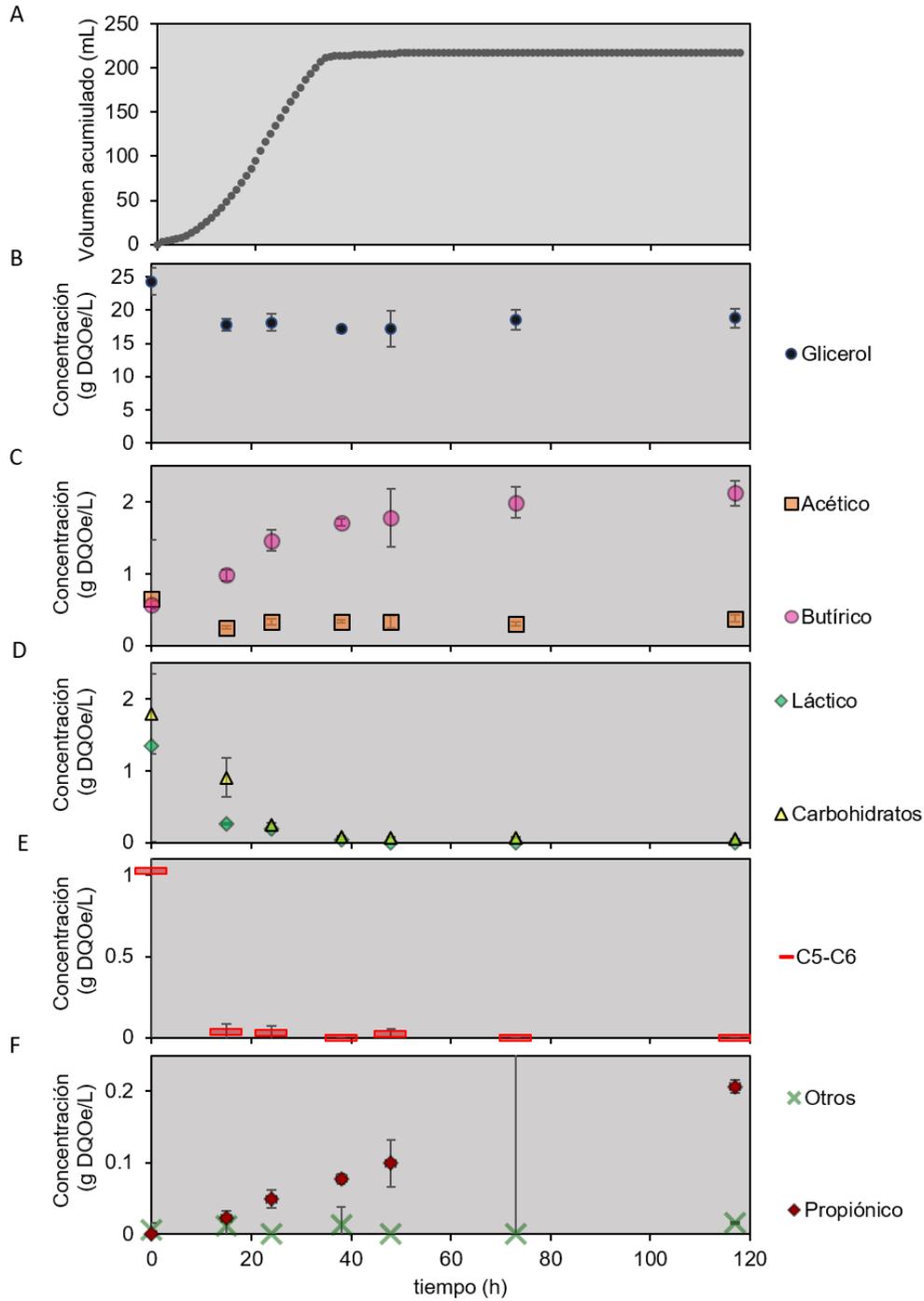


Figura (19). Metabolitos presentes en cinética de consumo Sustrato 3 Glicerol y Carbohidratos. Demanda Química de Oxígeno equivalente (DQOe), A) Volumen acumulado (mL), B) Concentración (g DQOe/L), C) Concentración (g DQOe/L), D) Concentración (g DQOe/L). C5-C6 = valérico, isovalérico y caproico. Otros= Etanol. Butanol y succínico



En la cinética de consumo del sustrato Glicerol representada en la Figura (20) el rendimiento de producción de H₂ utilizando glicerol como sustrato fue de 2263 ml H₂ por cada L de glicerol utilizado, este resultado es aproximadamente el 70% del rendimiento obtenido por Lo y colaboradores en el año 2013, en donde obtuvo una producción de 3226 ml por cada L de glicerol. Las concentraciones iniciales para cada experimento fueron de 13.36 g/L y 10 g/L respectivamente. Como se puede apreciar en la Figura (20) el glicerol tuvo un consumo del 58.3 %, pasando de una concentración inicial de 13.36 g/L (20.84 g DQOe/L) a una concentración final de 5.57 g/L (8.69 g DQOe/L). Este sustrato tuvo un comportamiento muy característico al presentar la menor velocidad de producción en mL de H₂ (R_{max}) (Figura 16) (Tabla 9), sin embargo, su fase exponencial de producción de H₂ fue la que mayor duración tuvo (Aproximadamente 107 horas). De manera similar a los resultados obtenidos con los sustratos anteriores, el ácido butírico fue el ácido orgánico principalmente producido, alcanzando una concentración final de 1.95 gDQOe/L. El ácido acético no fue un ácido orgánico producido, similitud que comparten este sustrato y el sustrato Glicerol-Carbohidratos, ya que a partir de la concentración inicial (0.1 g/L- 0.1 g DQOe/L), fue totalmente degradado después de la hora 48. En contraste al este proyecto de investigación, el estudio realizado por Akutsu y colaboradores en el año 2009 en donde se empleó glicerol como sustrato en la producción de H₂, se obtuvo como resultado 1,3-propanodiol y ácido acético. Entre los sustratos sintéticos evaluados en el presente proyecto de investigación, el sustrato de glicerol fue el que mayor producción de ácido propiónico tuvo, siendo 0.42 gDQOe/L su concentración final, además fue el único sustrato sintético en el cual se registró producción de butanol (Concentración final de 7×10^{-2} g/L – 0.18 g DQOe/L), no se registró producción de ácidos C5-C6 (Valérico, Isovalérico, Caproico), esto concuerda con lo reportado por Lo y colaboradores en el año 2013, donde al emplear glicerol como sustrato para la producción de H₂ mediante fermentación oscura se identificó la producción de butanol y no se reportó la presencia de ácido valérico.

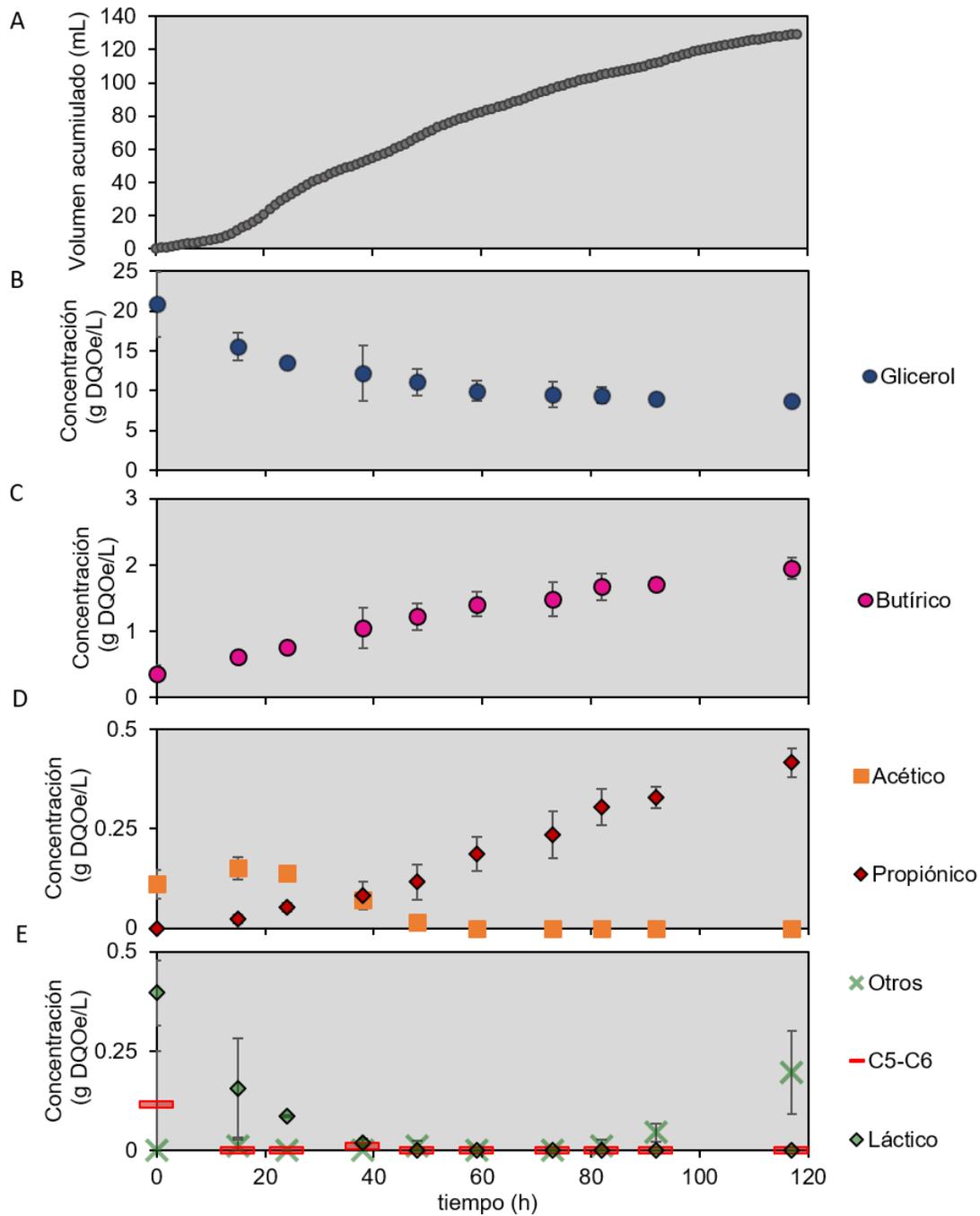


Figura (20). Metabolitos presentes en cinética de consumo Sustrato 4 Glicerol. Demanda Química de Oxígeno equivalente (DQOe), A) Volumen acumulado (mL), B) Concentración (g DQOe/L), C) Concentración (g DQOe/L), D) Concentración (g DQOe/L). C5-C6 = valérico, isovalérico y caproico. Otros= Etanol. Butanol y succínico

La cinética de consumo y producción de metabolitos al emplear como sustrato a las vinazas vitivinícolas está representada en la Figura (21).

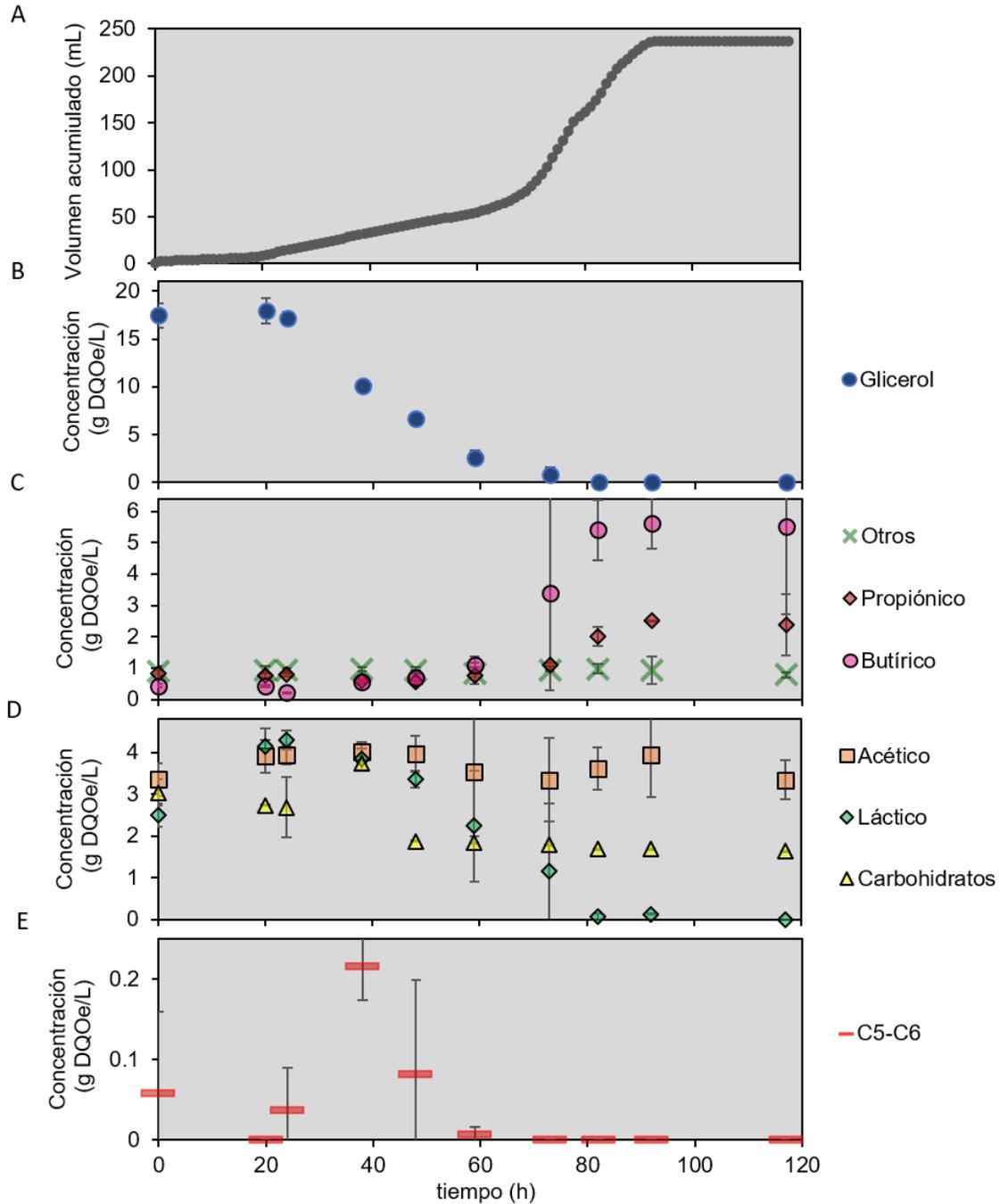


Figura (21). Metabolitos presentes en cinética de consumo Sustrato 5 Vinazas. Demanda Química de Oxígeno equivalente (DQOe), A) Volumen acumulado (mL), B) Concentración (g DQOe/L), C) Concentración (g DQOe/L), D) Concentración (g DQOe/L). C5-C6 = valérico, isovalérico y caproico. Otros= Etanol. Butanol y succínico



En la cinética de consumo del sustrato Vinazas (Figura 21) se pueden apreciar comportamientos de los componentes y de los metabolitos previamente descritos en sustratos anteriores, además de diferencias interesantes. El ácido graso principalmente sintetizado fue el ácido butírico, alcanzando una concentración de 3 g/L (5.5 g DQOe/L). En este sustrato las cinéticas de producción de biohidrógeno y ácido butírico coinciden con las cinéticas de consumo de los componentes; carbohidratos, glicerol y ácido láctico.

En el sustrato Glicerol y en el sustrato Vinazas, la fase exponencial de consumo del componente glicerol es a las 24 horas de experimento, sin embargo, en el primer sustrato el componente glicerol no es totalmente degradado (Concentración final 5.57 g/L), mientras que en el último sustrato el componente es totalmente consumido a las 82 horas.

Con respecto al componente ácido láctico, en el sustrato Vinazas, la fase exponencial de consumo del componente empezó a las 24 horas, mientras que, en el sustrato Aceto-Láctico, el inicio fue a las 64 horas, esta diferencia podría atribuirse a la comunidad microbiana que se encuentra presente en los sustratos (Lo cual será explicado en la Sección 9.3), la importante comunidad de *Lactobacillus* presente en el sustrato vinazas provocó un aumento en la concentración de ácido láctico dentro de las primeras 24 horas, pasando de 2.34 g/L (2.5 g DQOe/L) a 4 g/L (4.3 g DQOe/L), para que posteriormente los microorganismos pertenecientes al género *Clostridium* pudieran producir biohidrógeno. En el sustrato Vinazas el compuesto ácido láctico fue consumido totalmente a las 92 horas.

En cuanto a los carbohidratos presentes en el sustrato Vinazas, el hecho de que no existiera un consumo total de este componente, el cual tuvo una concentración final de 1.53 g/L (1.6 gDQOe/L), lleva a la suposición de que los carbohidratos residuales son estructuras complejas o que no fueron de fácil acceso para los microorganismos. Algunos de estos carbohidratos podrían ser las arabinans, las cuales son pequeños polímeros de cadenas de arabinosas, estos polímeros han sido detectados en el final del proceso de fermentación y también en el vino tinto (Madalena *et al.*, 2014), por otro lado en desechos vitivinícolas también se han



detectado carbohidratos de naturaleza celulósica y hemicelulósica (Zacharof, 2016). De acuerdo con los resultados obtenidos por García-Depraect & León-Becerril (2018), al emplear vinazas tequileras como sustrato en la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura, los carbohidratos presentes en las vinazas no fueron totalmente consumidos, siendo degradados solamente el 61.4%, de manera análoga en el presente proyecto de investigación, al emplear vinazas vitivinícolas como sustrato se degradaron solamente el 54% de la concentración inicial de carbohidratos (2.84 g/L – 3 g DQOe/L). Otra razón que podría argumentar este punto sobre los carbohidratos es el tiempo que se requirió para su consumo en el sustrato Vinazas, mientras que en el sustrato Carbohidratos, a las 24 horas de experimento ya se había consumido el 86 % de la sacarosa, en el sustrato Vinazas a esa misma hora solo se había consumido el 11.5 % de los carbohidratos.

Por otro lado, el componente ácido acético en el sustrato Vinazas presentó un comportamiento similar al observado en el sustrato sintético Acético-Láctico, en donde existe un equilibrio entre su consumo y producción, siendo 3.76 g/L (4 gDQOe/L) su mayor concentración y 3.14 g/L (3.34 gDQOe/L) su menor concentración. Es probable que su síntesis se deba a la metabolización del ácido láctico.

Al emplear Vinazas Vitivinícolas como sustrato también hubo una producción de ácido propiónico, siendo la mayor concentración 1.58 g/L (2.38 gDQOe/L) entre los sustratos evaluados, 82.36 % mayor que la concentración obtenida en el sustrato Glicerol, estos resultados coinciden con el estudio realizado por Luo y colaboradores en el año 2019, en donde al emplear vinazas vitivinícolas para la producción de ácidos orgánicos, su principal producción fue de ácido acético y ácido propiónico. Del total de ácidos grasos producidos en la fermentación del sustrato Vinazas, el ácido butírico representa el 49.02%, el ácido acético representa el 29.8% mientras que el propiónico representa el 21.17%, un porcentaje de producción elevado que pudo afectar el rendimiento final de producción de H₂. Esto concuerda con el estudio realizado por Buitrón y colaboradores en el año 2014, en donde al emplear vinazas vitivinícolas como sustrato, el principal ácido graso producido fue butírico (46%),



seguido del ácido acético (32 %). Otro ácido orgánico cuya producción implica el consumo de H_2 y que fue registrado al fermentar el sustrato de vinazas fue el ácido succínico, el cual tuvo una concentración final de 0.83 g/L (0.83 g DQOe/L).

De toda la información discutida sobre las cinéticas de consumo de componentes del sustrato y producción de metabolitos, se pueden resaltar los siguientes puntos;

- El ácido butírico fue el ácido orgánico que mayor producción tuvo en los 5 sustratos evaluados, siendo su máxima concentración 3 g/L (5.51 g DQOe/L), en el sustrato Vinazas Vitivinícolas, mientras que el sustrato Aceto/Lac fue el segundo mayor productor de ácido butírico 2.9 g/L (5.24 g DQOe/L). En los 5 sustratos evaluados, la cinética de producción de ácido butírico coincide con la cinética de producción de H_2 , por lo cual se podría inferir que la ruta de producción de ácido butírico es la principal responsable de la producción de biohidrógeno en el presente proyecto de tesis.
- El componente ácido acético fue consumido en el sustrato Glicerol y en el sustrato Carbohidratos/Glicerol, mientras que en el sustrato Aceto/Láctico y en el sustrato Vinazas, se encontraba en equilibrio, siendo degradado para la producción de otros ácidos orgánicos y H_2 , mientras que a la vez era sintetizado, probablemente esto se deba a la metabolización del componente ácido láctico. A pesar de ello, el ácido acético fue el segundo ácido orgánico mayormente producido al fermentar el sustrato Vinazas, representando el 29.8% del total de ácidos grasos producidos.
- El sustrato de Carbohidratos fue el que mayor producción de ácido valérico tuvo en los 5 sustratos evaluados, En los 5 sustratos evaluados las cinéticas de producción de ácido propiónico concuerdan con la cinética de producción de H_2 , debido a que la ruta de producción de este ácido es consumidora de hidrógeno, pudiendo afectar el rendimiento en la producción de este biocombustible. Además, en el sustrato Vinazas, se obtuvo una concentración final de 0.83 g/L de ácido succínico, cuya ruta de producción también es consumidora de H_2 .



Para determinar el volumen de producción en mL de biohidrógeno por cada gramo de DQOe consumido de los sustratos evaluados, se realizaron cálculos utilizando la Ecuación 23 que utiliza los datos de consumo de los componentes presentes en los sustratos, los cuales fueron obtenidos en las cinéticas y que además fueron registrados en la Tabla (11), así como los datos de volumen de producción máxima de H₂ presentados en la Figura (15) y Tabla (8). El cálculo fue realizado para cada sustrato. Los resultados de estos cálculos también fueron registrados en la Tabla (11). Cálculo realizado para el sustrato Aceto-Láctico (Ecuación 24), Cálculo realizado para el sustrato Carbohidratos (Ecuación 25), Cálculo realizado para el sustrato Glicerol/Carbohidratos (Ecuación 26), Cálculo realizado para el sustrato Glicerol (Ecuación 27), Cálculo realizado para el sustrato Vinazas (Ecuación

$$28). mL \frac{H_2}{gDQOe_{consumido}} = \frac{mL H_2 Experimental}{\{[\sum Consumo de componentes (\frac{gDQOe}{L})] * Volumen de trabajo (mL)\}}$$

Ecuación 23

$$mL \frac{H_2}{g} DQOe_{consumido} = \frac{210.4 mL}{\left[\left(2.883260151 \frac{gDQOe}{L} + 11.1111171 \frac{gDQOe}{L} + 0.714880491 \frac{gDQOe}{L} \right) * 0.4L \right]}$$

Ecuación (24)

$$mL \frac{H_2}{g} DQOe_{consumido} = \frac{200.23 mL}{\left[\left(0.90228446 \frac{gDQOe}{L} + 1.120942805 \frac{gDQOe}{L} + 1.760226667 \frac{gDQOe}{L} \right) * 0.4L \right]}$$

Ecuación (25)

$$mL \frac{H_2}{g} DQOe_{consumido} = \frac{216.63 mL}{\left[\left(0.272668341 \frac{gDQOe}{L} + 1.34465027 \frac{gDQOe}{L} + 5.513872876 \frac{gDQOe}{L} + 1.746248967 \frac{gDQOe}{L} \right) * 0.4L \right]}$$

Ecuación (26)

$$mL \frac{H_2}{g} DQOe_{consumido} = \frac{129 \text{ mL}}{\left[\left(0.110315163 \frac{gDQOe}{L} + 0.397282271 \frac{gDQOe}{L} + 12.144336 \frac{gDQOe}{L} \right) * 0.4L \right]}$$

Ecuación (27)

$$mL \frac{H_2}{g} DQOe_{consumido} = \frac{236.56 \text{ mL}}{\left[\left(0.002180155 \frac{gDQOe}{L} + 2.50192412 \frac{gDQOe}{L} + 17.46267537 \frac{gDQOe}{L} + 1.403396184 \frac{gDQOe}{L} \right) * 0.4L \right]}$$

Ecuación (28)

Sustrato ¹	Consumo de componentes evaluados en sustrato (g DQOe/L)				Producción H ₂ mL H ₂ /g DQOe _{consumido}
	Acético	Láctico	Glicerol	Carbohidratos	
Ace-Lac	2.90	11.11	0.71	0	35.75
Car	0	0.90	1.12	1.76	132.30
Gli-Car	0.27	1.34	5.51	1.74	61
Gli	0.11	0.40	12.14	0	25.50
Vinazas	2x10 ⁻³	2.50	17.46	1.40	27.67

Tabla (11). Consumo de componentes en g DQOe/L y producción de H₂ en mL H₂/g DQOe_{consumido}
¹Ace-Lac: Acético-Láctico; Car: Carbohidratos; Gli-Car: Glicerol-Carbohidratos; Gli: Glicerol.

Para calcular el potencial teórico de producción de biohidrógeno al emplear vinazas vitivinícolas como sustrato, se consideró el consumo en g DQOe/L de sus componentes principales: Acético-Láctico, Carbohidratos y Glicerol, junto con el volumen de trabajo y el volumen de producción en mL de H₂ por cada gramo de DQOe consumido. Cálculo representado en la Ecuación (29).

Potencial teórico

$$= \left\{ \left[\left(2x10^{-3} \frac{gDQOe}{L} + 2.5 \frac{gDQOe}{L} \right) * 0.4L * 35.75 \text{ mL} \frac{H_2}{gDQOe \text{ consumido}} \right] + \left[17.46 \frac{gDQOe}{L} * 0.4L * 25.5 \text{ mL} \frac{H_2}{gDQOe \text{ consumido}} \right] + \left[1.4 \frac{gDQOe}{L} * 0.4L * 132.3 \text{ mL} \frac{H_2}{gDQOe \text{ consumido}} \right] \right\}$$

Ecuación (29)



De acuerdo con la ecuación 29 el valor del potencial teórico fue de 288.11 mL H₂, mientras que el rendimiento obtenido experimentalmente fue de 236.56 mL H₂, siendo 17.9 % menor. Esta diferencia entre los potenciales podría explicarse por la producción de ácido propiónico, ácido valérico, ácido succínico y butanol, que ha sido ampliamente descrita en esta sección y en la sección del marco teórico. Otra razón para la diferencia entre los potenciales, es que los microorganismos implicados en la fermentación oscura, al igual que todos los seres vivos, consumen los sustratos para obtener los elementos necesarios y poder emplearlos en el crecimiento celular, para obtener la energía necesaria para realizar actividades de biosíntesis, mantenimiento celular y para poder replicarse (Ward, 1991). En el proceso de fermentación los componentes de las células microbianas, primero crecen en tamaño antes de llevar a cabo el proceso de división celular, por tal motivo la energía y el material requerido para llevar a cabo estas funciones vitales son obtenidos a partir de metabolizar una parte del sustrato en el que se encuentran, no todo el sustrato será empleado para producir los metabolitos de interés (Ghaly *et al.*, 2005).

Para calcular el porcentaje de aporte que tienen los componentes principales de las vinazas vitivinícolas en la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura, se utilizaron los datos de consumo de componentes en gDQOe/L, los datos de volumen de producción en mL de H₂ por gramo de DQOe consumido, junto con el volumen de trabajo y el rendimiento teórico calculado. Este cálculo fue realizado por cada componente de las vinazas, empleando la Ecuación (30). Estos porcentajes de aporte están representados en la Tabla (12).

% aporte producción de H₂

$$= \left[\frac{\left(\sum \text{Consumo de componentes} \left(\frac{gDQOe}{L} \right) \right) * \text{Volumen de trabajo} * \text{Volumen producción mL} \frac{H_2}{gDQOe_{consumido}}}{\text{Potencial teórico}} \right] * 100$$

Ecuación (30)

**Componente de vinazas vitivinícolas****Porcentaje de aporte en la producción de biohidrógeno**

Ácidos aceto-láctico	12.4 %
Glicerol	61.8 %
Carbohidratos	25.8 %

Tabla (12). Porcentaje de aporte en la producción de biohidrógeno de cada componente principal de las vinazas vitivinícolas

Es interesante recalcar que a pesar de que el glicerol es el componente que presenta menor rendimiento de producción de mL de hidrógeno por gramo de DQO_e consumido (25.50 mL H₂/ g DQO_e consumido), es el componente que mayor aporte tiene en la producción de biohidrógeno en las vinazas vitivinícolas, esto debido a su alta concentración inicial de 11.2 g/L, aportando 61.8 % de la producción como se puede apreciar en la Tabla (12). Este resultado es similar al obtenido por Akutsu y colaboradores en el año 2009, en donde obtuvo un rendimiento de 38 mL de H₂ por gramo de DQO_e consumido de glicerol. Mientras que para el componente carbohidratos que fue el que tuvo mejor rendimiento en la producción de mL de hidrógeno por gramo de DQO_e consumido (132.30 mL H₂/ g DQO_e consumido), su aporte fue 2.3 veces inferior al del glicerol, debido a su baja concentración inicial de 2.8 g/L en las vinazas vitivinícolas. Un fenómeno similar se observó en la cinética de consumo de componentes del sustrato Carbohidratos-Glicerol. Por otro lado, el ácido láctico, el cuál fue el segundo componente mayormente metabolizado (2.5 gDQO_e/L), en mezcla con el ácido acético, tuvo un aporte del 12.41 % en la producción de hidrógeno y un rendimiento de producción de mL de H₂ por gramo de DQO_e consumido 3.7 veces inferior al obtenido por los carbohidratos, aun cuando se encontraba en mayor concentración que ese sustrato.

Otra manera de comprobar los datos anteriormente presentados fue con los resultados de los análisis de DQO, los cuales pueden apreciarse en la Tabla (13). En donde se puede apreciar que el sustrato Carbohidratos fue el que destinó mayor porcentaje de su DQO a la producción de H₂, sin embargo la disminución de su concentración (de 5.26 g DQO_e/L a 3.86 g DQO_e/L) fue inferior a la disminución de



la concentración que presentó el componente Glicerol (de 21.8 g DQOe/L a 11.25 g DQOe/L). Por otro lado, el sustrato Acético-Láctico fue el que menor porcentaje de su DQO destinó a la producción de H₂, siendo este valor 36 veces inferior al del sustrato Carbohidratos. Es interesante denotar que los sustratos; Glicerol-Carbohidratos, Glicerol y Vinazas destinaron un porcentaje similar de su DQO a la producción de H₂.

Sustrato	DQOe inicial (g/L)	DQO final (g/L)	% DQO consumida	mg DQOe H ₂	% DQO a H ₂
Acético-Láctico	20	10.03	50.44	15.14	0.20
Carbohidratos	5.26	3.86	73.4	144.16	6.85
Glicerol-Carbohidratos	29.7	21.58	72.66	156	1.3
Glicerol	21.8	11.25	51.63	92.88	1.06
Vinazas	28.6	13.66	47.77	170.32	1.5

Tabla (13). Diferentes valores de DQO obtenidos por cada sustrato evaluado.

Al determinar la DQO durante el proceso de fermentación se puede obtener información acerca de la remoción de la carga de carbono que estaba presente en el desecho empleado como sustrato y evaluar el potencial del proceso como tratamiento de aguas residuales (Arcila & Buitrón, 2016). La Tabla (13), proporciona información acerca de la DQO inicial y final del sustrato Vinazas, donde se puede observar que entre estas dos mediciones hay una diferencia del 47.77 %. En comparación a otros estudios, Ziara y colaboradores en el año 2019, lograron remover el 30% de la DQO, cuando emplearon aguas residuales de lactato como sustrato para la producción de H₂ mediante fermentación oscura (Concentración inicial del sustrato 20.3 g DQO/L y producción de H₂ de 1384 mL). En cuanto a vinazas, García- Depraect y León Becerril (2018) lograron remover



aproximadamente el 10% de la DQO cuando emplearon vinazas tequileras como sustrato, su producción de H₂ fue de 9118 mL (Concentración inicial 58.7 g DQO/L). De acuerdo con Yilmazer y colaboradores en el año 2017, la alta productividad de biohidrógeno no siempre coincide con altas tasas de remoción de DQO durante la práctica.

9.3 Análisis de la comunidad microbiana

Para conocer la composición de las comunidades bacterianas en los diferentes sustratos evaluados, se analizó la abundancia relativa de los géneros presentes, así como la similitud entre las comunidades mediante un dendrograma, el cual puede apreciarse en la Figura (22), además de lo visualizado en esta figura, en la Tabla (14) se encuentran los porcentajes de abundancia relativa de cada género presente en la comunidad microbiana perteneciente a cada botella y sustrato. Del secuenciamiento de las 16 muestras se obtuvieron 6.8×10^5 lecturas del gen 16S ADN_r, con un promedio de 42492 lecturas por muestra. Las muestras se filtraron recortando 10 bases a la izquierda, así como en la base 250 y 220 a la derecha, para forward y reverse, respectivamente; para asegurar un índice de calidad superior a 35. Después de los cortes de las secuencias, filtrado de errores por el algoritmo DADA2, así como eliminación de secuencias quimeras, se recuperaron un promedio de 27973 lecturas por muestra.

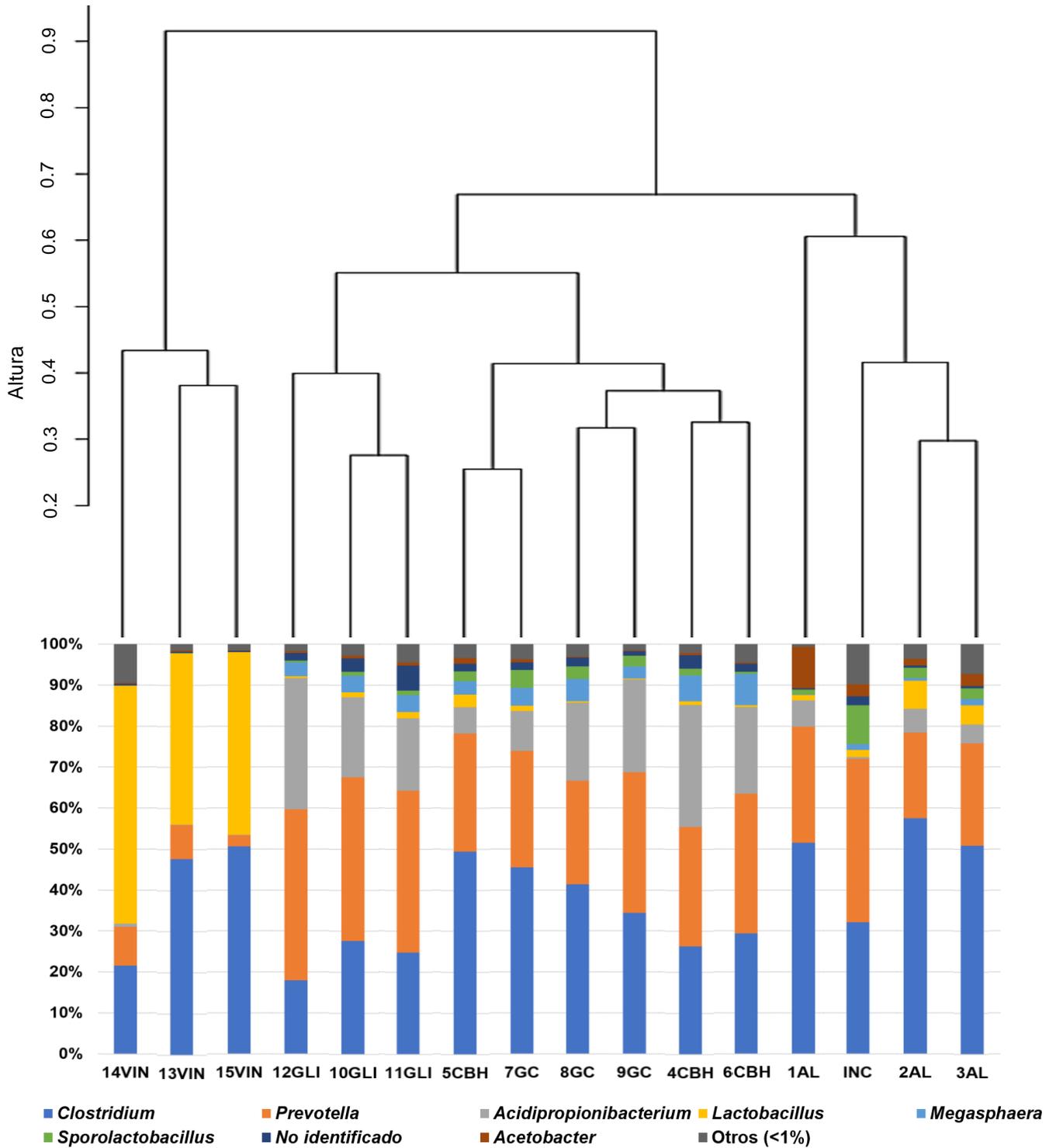


Figura (22). Clúster damerograma y composición de la comunidad microbiana por sustrato empleado. 14VIN) Botella #14 sustrato vinazas, 13VIN) Botella #13 sustrato Vinazas, 15VIN) Botella #15 sustrato Vinazas, 1AL) Botella #1 sustrato Aceto-Láctico, 2AL) Botella #2 sustrato Aceto-Láctico, 3AL) Botella #3 sustrato Aceto-Láctico, 12GLI) Botella #12 sustrato Glicerol, 10GLI) Botella #10 sustrato Glicerol, 11GLI) Botella #11 sustrato Glicerol, 5CBH) Botella #5 sustrato Carbohidratos, 7GC) Botella #7 sustrato Glicerol-Carbohidratos, 8GC) Botella #8 sustrato Glicerol Carbohidratos, 9GC) Botella #9 sustrato Glicerol-Carbohidratos, 4CBH) Botella #4 sustrato Carbohidratos, 6CBH) Botella #6 sustrato Carbohidratos, INC) Inóculo.

	14VIN	13VIN	15VIN	12GLI	10GLI	11GLI	5CBH	7GC	8GC
<i>Clostridium</i>	21.50 %	47.66 %	50.67 %	17.90 %	27.67 %	24.80 %	50 %	45.46 %	41.35 %
<i>Prevotella</i>	9.54 %	8.33 %	2.70 %	41.76 %	39.84 %	39.50 %	28.76 %	28.53 %	25.26 %
<i>Acidipropionibacterium</i>	0.70 %	0.10 %	0.14 %	32 %	19.53 %	17.70 %	6.46 %	9.67 %	19.11 %
<i>Lactobacillus</i>	58.14 %	41.62 %	44.56 %	0.46 %	1.2%	1.51 %	3 %	1.26 %	0.33 %
<i>Megasphaera</i>	2.X10 ⁻² %	4.9X10 ⁻⁵ %	6.8X10 ⁻⁵ %	3.40 %	4 %	4 %	3.3 %	4.40 %	5.50 %
<i>Sporolactobacillus</i>	4.X10 ⁻² %	7.3X10 ⁻² %	6.8X10 ⁻⁵ %	0.37 %	0.95 %	1.10 %	2.40 %	4.30 %	3 %
No identificado	0.37 %	0.37 %	0.3 %	1.91 %	3.22 %	6 %	1.80 %	1.90 %	2.16 %
<i>Acetobacter</i>	0.27 %	0.32 %	8.2X10 ⁻² %	0.34 %	0.64 %	0.76 %	1.41 %	0.80 %	0.31 %
Otros (<1%)	9.41 %	1.47 %	1.52 %	1.76 %	2.56 %	4.50 %	3.40 %	3.70 %	3 %



	9GC	4CBH	6CBH	1AL	INC	2AL	3AL
	34.35 %	26.31 %	30 %	51.55 %	32.10 %	57.46 %	50.81 %
	34.42 %	30 %	34 %	28.30 %	40 %	21 %	25 %
	22.60 %	30 %	21.23 %	6.44 %	0.42 %	5.80 %	4.53 %
	0.30 %	0.87 %	0.40 %	1.30 %	1.70 %	6.84 %	4.74 %
	2.86 %	6.28 %	7.65 %	0.10 %	1.50 %	0.64 %	1.44 %
	2.62 %	1.57 %	0.56 %	1.21 %	9.50 %	2.50 %	2.70 %
	1 %	3.28 %	2 %	0.30 %	2.17 %	0.55 %	0.53 %
	0.30 %	0.53 %	0.80 %	10.11 %	3 %	1.63 %	2.90 %
	1.45 %	2.18 %	4.74 %	0.67 %	9.77 %	3.60 %	7.32 %

Tabla (14). Porcentajes de abundancia relativa de cada género presente en la comunidad microbiana perteneciente a cada botella y sustrato.

El género *Clostridium* fue identificado en todos los sustratos evaluados y al realizar un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, de la abundancia relativa de este género en los diferentes sustratos evaluados, se comprobó que hay una diferencia significativa entre ellos (ANOVA, valor de $P= 0.03010856$, valor de $\alpha= 0.05$). Siendo el sustrato Aceto/Láctico el que en promedio tuvo una mayor abundancia relativa de este género, siendo del 53.27 %, mientras que el sustrato Vinazas y el sustrato Glicerol/Carbohidratos ocupan el segundo lugar con una abundancia relativa promedio del 40 %. Estos sustratos fueron los que mayor producción de H_2 tuvieron; 210.4 mL, 236.56 mL y 216.63 mL, respectivamente. También en los sustratos Aceto/Láctico, Glicerol/Carbohidratos y Vinazas, fue en donde se registraron las mayores concentraciones finales de ácido butírico; 5.24 g DQOe/L, 2.12 g DQOe/L



y 5.51 g DQOe/L respectivamente, por lo cual se puede apreciar la relación entre producción de biohidrógeno, la producción de ácido butírico (La ruta de producción de este ácido orgánico es productora de H₂) y la abundancia relativa del género *Clostridium*. En el sustrato Glicerol, aunque el promedio de la abundancia relativa del género *Clostridium* fue 23.45 %, el principal ácido orgánico producido fue el Butírico, además como se explicó en la sección 8.2 el importante aporte del componente glicerol en la producción de H₂ al emplear vinazas vitivinícolas, se debe a su alta concentración inicial de 11.2 g/L, aportando 61.8 % de la producción. El género *Clostridium* ha sido identificado como el grupo dominante de bacterias productoras de hidrógeno en procesos de fermentación oscura cuando se emplea un cultivo mixto mesofílico (Ghimire *et al.*, 2015). Dentro de este género, las especies *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum* han sido ampliamente estudiadas y son responsables de la producción de ácido butírico, siendo este el mayor ácido orgánico producido en la fermentación oscura, junto con el ácido acético, durante la producción de biohidrógeno (Toledo-Alarcón *et al.*, 2018). En el sustrato Vinazas vitivinícolas, el género *Clostridium* representó en promedio el 40 % de la comunidad, mientras que el género *Lactobacillus* representó en promedio el 48.11 % de la comunidad. Se ha demostrado que los géneros de *Clostridium* tienen una relación simbiótica con bacterias ácido lácticas, debido al fenómeno de la alimentación cruzada de lactato, que implica la estimulación de géneros productores de H₂ y butirato por bacterias ácido lácticas, para llevar a cabo la conversión de lactato a butirato (Sikora *et al.*, 2013; Blanco *et al.*, 2019). Se ha comprobado que el género *Lactobacillus* es un grupo importante de la comunidad microbiana presente en el vino, de donde se han aislado diversas especies de este género como; *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus fructivorans* y *Lactobacillus fermentum* (Dicks & Endo, 2009), esto podría explicar la alta presencia relativa del género *Lactobacillus* en el sustrato de vinazas vitivinícolas con respecto a los sustratos sintéticos. Por lo cual se infiere que el sustrato tiene un papel importante en la composición de la comunidad microbiana durante el proceso de fermentación oscura, ya que el inóculo solo contenía una abundancia relativa del género



Lactobacillus del 1.70 %, mientras que en los sustratos sintéticos este género no tuvo una abundancia relativa importante, siendo 4% el máximo valor en el sustrato Aceto-Láctico, el promedio de la abundancia relativa de este género en los demás sustratos sintéticos fue muy similar al porcentaje presente en el inóculo; sustrato Glicerol 1%, sustrato Carbohidratos 1.43 % y sustrato Glicerol/Carbohidratos 0.63 %. En el sustrato Vinazas, durante las primeras 24 horas hubo un aumento del 58.2% en la concentración de ácido láctico con respecto a la carga inicial, lo cual podría ser atribuible al metabolismo llevado a cabo por los microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus*, de acuerdo con el estudio de García-Depraect y León Becerril (2018) en donde emplearon vinazas tequileras como sustrato, las bacterias ácido lácticas proveen ácido láctico al género *Clostridium*, contribuyendo en la formación de H₂, además en sus resultados reportaron que dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas los principales géneros detectados fueron *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Un estudio realizado por Pasteris y Strasser De Saad (2009), mostró que al emplear a *Lactobacillus hilgardii* en la fermentación de glicerol y carbohidratos, se produce lactato y acetato. De acuerdo con Blanco y colaboradores (2019), las bacterias ácido lácticas forman parte de la comunidad microbiana durante el proceso de fermentación en el biorreactor y se ha demostrado que su presencia puede predominar sobre las bacterias productoras de H₂, incluso durante periodos de alta producción de este biocombustible. De acuerdo con el estudio de Dauptain y colaboradores en el año 2020, al producir H₂ mediante fermentación oscura empleando ensilaje de maíz como sustrato y su comunidad microbiana endógena como inóculo, reportaron que el 26% de la abundancia relativa de los microorganismos pertenecía al género *Clostridium*, mientras que el 35% pertenecía al género *Lactobacillus*.

Por otro lado, se ha demostrado que algunas especies del género *Lactobacillus* como; *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus diolivorans* pueden llevar a cabo la producción de ácido propiónico además de ácido acético y ácido láctico (Zhang *et al.*, 2010). De igual manera se ha demostrado que ejemplares del género *Clostridium* pueden llevar a cabo la síntesis de ácido propiónico a partir de lactato, tal es el caso de la especie *Clostridium propionicum* (Johns, 1952). Es probable que



en la comunidad microbiana del sustrato vinazas, en donde existe una alta presencia relativa de los géneros *Clostridium* y *Lactobacillus*, haya microorganismos ejemplares de estos géneros que lleven a cabo la producción de ácido propiónico, lo cual explicaría la alta concentración final de este ácido (2.38 gDQO/L) en el sustrato. En el sustrato Aceto/Lac y en el sustrato de Vinazas, se registró producción de ácido acético, cuya ruta es productora de H₂, no hay motivo para suponer que la producción de este ácido se llevó a cabo mediante Homoacetogénesis (Ruta consumidora de H₂, realizada por algunas especies del género *Clostridium*), esto gracias a la trampa de CO₂ presente en el equipo AMPTS II, que al secuestrar este gas no permite que organismos homoacetogénicos empleen el biohidrógeno para reducir al CO₂ (Buitrón *et al.*, 2020).

En el dendrograma de la Figura (22), se puede apreciar que la comunidad microbiana del sustrato vinazas está contenida en un clúster diferente al clúster que contiene a las comunidades microbianas de los sustratos sintéticos y del inóculo, existiendo un valor de similitud de 0.1 entre ambos clústeres. Esto puede deberse a que el clúster de la comunidad microbiana del sustrato vinazas, tiene una carga microbiana endógena importante de las vinazas, un ejemplo de ello son los *Lactobacillus*, situación que no ocurre con los sustratos sintéticos, en contraste estos sustratos presentan mayor abundancia relativa de ciertos géneros bacterianos como; *Acidipropionibacterium*, *Megasphaera* y *Sporolactobacillus*, los cuales tienen una abundancia relativa menor al 1% en el sustrato vinazas. Los géneros *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Prevotella*, son los que presentaron mayor porcentaje de abundancia relativa en las vinazas vitivinícolas. Es importante recalcar que el inóculo utilizado en el presente proyecto de investigación fue tomado del Biorreactor tipo filtro percolador escala piloto, cuando este se encontraba operando con sustrato sintético que simulaba la composición de las vinazas vitivinícolas (Sección 8.1), esta es la razón de la similitud resultante entre las comunidades microbianas del inóculo y los sustratos sintéticos empleados en el presente proyecto de investigación. Aunque la biomasa original del biorreactor fue obtenida mediante fermentación natural del sustrato, es probable que su comunidad microbiana fuera modificada durante el periodo de operación con sustrato sintético; los componentes empleados



para la elaboración del sustrato sintético no fueron esterilizados, por lo tanto, también aportan una carga de microorganismos, además la composición resultante del sustrato sintético pudo seleccionar a los microorganismos que fueron detectados en el inóculo empleado.

El género *Prevotella*, el cual también tuvo una abundancia relativa en todos los sustratos evaluados, ha sido identificado en cultivos mixtos durante la producción de biohidrógeno mediante fermentación oscura, sin embargo, este género no es productor de H₂ (García-Depraect & León Becerril, 2019). Este género tiene una interacción sintrófica con los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, debido a que es formador de biopelículas (Pugazhendhi *et al.*, 2018). El género *Prevotella* tuvo una mayor presencia relativa en el sustrato Glicerol (40%). Se ha demostrado que algunos ejemplares del género *Prevotella*, como la especie *P. multisaccharivorax* pueden fermentar glicerol y carbohidratos como la sacarosa, además puede producir los siguientes ácidos orgánicos; ácido acético, ácido succínico y ácido isovalérico (Sakamoto *et al.*, 2005).

A continuación, se realiza la discusión sobre los demás géneros bacterianos identificados en el presente proyecto de investigación, aunque no presentan una abundancia relativa amplia como los géneros anteriormente mencionados, forman parte de la comunidad microbiana de los sustratos evaluados y debido a sus características pueden contribuir en el proceso de fermentación oscura.

Los ejemplares del género *Acidipropionibacterium*, como la especie *Acidipropionibacterium virtanenii*, producen como principal metabolito al ácido propiónico, este género tiene un desarrollo óptimo a temperaturas de 37 °C (Deptula *et al.*, 2018), condición en la cual se llevaron a cabo las fermentaciones de los sustratos evaluados en el presente proyecto de investigación. Es probable que la presencia relativa de este género en los sustratos sintéticos evaluados esté relacionada con la producción de ácido propiónico. También es interesante denotar que este género tuvo menor presencia relativa (0.31 %) en el sustrato de vinazas, mientras que en los sustratos sintéticos el promedio de la presencia relativa de este



género fue mayor; en el sustrato Glicerol 23%, en el sustrato Carbohidratos 19%, sustrato Glicerol/Carbohidratos 17%, sustrato Aceto/Láctico 5.60 %.

Otro género presente en los sustratos sintéticos fue *Megasphaera*, del cual se ha reportado que algunas de sus especies; *M. elsdenii* y *M. indica* producen ácido butírico, acético y valerico al fermentar glucosa, mientras que, al fermentar ácido láctico, además de producir los metabolitos antes mencionados, también pueden llevar a cabo la producción de ácido propiónico, su crecimiento óptimo puede llevarse a cabo a 37 °C (Ohnishi, 2015). Con lo cual se infiere que este género pudo influir en la producción de biohidrógeno en los sustratos sintéticos, ya que Ohnishi y colaboradores en el año 2010 observaron que la especie *M. elsdenii* fue la bacteria dominante productora de biohidrógeno mediante fermentación oscura, cuando el género *Clostridium* no estaba presente. La mayor presencia relativa de este género fue en el sustrato de carbohidratos (5%), mientras que en las vinazas vitivinícolas fue el sustrato donde menor presencia relativa tuvo (1×10^{-4} %).

El género *Acetobacter*, tuvo una abundancia relativa del 4% en el sustrato Aceto/Láctico, mientras que en el inóculo se encontraba a una abundancia relativa del 3%. Niño-Navarro y colaboradores en el año 2020, reportaron que, al emplear lactosa como sustrato en el proceso de fermentación oscura, obtuvieron una abundancia relativa importante (82 %) de la especie *Acetobacter lovaniensis*, explican que este microorganismo puede oxidar el ácido acético y el ácido láctico en CO₂.

El género *Sporolactobacillus*, está representado por bacterias ácido-lácticas como la especie *Sporolactobacillus vineae*, la cual puede producir ácido láctico a partir de fermentar los carbohidratos; glucosa, fructosa, manosa y sorbitol. La temperatura óptima de crecimiento de este género es 37°C (Chang *et al.*, 2008) y tuvo una mayor presencia relativa en el sustrato sintético Glicerol-Carbohidratos, 3%.

Como se puede apreciar en el dendrograma de la Figura (16), dentro del clúster de comunidades microbianas de los sustratos sintéticos, se forman dos conjuntos, los cuales tienen un valor de similitud de 0.3 entre sí. Un grupo está conformado por la comunidad microbiana del sustrato Aceto-láctico y la comunidad microbiana del



inóculo, mientras que el otro grupo está conformado por las comunidades microbianas de los otros sustratos sintéticos. La comunidad microbiana del sustrato Glicerol y las comunidades microbianas de los sustratos Glicerol-Carbohidratos tuvieron un valor de similitud cercano a 0.5, siendo las comunidades microbianas que tuvieron el valor de similitud más alto entre sí, lo cual concuerda con sus similitudes en la producción de H₂ y los resultados obtenidos en las cinéticas.

Algunos géneros bacterianos que fueron identificados en el presente proyecto de investigación, también fueron identificados en la comunidad microbiana de un estudio realizado por García-Depraect y colaboradores en el año 2019, en donde emplearon vinazas tequileras para la producción de H₂ mediante fermentación oscura, los géneros reportados por este estudio son; *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Acetobacter*, *Citrobacter*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Sporolactobacillus*.

En la Figura 21 y en la Tabla 14 se pueden observar las diferencias en la comunidad microbiana presente en los diferentes sustratos evaluados y la variación que tienen con respecto al inóculo. Esto también significa que hubo variaciones en la cantidad de células bacterianas generadas, y como fue explicado en el marco teórico, los sustratos también son empleados para el mantenimiento y reproducción celular reduciendo los rendimientos de la producción de Biohidrógeno (Ward, 1991; Ghaly *et al.*, 2005).

Es importante recalcar que en las comunidades microbianas estudiadas; no se detectó la presencia de microorganismos metanogénicos (Por ejemplo *Methanobacterium* y *Methanobrevibacter*, detectados en digestión anaerobia) ni homoacetogénicos (Por ejemplo *Acetobacterium* y *Butyribacterium*, detectados en fermentación oscura) (Castello *et al.*, 2020; Saady, 2013) , por lo cual se podría considerar que la fermentación oscura se realizó de manera adecuada, sin continuar con el proceso de digestión anaerobia. El tratamiento que fue empleado para la comunidad microbiana del biorreactor tipo filtro percolador escala piloto (Fermentación natural del sustrato), del cual se obtuvo el inóculo utilizado en el presente proyecto de investigación fue el adecuado, debido a que inhibió la



proliferación de microorganismos consumidores de H_2 y junto con los sustratos empleados, así como las condiciones de temperatura y nivel de pH, permitieron una abundancia relativa importante del principal género productor de biohidrógeno; *Clostridium*.

10. CONCLUSIONES

En el presente proyecto de investigación, se alcanzó un volumen de producción máximo de 237 mL de biohidrógeno, cuando el sustrato empleado fue vinazas vitivinícolas (Dilución 1:2 en agua), obteniendo un rendimiento experimental de producción de 1182 mL de biohidrógeno por L de vinazas. Los compuestos principales de las vinazas vitivinícolas; ácido acético, ácido láctico, carbohidratos y glicerol, tienen un aporte significativo en la producción de biohidrógeno, siendo el componente carbohidratos o sacarosa el que tiene mayor potencial de producción de hidrógeno, 132 mL de H_2 por gramo de DQO consumido. Sin embargo, debido a su baja concentración con respecto a otros componentes, no es el metabolito que mayor aporte tiene para la producción de biohidrógeno en las vinazas vitivinícolas. De acuerdo con las evaluaciones de rendimiento y la Ecuación (30) el componente Glicerol es el que tuvo un mayor aporte en la producción de H_2 , siendo del 61.7 %, explicado por su mayor concentración en las vinazas vitivinícolas, a pesar de tener el rendimiento más bajo de producción de hidrógeno, 25.5 mL de H_2 por gramo de DQO consumido. Los componentes que tienen el segundo mayor aporte en la producción de hidrógeno a partir de vinazas son los ácidos acético-láctico. El ácido butírico fue el principal ácido orgánico producido al emplear los diferentes sustratos en el proceso de fermentación oscura, obteniendo una concentración final de 5.51 g DQOe/L en el sustrato Vinazas. Se logró una remoción de la carga inicial de DQO del 47.77 %, en el sustrato Vinazas. El género *Clostridium* fue identificado en todos los sustratos evaluados, se infiere que este género es el principal responsable de la producción de biohidrógeno y ácido butírico (Cuya ruta es productora de H_2). Se infiere que el sustrato tiene un papel importante en la composición de la comunidad microbiana durante el proceso de fermentación oscura, un ejemplo de ello es la alta carga endógena de *Lactobacillus* en el sustrato vinazas, es probable que este género tuviera una relación simbiótica con el género *Clostridium* debido al fenómeno



de alimentación cruzada de lactato, estos géneros junto con *Prevotella* fueron los que mayor abundancia relativa tuvieron en el sustrato Vinazas. Cada sustrato propició una composición microbiana y abundancias relativas diferentes, en los sustratos sintéticos, los géneros con mayor abundancia relativa fueron *Clostridium* y *Prevotella*. También se detectó la presencia de otros géneros bacterianos, aunque no tuvieron una abundancia relativa amplia, forman parte de la comunidad microbiana y debido a sus características descritas pueden aportar en el proceso de fermentación oscura. No se detectó la presencia de microorganismos metanogénicos y homoacetogénicos, sin embargo, en las cinéticas de consumo de sustratos, sí hubo producción de los siguientes ácidos orgánicos y solventes; ácido propiónico (Concentración final en Vinazas de 2.38 g DQOe/L), ácido succínico, ácido valérico y butanol, cuyas rutas de producción son consumidoras de H_2 .



11. BIBLIOGRAFÍA

Abe, J. O., Popoola, A. P. I., Ajenifuja, E., & Popoola, O. M. (2019). Hydrogen energy, economy and storage: Review and recommendation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(29), 15072–15086. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.068>.

Afzal, A., Ali, S., Engineering, G., Tabassum, R., & Engineering, G. (2017). A review on biohydrogen as a prospective renewable energy. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 11(1), 130. <https://doi.org/10.12692/ijb/11.1.106-130>.

Akutsu, Y., Lee, D.-Y., Li, Y.-Y., & Noike, T. (2009). Hydrogen production potentials and fermentative characteristics of various substrates with different heat-pretreated natural microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(13), 5365–5372. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.04.052>.

Albarrán-Contreras, B. A. (2017). Efecto de la velocidad superficial del gas sobre la producción de hidrógeno con vinazas vitivinícolas [Universidad Nacional Autónoma de México]. (Tesis de Maestría) Instituto de Ingeniería. <http://132.248.9.195/ptd2017/octubre/0766386/0766386.pdf>.

Albini, E., Pecorini, I., & Ferrara, G. (2019). Improvement of Digestate Stability Using Dark Fermentation and Anaerobic Digestion Processes. *Energies*, 12(3552), 1–15. <https://doi.org/10.3390/en12183552>.

Alonso, A. A., & Zamora, D. T. (2019). Biocombustibles : ¿Puede México aprovechar estos energéticos? In G. C. González & L. G. T. Bustillos (Eds.), *Biorrefinerías y Economía Circular* (Primera Ed, pp. 169–184). Universidad Autónoma Metropolitana. <http://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/index.php/libroelectronico%0APrimera>.

Amin, M. M., Bina, B., Taheri, E., Fatehizadeh, A., & Ghasemian, M. (2016). Stoichiometry evaluation of biohydrogen production from various carbohydrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(20), 20915–20921. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7244-6>.

Antonopoulou, G., Ntaikou, I., Stamatelatou, K., & Lyberatos, G. (2011). Biological and fermentative production of hydrogen. In R. Luque, J. Campelo, & J. Clark (Eds.), *Handbook of biofuels production* (1st ed., pp. 305–346). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857090492.2.305>.

Arantes, M. K., Sequinel, R., Alves, H. J., Machado, B., Fiorini, A., & da Silva, E. A. (2020). Improvement of biohydrogen production from brewery wastewater: Evaluation of inocula, support and reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(8), 5216–5226. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.208>.

Arcila, J. S., & Buitrón, G. (2016). Microalgae–bacteria aggregates: effect of the hydraulic retention time on the municipal wastewater treatment, biomass settleability



and methane potential. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(11), 2862–2870. <https://doi.org/10.1002/jctb.4901>.

Asociación de Vitivinicultores de Querétaro, 2017. AVQ [WWW Document]. URL <http://www.avq.com.mx/>.

Aurand, J.-M. (2017). Panorama Mundial del Vino y Oportunidades para México L ' OIV. *Consejo Mexicano Vitivinícola*. https://uvayvino.org.mx/index.php/inicio/datos_industria.

Bagi, Z., Maroti, J., Maroti, G., & Kovacs, K. L. (2014). Enzymes and Microorganisms for Biohydrogen Production. *Current Biochemical Engineering*, 1(2), 106–116. <https://doi.org/10.2174/2212711901999140618110310>.

Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>.

Balachandar, G., Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen Production from Organic Wastes by Dark Fermentation. In A. Pandey, J.-S. Chang, P. C. Hallenbecka, & C. Larroche (Eds.), *Biohydrogen* (1st ed., pp. 103–144). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00006-4>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.006>.

Barragán-Trinidad, M., Carrillo-Reyes, J., & Buitrón, G. (2017). Hydrolysis of microalgal biomass using ruminal microorganisms as a pretreatment to increase methane recovery. *Bioresource Technology*, 244(July), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.117>.

Bastidas-Oyanedel, J. R., Bonk, F., Thomsen, M. H., & Schmidt, J. E. (2015). Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(3), 473–498. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9369-3>.

Becerra, M. G. (2008). Efecto de la disminución de compuestos fenólicos de vinazas tequileras sobre la producción de hidrógeno. Tesis de Maestría [Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco A.C]. <https://doi.org/http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/597>.

Bedoya, A., & Ramirez-morales, J. E. (2008). Biological production of hydrogen : A literature survey. *Dyna*, 75(154), 137–157. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532008000100014&lng=en&tlng=es.



Bélafi-Bakó, K., Búcsú, D., Pientka, Z., Bálint, B., Herbel, Z., Kovács, K. L., & Wessling, M. (2006). Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), 1490–1495. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.022>.

Benemann, J. (1996). Hydrogen Biotechnology: Progress and prospect. *Nature Biotechnology*, 14(September), 1101–1103. <https://doi.org/10.1038/nbt0996-1101>.

Bernal, J. L., Nozal, M. J. Del, Toribio, L., & Alamo, M. Del. (1996). HPLC Analysis of Carbohydrates in Wines and Instant Coffees Using Anion Exchange Chromatography Coupled to Pulsed Amperometric Detection HPLC Analysis of Carbohydrates in Wines and Instant Coffees Using Anion Exchange Chromatography Coupled to Pulsed Ampe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 507–511. <https://doi.org/10.1021/jf9406065>.

Bhatia, S., & Goli, D. (2018). History, scope and development of biotechnology. In *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 1* (1st ed., pp. 1–61). IOP Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1088/978-0-7503-1299-8ch1>.

Bilotta, G. S., & Brazier, R. E. (2008). Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research*, 42(12), 2849–2861. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.03.018>.

Blanco, S., & Rodríguez, T. (2012). Biohydrogen production from wastes via dark fermentation: A critical review (1993-2011) | Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: Una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare*, 20(3), 398–411.

Blanco, V. M. C., Oliveira, G. H. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 139, 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>.

Blumberg, L. M. (2012). Theory of Gas Chromatography. In C. F. Poole (Ed.), *Gas Chromatography* (1st ed., pp. 19–78). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385540-4.00002-X>.

Bodek, D. F., & Castillo Blum, S. E. (2013). Ferredoxinas. *Educación Química* 24(4), 426–430. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)72497-2](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72497-2).

Bokulich, N. A., & Science, F. (2012). A Review of Molecular Methods.pdf. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 150–162.

Budiman, P. M., & Wu, T. Y. (2018). Role of chemicals addition in affecting biohydrogen production through photofermentation. *Energy Conversion and Management*, 165, 509–527. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.01.058>

Buitrón, G., Muñoz-Páez, K. M., Quijano, G., Carrillo-Reyes, J., & Albarrán-



Contreras, B. A. (2020). Biohydrogen production from winery effluents: control of the homoacetogenesis through the headspace gas recirculation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(3), 544–552. <https://doi.org/10.1002/jctb.6263>.

Buitrón, G., Prato-Garcia, D., & Zhang, A. (2014). Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor. *Water Science and Technology*, 70(12), 1919–1925. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.433>.

Bustamante, C. A. G., & Cerutti, O. M. (2016). Estado del Arte de la Bioenergía en México. In *Red Temática de Bioenergía del Conacyt*. CONACYT. http://rtbioenergia.org.mx/wp-content/uploads/2016/12/Divulgacion_Estado-del-arte-de-la-bioenergía-en-México.pdf.

Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J. P., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: Useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(2), 158–181. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw043>.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.

Cambier, N. (2017). Carbon dioxide capture using sodium hydroxide solution : comparison between an absorption column and a membrane contactor [Université catholique de Louvain]. https://dial.uclouvain.be/memoire/ucl/fr/object/thesis%3A12929/datastream/PDF_01/view.

Capunitan, D. (2018). Comparison of OTUs and ASVs in 73 Bird Species from Equatorial Guinea (*Tesis de Maestría*) [University of Connecticut]. https://opencommons.uconn.edu/gs_theses/1188.

Carrillo-Reyes, J., Albarrán-Contreras, B. A., & Buitrón, G. (2019). Influence of Added Nutrients and Substrate Concentration in Biohydrogen Production from Winery Wastewaters Coupled to Methane Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(1), 140–151. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2812-5>.

Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Tapia-Rodríguez, A. C., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Juárez, O. A., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., Braga, A. F. M., Braga, L., Castelló, E., Chatellard, L., Etchebehere, C., Fuentes, L., León-Becerril, E., Méndez-Acosta, H. O., Ruiz-Filippi, G., Venegas, E. T., ... Zaiat, M. (2019). Standardized protocol for determination of biohydrogen potential. *MethodsX*, December, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.027>.



Carrillo-Reyes, J., Celis-García, B., & Razo-Flores, E. (2014). Biocombustibles. In I. Marín, J. Sanz, & R. Amils (Eds.), *Biotecnología y Medioambiente* (2º, pp. 215–231). Ephemera. <http://editorial-ephemera.com/biotecnologiaymedioambiente/>.

Castelló, E., Nunes Ferraz-Junior, A. D., Andreani, C., Anzola-Rojas, M. del P., Borzacconi, L., Buitrón, G., Carrillo-Reyes, J., Gomes, S. D., Maintinguer, S. I., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Schiappacasse-Dasati, M., Tapia-Venegas, E., Valdez-Vázquez, I., Vesga-Baron, A., Zaiat, M., & Etchebehere, C. (2020). Stability problems in the hydrogen production by dark fermentation: Possible causes and solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119(November 2019), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109602>.

Chandrasekhar, K., Lee, Y. J., & Lee, D. W. (2015). Biohydrogen production: Strategies to improve process efficiency through microbial routes. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 8266–8293. <https://doi.org/10.3390/ijms16048266>.

Chang, Y., Jung, M. Y., Park, I., & Oh, H. (2008). *Sporolactobacillus vineae* sp. nov., a spore-forming lactic acid bacterium isolated from vineyard soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2316–2320. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65608-0>.

Chatellard, L., Marone, A., & Trably, E. (2017). Trends and Challenges in Biohydrogen Production from Agricultural Waste. In A. Singh & D. Rathore (Eds.), *Biohydrogen Production: Sustainability of Current Technology and Future Perspective* (1st ed., Issue January, pp. 69–95). Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3577-4>.

Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z., Li, X., & Zhang, D. (2006). Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.03.013>.

Cheteni, P. (2017). Sustainable development: biofuels in agriculture. *Environmental Economics*, 8(2), 83–91. [https://doi.org/10.21511/ee.08\(2\).2017.09](https://doi.org/10.21511/ee.08(2).2017.09).

Cieciura-Włoch, W., Borowski, S., & Domański, J. (2020). Dark fermentative hydrogen production from hydrolyzed sugar beet pulp improved by iron addition. *Bioresource Technology*, 314, 123713. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123713>.

Cisneros-Pérez, C., Etchebehere, C., Celis, L. B., Carrillo-Reyes, J., Alatrismondrag, F., & Razo-Flores, E. (2017). Direct Effect of inoculum pretreatment on the microbial community structure and its performance during dark fermentation using anaerobic fluidized-bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(15), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.03.157>.

Conde-Bueno, P., Martín-Rubí, J. A., García-Giménez, R., & Jinénez-Ballesta, R. (2009). Impacts caused by the addition of wine vinasse on some chemical and



mineralogical properties of a Luvisol and a Vertisol in La Mancha (Central Spain). *Soils Sediments* (2009), 9, 121–128. <https://doi.org/10.1007/s11368-009-0074-0>.

Cortez Cervantes, J. F. (2019). Producción de Biohidrógeno a altas cargas orgánicas a partir de efluentes vitivinícolas en sistemas de biomasa fija. In (*Tesis de Maestría*) *Instituto de Ingeniería*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Das, D., & Veziroglu, T. N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046–6057. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>.

Datta, A., Hossain, A., & Roy, S. (2019). An Overview on Biofuels and Their Advantages and Disadvantages. *Asian Journal of Chemistry*, 31(May), 1851–1858. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.22098>.

Dauptain, K., Trably, E., Santa-Catalina, G., Bernet, N., & Carrere, H. (2020). Role of indigenous bacteria in dark fermentation of organic substrates. *Bioresource Technology*, 123665. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123665>.

Davila-Vazquez, G., Alatraste-Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4989–4997. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.065>.

Dawood, F., Anda, M., & Shafiullah, G. M. (2020). Hydrogen production for energy: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(7), 3847–3869. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.059>.

Deptula, P., Smolander, O., Laine, P., Roberts, R. J., Edelman, M., Peltola, P., Piironen, V., Paulin, L., Storga, E., Savijoki, K., Laitila, A., Auvinen, P., & Varmanen, P. (2018). *Acidipropionibacterium virtanenii* sp. nov., isolated from malted barley. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, 3175–3183. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002965>.

Diakonova, A. N., Khruschev, S. S., Kovalenko, I. B., Riznichenko, G. Y., & Rubin, A. B. (2016). The role of electrostatic interactions in the formation of ferredoxin–ferredoxin NADP+ reductase and ferredoxin–hydrogenase complexes. *Biophysics (Russian Federation)*, 61(4), 572–579. <https://doi.org/10.1134/S0006350916040060>.

Dicks, L. M. T., & Endo, A. (2009). Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 30(1), 72–90. <https://doi.org/10.21548/30-1-1427>.

Diekert, G., & Wohlfarth, G. (1994). Metabolism of homoacetogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1–3), 209–221. <https://doi.org/10.1007/BF00871640>.



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

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

Eaton, A., Association, A. P. H., Association, A. W. W., & Federation, W. E. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (21st ed.). APHA-AWWA-WEF.

El-Shafie, M. I., Kambara, S., & Hayakawa, Y. (2019). Hydrogen Production Technologies Overview. *Journal of Power and Energy Engineering*, 07(01), 107–154. <https://doi.org/10.4236/jpee.2019.71007>.

Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., & Lee, H. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(October 2015), 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>.

Erik, K., Knudsen, B., Lærke, H. N., Hedemann, M. S., Nielsen, T. S., Ingerslev, A. K., Søvsø, D., Nielsen, G., Theil, P. K., Purup, S., Hald, S., Schioldan, A. G., & Marco, M. L. (2018). Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients*, 10(1499), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu10101499>.

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

Fernández, A. P., & Venegas, J. A. V. (2017). Producción De Bioetanol En México: Implicaciones Socio-Económicas. *Revista Internacional Administracion & Finanzas*, 10(1), 13–24.

Ferreira, J. A., Agnihotri, S., & Taherzadeh, M. J. (2019). Waste Biorefinery. In M. J. Taherzadeh, K. Bolton, J. Wong, & A. Pandey (Eds.), *Sustainable Resource Recovery and Zero Waste Approaches* (1st ed., pp. 35–52). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64200-4.00003-7>.

Gao, Y., Skutsch, M., Masera, O., & Pacheco, P. (2011). A global analysis of deforestation due to biofuel development. *Center For International Forestry Research*, 68. http://www.cifor.org/publications/pdf_files/WPapers/WP68Pacheco.pdf.

García-Depraect, O., & León-Becerril, E. (2018). Fermentative biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway: Operational performance, kinetic analysis and microbial ecology. *Fuel*, 234(March), 151–160.



<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.06.126>.

García-Depraect, O., Valdez-Vázquez, I., Rene, E. R., Gómez-Romero, J., López-López, A., & León-Becerril, E. (2019). Lactate- and acetate-based biohydrogen production through dark co-fermentation of tequila vinasse and nixtamalization wastewater: Metabolic and microbial community dynamics. *Bioresource Technology*, 282(December 2018), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.100>.

Ghaly, A. E., Kamal, M., & Correia, L. R. (2005). Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production. *Bioresource Technology*, 96(10), 1143–1152. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.027>.

Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>.

González, A., & Castañeda, Y. (2008). Biocombustibles , Biotecnología y Alimentos Impactos sociales para México Arcelia González Merino. *Argumentos*, 21(57), 55–83. ISSN 0187-5795.

Güne, E., Hande Erguder, T., Eroğlu, İ., & Gündüz, U. (2017). Dark fermentative hydrogen production from sucrose and molasses. *International Journal of Energy Research*, 41(13), 1891–1902. <https://doi.org/10.1002/er.3751>.

Hach-Company. (2014). *Oxygen Demand, Chemical*. USEPA Reactor Digestion Method 8000. <https://doi.org/10.1002/9780470114735.hawley03365>.

Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669–685. <https://doi.org/10.1128/MBR.68.4.669-685.2004>.

Havlík, P., Schneider, U. A., Schmid, E., Böttcher, H., Fritz, S., Skalský, R., Aoki, K., Cara, S. De, Kindermann, G., Kraxner, F., Leduc, S., McCallum, I., Mosnier, A., Sauer, T., & Obersteiner, M. (2011). Global land-use implications of first and second generation biofuel targets. *Energy Policy*, 39(10), 5690–5702. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.03.030>.

Herbert, F., & Hong, L. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82, 87–93. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00110-9).

Hosseini, E., Grootaert, C., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2011). Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. *Nutrition Reviews*, 69(5), 245–258. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00388.x>.



Hosseini, S. E., Wahid, M. A., Jamil, M.-M., Azli, A.-A.-M., & Misbah, M.-F. (2015). A review on biomass-based hydrogen production for renewable energy supply. *International Journal of Energy Research*, 39, 1597–1615. <https://doi.org/10.1002/er.3381>.

Huesemann, M. H., & Hausmann, T. S. (2009). Hydrogen Generation Through Indirect Biophotolysis in Batch Cultures of the Nonheterocystous Nitrogen-Fixing Cyanobacterium *Plectonema boryanum* Hydrogen Generation Through Indirect Biophotolysis in Batch Cultures of the Nonheterocystous Nitrogen-Fixing Cy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(208–220). <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8741-6>.

Hugerth, L. W., & Andersson, A. F. (2017). Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: From sampling to hypothesis testing. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01561>.

Illumina. (2018). *MiSeq™ System. Specification Sheet*. http://res.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_hiseq_systems.pdf.

Johns, A. T. (1952). The mechanism of propionic acid formation by *Clostridium propionicum*. *Journal of General Microbiology*, 6(1–2), 123–127. <https://doi.org/10.1099/00221287-6-1-2-123>.

Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50(4), 484–524.

Júnior, A. D. N. F., Pages, C., Latrille, E., Bernet, N., Zaiat, M., & Trably, E. (2020). Biogas sequestration from the headspace of a fermentative system enhances hydrogen production rate and yield. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.02.064>.

Kadier, A., Simayi, Y., Abdeshahian, P., Farhana, N., Chandrasekhar, K., & Sahaid, M. (2016). A comprehensive review of microbial electrolysis cells (MEC) reactor designs and configurations for sustainable hydrogen gas production. *Alexandria Engineering Journal*, 55(1), 427–443. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2015.10.008>.

Kamaraj, M., Ramachandran, K. K., & Aravind, J. (2020). Biohydrogen production from waste materials: benefits and challenges. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(1), 559–576. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02577-z>.

Khanal, S. K., Chen, W., Li, L., & Sung, S. (2004). Biological hydrogen production : effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29, 1123–1131. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2003.11.002>.

Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen production by dark fermentation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Energy and Environment*, 2(4), 401–421.





<https://doi.org/10.1002/wene.15>.

Kiani, S., Minaei, S., & Ghasemi-Varnamkhasti, M. (2018). Instrumental approaches and innovative systems for saffron quality assessment. *Journal of Food Engineering*, 216, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.06.022>.

Kim, D.-H., & Kim, M.-S. (2011). Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology*, 102(18), 8423–8431. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.113>.

Krysteva, M., Lalov, I., & Beschkov, V. (2010). Acceleration and increase of hydrogen production by simultaneous fermentation of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides* on wine-vinasse substrate. *Bulgarian Chemical Communications*, 42(1), 46–50.

Kumar, G., Cho, S. K., Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Mahapatra, D. M., Park, J. H., & Pugazhendhi, A. (2018). Insights into evolutionary trends in molecular biology tools in microbial screening for biohydrogen production through dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(43), 19885–19901. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.09.040>.

Kumar, V., Gupta, D., & Kumar, N. (2015). Hydrogen Use in Internal Combustion Engine: a Review. *The International Journal of Advanced Culture Technology*, 3(2), 87–99. <https://doi.org/10.17703/ijact.2015.3.2.87>.

Kundu, A., Narayan, J., Redzwan, G., & Hashim, M. A. (2012). An overview of cathode material and catalysts suitable for generating hydrogen in microbial electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(4), 1745–1757. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.031>.

Latif, U., & Dickert, F. L. (2015). Chemical oxygen demand. In L. M. Moretto & K. Kalcher (Eds.), *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors* (pp. 719–728). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1301-5_1.

Lee, B. H. (2015). Fundamentals of Food Biotechnology. In L. JohnWiley & Sons (Ed.), *Fundamentals of Food Biotechnology: Second Edition* (2nd ed., Vol. 9781118384). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118384947>.

Lee, H. S., & Rittmann, B. E. (2009). Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3), 749–758. <https://doi.org/10.1002/bit.22107>.

Lee, H. S., Salerno, M. B., & Rittmann, B. E. (2008). Thermodynamic evaluation on H₂ production in glucose fermentation. *Environmental Science and Technology*, 42(7), 2401–2407. <https://doi.org/10.1021/es702610v>.

Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., Zhang, J., Buckel, W., & Thauer, R. K. (2008).



Coupled Ferredoxin and Crotonyl Coenzyme A (CoA) Reduction with NADH Catalyzed by the Butyryl-CoA Dehydrogenase / Etf Complex from *Clostridium kluveri* □ †. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 843–850. <https://doi.org/10.1128/JB.01417-07>.

Li, H., Wang, H., Li, H., Goodman, S., Lee, P. van der, Xu, Z., Fortunato, A., & Yang, P. (2018). The worlds of wine: Old, new and ancient. *Wine Economics and Policy*, 7(2), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2018.10.002>.

Liguori, R., Amore, A., & Faraco, V. (2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6129–6147. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5014-7>.

Lin, C. Y., Wu, S. Y., Lin, P. J., Chang, J. S., Hung, C. H., Lee, K. S., Lay, C. H., Chu, C. Y., Cheng, C. H., Chang, A. C., Wu, J. H., Chang, F. Y., Yang, L. H., Lee, C. W., & Lin, Y. C. (2011). A pilot-scale high-rate biohydrogen production system with mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14), 8758–8764. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.07.115>.

Lo, Y.-C., Chen, X.-J., Huang, C.-Y., Yuan, Y.-J., & Chang, J.-S. (2013). Dark fermentative hydrogen production with crude glycerol from biodiesel industry using indigenous hydrogen-producing bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(35), 15815–15822. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.05.083>.

López-legarda, X., Taramuel-gallardo, A., & Arboleda-, C. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 180–198.

López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., & Gallardo-Valdez, J. (2010). Tequila vinasses: Generation and full scale treatment processes. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 9(2), 109–116. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9204-9>.

Lu, C., Zhang, H., Zhang, Q., Chu, C. yeon, Tahir, N., Ge, X., Jing, Y., Hu, J., Li, Y., Zhang, Y., & Zhang, T. (2020). An automated control system for pilot-scale biohydrogen production: Design, operation and validation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(6), 3795–3806. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.288>.

Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91(April 2017), 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>.

Luo, J., Zhu, Y., Song, A., Wang, L., Shen, C., Gui, Z., Zhang, Q., & Cao, J. (2019). Efficient short-chain fatty acids recovery from anaerobic fermentation of wine vinasse and waste activated sludge and the underlying mechanisms. *Biochemical Engineering Journal*, 145(December 2018), 18–26.



<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.02.010>.

Madalena, B. D. S., Maria, N. D. P., & Paulo, S. (2014). The role of polysaccharides on the grape must ultrafiltration performance. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 29(1), 16–27. <https://doi.org/10.1051/ctv/20142901016>.

Martínez, V., & García, R. (2010). Fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico. *Dirección General de Investigación y Desarrollo Armada Argentina*, September, 7. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2415.9844>.

Matei, F. (2016). Technical guide for fruit wine and wine production. In M. R. Kosseva, J. . Joshi, & P. . Panesar (Eds.), *Science and Technology of Fruit Wine Production* (1st ed., pp. 663–705). Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/science-and-technology-of-fruit-wine-production/kosseva/978-0-12-800850-8>.

McNair, H. M., Miller, J. M., & Snow, N. H. (2019). *Basic Gas Chromatography* (I. John Wiley & sons (ed.); 3rd ed., Issue 1). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119450795>.

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

Meganathan, R., Ranganathan, Y., & Reddy, C. (2007). Carbohydrate Fermentations. In C. Reddy (Ed.), *Methods for general and molecular microbiology* (3rd ed., Issue January 2007, pp. 558–585). ASM Press.

Melamane, X. L., Strong, P. J., & Burgess, J. E. (2007). Treatment of wine distillery wastewater: A review with emphasis on anaerobic membrane reactors. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 25–36. <https://doi.org/10.21548/28-1-1456>.

Miranda-Castilleja, D. E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S. M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tápia, J. A., & Martínez-Peniche, R. A. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces spp.* nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49(7), 759–773.

Mishra, P., Krishnan, S., Rana, S., Singh, L., Sakinah, M., & Ab Wahid, Z. (2019). Outlook of fermentative hydrogen production techniques: An overview of dark, photo and integrated dark-photo fermentative approach to biomass. *Energy Strategy Reviews*, 24(January 2019), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.esr.2019.01.001>.

Møller, K. T., Jensen, T. R., Akiba, E., & Li, H. wen. (2017). Hydrogen - A sustainable energy carrier. *Progress in Natural Science: Materials International*, 27(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2016.12.014>.



Mona, S., Kumar, S. S., Kumar, V., Parveen, K., Saini, N., Deepak, B., & Pugazhendhi, A. (2020). Green technology for sustainable biohydrogen production (waste to energy): A review. *Science of the Total Environment*, 728, 138481. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138481>.

Montoya-Rosales, J. de 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(January), 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.072>.

Moreno-Andrade, I., Moreno, G., Kumar, G., & Buitrón, G. (2015). Biohydrogen production from industrial wastewaters. *Water Science and Technology*, 71(1), 105–110. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.471>.

Moreno-Perlin, T., & Carrillo-Reyes, J. (2020). Introducción y comandos del paquete DADA2. *Introducción y Comandos Del Paquete DADA2*, 18.

Moreno, M. (2011). *¿Qué sabemos de? El vino* (P. Tigeras, P. Paraja, C. Duarte, B. Hernández, Rafael Martínez, A. Navas, J. Prieto, M. Piug, & J. Senén (eds.); 1st ed.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas; Los libros de la Catarata.

Nelson, D., & Cox, M. (2005). Lehninger Principles of Biochemistry. In D. Nelson & M. Cox (Eds.), *Biological Membranes* (4th ed.). W.H. Freeman and Company. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010419>.

Nguyen, N. P., Warnow, T., Pop, M., & White, B. (2016). A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2, 1–8. <https://doi.org/doi:10.1038/npjbiofilms.2016>.

Nikolaidis, P., & Poullikkas, A. (2017). A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67(January), 597–611. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.044>.

Niño-Navarro, C., Chairez, I., Christen, P., Canul-Chan, M., & García-Peña, E. I. (2020). Enhanced hydrogen production by a sequential dark and photo fermentation process: Effects of initial feedstock composition, dilution and microbial population. *Renewable Energy*, 147, 924–936. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.09.024>.

Noblecourt, A., Christophe, G., Larroche, C., & Fontanille, P. (2018). Hydrogen production by dark fermentation from pre-fermented depackaging food wastes. *Bioresource Technology*, 247(July 2017), 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.199>.

Norma Mexicana NMX-AA-034-SCFI-2015 Analisis de Agua- Medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- Método de Prueba, 1 (2015). <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166146/nmx-aa-034-scfi-2015.pdf>.



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

Ohnishi, A. (2015). *Megasphaera* as Lactate-Utilizing Hydrogen-Producing Bacteria. In V. C. Kalia (Ed.), *Microbial Factories: Biofuels, Waste treatment: Volume 1* (pp. 1–353). Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2598-0>.

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

Okoro, B. U., & Nwaiwu, N. E. (2017). Optimisation of waste stabilisation pond performance for piggery waste treatment using response surface methodology. *Environmental Research, Engineering and Management*, 73(2), 52–61. <https://doi.org/10.5755/j01.erem.73.2.17696>.

Ongley, E. D. (2009). Water Quality of the Lower Mekong River. In James H. Thorp (Ed.), *The Mekong Biophysical Environment of an International River Basin A volume in Aquatic Ecology* (1ST ed., pp. 297–320). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374026-7.00012-7>.

Organización Internacional de la Viña y el Vino, O. (2017). *Estadísticas Producción Vino*. <http://www.oiv.int/es/statistiques/recherche>.

Organización Internacional de la Viña y el Vino, O. (2019). State of the Vitiviniculture World Market. In International Organisation of Vine and Wine. <http://www.oiv.int/public/medias/6679/en-oiv-state-of-the-vitiviniculture-world-market-2019.p>.

Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Bernet, N., & Trably, E. (2017). Dark-fermentative biohydrogen pathways and microbial networks in continuous stirred tank reactors: Novel insights on their control. *Applied Energy*, 198, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.04.051>.

Perera, F. P. (2017). Multiple Threats to Child Health from Fossil Fuel Combustion : Impacts of Air Pollution and Climate Change. *Environmental Health Perspectives*, 125(2), 141–148. <https://doi.org/10.1289/EHP299>.

Pasteris, S. E., & Strasser De Saad, A. M. (2009). Sugar-glycerol cofermentations by *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3853–3858. <https://doi.org/10.1021/jf803781k>.

Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Pérez-Rodríguez, N., Aguilar-Uscanda, M., & Domínguez, J. M. (2015). Evaluation of the liquid, solid and total fractions of beer, cider and wine lees as economic nutrient for xylitol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(6), 1027–1039.



<https://doi.org/10.1002/jctb.4405>.

Pugazhendhi, A., Kumar, G., & Sivagurunathan, P. (2018). Microbiome involved in anaerobic hydrogen producing granules: A mini review. *Biotechnology Reports*, 20, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00301>.

Quéméneur, M., Hamelin, J., Benomar, S., Guidici-Orticoni, M. T., Latrille, E., Steyer, J. P., & Trably, E. (2011). Changes in hydrogenase genetic diversity and proteomic patterns in mixed-culture dark fermentation of mono-, di- and tri-saccharides. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(18), 11654–11665. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.06.010>.

Rai, P. K., & Singh, S. P. (2016). Integrated dark- and photo-fermentation: Recent advances and provisions for improvement. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(44), 19957–19971. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.084>.

Rajagopal, V., Paramjit, S. M., Suresh, K. P., Yogeswar, S., Nageshwar, R. D. V. K., & Avinash, N. (2014). Significance of vinasses waste management in agriculture and environmental quality- Review. *African Journal of Agricultural Research*, 9(38), 2862–2873. <https://doi.org/10.5897/ajar2014.8819>.

Ravi, R. K., Walton, K., & Khosroheidari, M. (2018). Miseq: A next generation sequencing platform for genomic analysis. In D. J. (Ed.), *Disease Gene Identification Methods in Molecular Biology* (1st ed., Vol. 1706, pp. 223–232). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12.

Reungsang, A., Zhong, N., & Yang, Y. (2018). Hydrogen from Photo Fermentation. In Q. Liao, J. Chang, C. Herrmann, & A. Xia (Eds.), *Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion* (1st ed., pp. 221–317). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-7677-0>.

Ríos, I., Santos, J., & Gutiérrez, C. (2017). Biocombustibles sólidos : una solución al calentamiento global. *Revista Ciencia*, 68(4), i1–i7. <http://revistaciencia.amc.edu.mx/online/BiocombustiblesSolidos.pdf>.

Rittmann, S. K. M. R., Lee, H. S., Lim, J. K., Kim, T. W., Lee, J. H., & Kang, S. G. (2015). One-carbon substrate-based biohydrogen production: Microbes, mechanism, and productivity. *Biotechnology Advances*, 33(1), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.004>.

Rizal, W. A., Maryana, R., Prasetyo, D. J., Suwanto, A., & Wahono, S. K. (2020). Alkaline pretreatment of sugarcane bagasse on pilot scale reactor. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 462(1), 1–6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/462/1/012056>.

Robles-González, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., & Poggi-Valardo, H. M. (2012). Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of Biotechnology*, 157(4), 524–546. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.09.006>.



Rodicio, M. D. R., & Mendoza, M. D. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. <https://doi.org/10.1157/13059055>.

Rosa, P. R. F., & Silva, E. L. (2017). Review of Continuous Fermentative Hydrogen-Producing Bioreactors from Complex Wastewater. *Frontiers in Bioenergy and Biofuels*, January, 257–284. <https://doi.org/10.5772/65548>.

Rosen, M. A., & Koohi-Fayegh, S. (2016). The prospects for hydrogen as an energy carrier: an overview of hydrogen energy and hydrogen energy systems. *Energy, Ecology and Environment*, 1(1), 10–29. <https://doi.org/10.1007/s40974-016-0005-z>.

RStudioTeam. (2019). *RStudio: Integrated Development for R*. (1.2.5033). RStudio Inc., Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.

Rubia, M. A. De, Villamil, J. A., & Mohedano, A. F. (2019). Anaerobic digestion for methane and hydrogen production. In J. A. Olivares, D. Puyol, J. A. Melero, & J. Dufour (Eds.), *Wastewater Treatment Residues as Resources for Biorefinery Products and Energy* (1st ed., pp. 67–83). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816204-0.00004-7>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>.

Sadatshojaei, E., Wood, D., & Dariush Mowla. (2020). Third Generation of Biofuels Exploiting Microalgae. In Inamuddin & A. Asiri (Eds.), *Sustainable Green Chemical Processes and their Allied Applications* (1st ed., pp. 576–586). Springer Nature Switzerland AG. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-42284-4>.

Sakamoto, M., Umeda, M., Ishikawa, I., & Benno, Y. (2005). *Prevotella multisaccharivorax* sp. nov., isolated from human subgingival plaque. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1839–1843. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63739-0>.

Sampath, P., Brijesh, Reddy, K. R., Reddy, C. V., Shetti, N. P., Kulkarni, R. V., & Raghu, A. V. (2020). Biohydrogen Production from Organic Waste – A Review. *Chemical Engineering and Technology*, 43(7), 1240–1248. <https://doi.org/10.1002/ceat.201900400>.

Sarangi, P. K., & Nanda, S. (2020). Biohydrogen Production Through Dark Fermentation. *Chemical Engineering and Technology*, 43(00), 1–13. <https://doi.org/10.1002/ceat.201900452>.

Saratale, G. D., Saratale, R. G., Banu, J. R., & Chang, J.-S. (2019). Biohydrogen Production From Renewable Biomass Resources. In A. Pandey, S. Venkata Mohan, J.-S. Chang, P. C. Hallenbeck, & C. Larroche (Eds.), *Biohydrogen* (2nd ed., pp. 247–



277). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64203-5.00010-1>.

Sarma, S., Dubey, V. K., & Moholkar, V. S. (2016). Kinetic and thermodynamic analysis (with statistical optimization) of hydrogen production from crude glycerol using *Clostridium pasteurianum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(44), 19972–19989. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.204>.

Schmidt, T. S. B., Matias Rodrigues, J. F., & von Mering, C. (2014). Ecological Consistency of SSU rRNA-Based Operational Taxonomic Units at a Global Scale. *PLoS Computational Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003594>.

Schmitz, K. S. (2016). Gibbs Free Energy, Work, and Equilibrium. In J. Fedor & J. Cetel (Eds.), *Physical Chemistry* (1st ed., pp. 99–157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800514-9.00003-1>.

Seefeldt, L.-S., Peters, J.-W., Beratan, D.-N., Bothner, B., Minteer, S.-D., Raugei, S., & Hoffman, B.-M. (2018). Control of electron transfer in nitrogenase. *Current Opinion in Chemical Biology*, 47, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.08.011>.

Serna, F., Barrera, L., & Montiel, H. (2011). Impacto social y económico en el uso de biocombustibles. *Journal of Technology Management and Innovation*, 6(1), 100–114. <https://doi.org/10.4067/S0718-27242011000100009>.

Sikora, A., Blaszczyk, M., Jurkowski, M., & Zielenkiewicz, U. (2013). Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence? In M. Kongo (Ed.), *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. <https://doi.org/10.5772/50364>.

Singh, A., & Rathore, D. (2017). *Biohydrogen Production: Sustainability of Current Technology and Future Perspective* (A. Singh & D. Rathore (eds.); First Edit). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3577-4>.

Skaggs, R. L., Coleman, A. M., Seiple, T. E., & Milbrandt, A. R. (2018). Waste-to-Energy biofuel production potential for selected feedstocks in the conterminous United States. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82(September 2017), 2640–2651. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.107>.

Śłupek, E., Kucharska, K., & Gębicki, J. (2019). Alternative methods for dark fermentation course analysis. *SN Applied Sciences*, 1(5), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0488-2>.

Sołowski, G. (2018). Biohydrogen Production-Sources and Methods: A Review. *International Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 2018(01), 1–22. <https://doi.org/10.20911/IJBBT-101>.

Sołowski, G., Konkol, I., & Cenian, A. (2020). Methane and hydrogen production from cotton waste by dark fermentation under anaerobic and micro-aerobic conditions. *Biomass and Bioenergy*, 138.



<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105576>.

Srivastava, N., Kumar, R., & Mishra, P. (2016). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (N. Srivastava, M. Srivastava, P. Mishra, P. Ramteke, & R. Lakhani (eds.); 1st Edition). Elsevier. <https://www.elsevier.com/books/new-and-future-developments-in-microbial-biotechnology-and-bioengineering/gupta/978-0-444-63507-5>.

Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P. K., & Gupta, V. K. (2020). *Biofuel Production Technologies: Critical Analysis for Sustainability* (N. Srivastava, M. Srivastava, P. K. Mishra, & V. K. Gupta (eds.); 1st ed.). Springer Nature Singapore Pte Ltd. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8637-4>.

Staffell, I., Scamman, D., Velazquez Abad, A., Balcombe, P., Dodds, P. E., Ekins, P., Shah, N., & Ward, K. R. (2019). The role of hydrogen and fuel cells in the global energy system. *Energy and Environmental Science*, 12(2), 463–491. <https://doi.org/10.1039/c8ee01157e>.

Starr, C., Taggart, R., Evers, C., & Starr, L. (2009). ¿Cómo liberan las células la energía química? In C. Islas (Ed.), *Biología La unidad y la diversidad de la vida* (12a ed., p. 965). CENGAGE Learning. https://www.academia.edu/36129064/Biología_La_unidad_y_la_diversidad_de_la_vida.

Strazzera, G., Battista, F., Garcia, N. H., Frison, N., & Bolzonella, D. (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of Environmental Management*, 226(May), 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039>.

Sun, Y., He, J., Yang, G., Sun, G., & Sage, V. (2019). A review of the enhancement of bio-hydrogen generation by chemicals addition. *Catalysts*, 9(4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/catal9040353>.

Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33(9–12), 1130–1150. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>.

Syahirah, N., Aron, M., Shiong, K., Kit, K., & Chew, W. (2020). Sustainability of the four generations of biofuels – A review. *International Journal of Energy Research*, April, 1–17. <https://doi.org/10.1002/er.5557>.

Sydney, E. B. (2013). Valorization of vinasse as broth for biological hydrogen and volatile fatty acids production by means of anaerobic bacteria [Universite Blaise Pascal]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00914329>.

Taheri, E., Amin, M., Pourzamani, H., Fatehizadeh, A., Ghasemian, M., & Bina, B. (2018). Comparison of acetate-butyrate and acetate-ethanol metabolic pathway in biohydrogen production. *Journal of Medical Signals & Sensors*, 8(2), 101.



https://doi.org/10.4103/jmss.jmss_6_18.

Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J. E., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., Lay, C. H., Chu, C. Y., Leu, H. J., Marone, A., Lin, C. Y., Kim, D. H., Trably, E., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), 761–785. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9383-5>.

Tian, H., Li, J., Yan, M., Tong, Y. W., Wang, C. H., & Wang, X. (2019). Organic waste to biohydrogen: A critical review from technological development and environmental impact analysis perspective. *Applied Energy*, 256(August), 113961. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.113961>.

Toledo-Alarcón, J., Cabrol, L., Jeison, D., Trably, E., Steyer, J. P., & Tapia-Venegas, E. (2020). Impact of the microbial inoculum source on pre-treatment efficiency for fermentative H₂ production from glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(3), 1597–1607. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.113>

Toledo-Alarcón, J., Capson-Tojo, G., Marone, A., Paillet, F., Ferraz Júnior, A. D. N., Chatellard, L., Bernet, N., & Trably, E. (2018). Basics of bio-hydrogen production by dark fermentation. In Q. Liao, J. Chang, C. Herrmann, & A. Xia (Eds.), *Bioreactors for Microbial Biomass and Energy Conversion, Green Energy and Technology* (Issue 9789811076763, pp. 199–220). https://doi.org/10.1007/978-981-10-7677-0_6.

Trchounian, K., Sawers, R. G., & Trchounian, A. (2017). Improving biohydrogen productivity by microbial dark- and photo-fermentations: Novel data and future approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80(March 2017), 1201–1216. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.149>.

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). El Gen *rRNA* 16s en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>.

Vargas Arce, B. A., Álvarez Aliaga, M. T., Ghezzi, F., & Ticona-Bustillos, A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* como biocatalizador en celdas de combustible microbianas con ferricianuro de potasio. *Revista Boliviana de Física*, 33(33), 21–26.

Vasconcelos de Sá, L. R., Leal de Oliveira, M. A., Cammarota, M. C., Matos, A., & Ferreira-Leitao. (2011). Simultaneous analysis of carbohydrates and volatile fatty acids by HPLC for monitoring fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(23), 15177–15186. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.08.056>.

Veeravalli, S.-S., Shanmugam, S.-R., Ray, S., Lalman, J. A., & Biswas, N. (2019). Biohydrogen production from renewable resources. In Majid Hosseini (Ed.), *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts: Technologies and Approaches for Scale-Up and Commercialization*



(1st ed., pp. 289–312). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817941-3.00015-2>.

Vlyssides, A., Barampouti, E. M., & Mai, S. (2010). Alternative biological systems for the treatment of vinasse from wine. *Water Science and Technology*, 51(1), 53–60. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.647>.

Wainaina, S., Lukitawesa, Awasthi, M. K., & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids , hydrogen or methane production : A critical review Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids , hydrogen or methane production : A critical review. *Bioengineered*, 10(1), 437–458. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>.

Wang, J., & Yin, Y. (2019). Progress in microbiology for fermentative hydrogen production from organic wastes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(10), 825–865. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1487226>.

Wang, S., Zhang, T., Bao, M., Su, H., & Xu, P. (2020). Microbial Production of Hydrogen by Mixed Culture Technologies: A Review. *Biotechnology Journal*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/biot.201900297>.

Ward, O. P. (1991). Fermentation and Cell. In Springer (Ed.), *Bioprocessing* (1st ed., pp. 121–136). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3914-8_8.

Weber, A. Z., & Lipman, T. E. (2019). Fuel Cells and Hydrogen Production: Introduction. In R. A. Meyers (Ed.), *Fuel Cells and Hydrogen Production: Vol. i* (Second Edi). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7789-5_1051.

Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms (archaeobacteria/eubacteria/urkaryote/16S ribosomal RNA/molecular phylogeny). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088–5090.

Xia, A., Zhu, X., & Liao, Q. (2019). Fuel Cells and Hydrogen Production. In T. E. Lipman & A. Weber (Eds.), *Springer Science+Business Media* (First Edit, pp. 833–863). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7789-55>.

Yang, G., & Wang, J. (2019). Changes in microbial community structure during dark fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(47), 25542–25550. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.08.039>.

Yilmazer, Z., Zampol, C., Hallenbeck, P. C., & Succursale, C. P. (2017). Increased hydrogen yield and COD removal from starch / glucose based medium by sequential dark and photo-fermentation using *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.05.161>.



Yu, J. (2007). Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae. In A. Mendez-Vilas (Ed.), *Analyzing microbial consortia for biotechnological processes design. Book "Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology"* (1st ed., pp. 437–449). Editorial FORMATEX.
https://www.researchgate.net/profile/Jian_Yu21/publication/242768941_Biophotolysis-based_Hydrogen_Production_by_Cyanobacteria_and_Green_Microalgae/links/55709ea108ae2f213c215711.pdf.

Zacharof, M. (2016). Grape Winery Waste as Feedstock for Bioconversions: Applying the Biorefinery Concept. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9674-2>.

Zavala Méndez, M. del C. (2020). Implementación de una estrategia de control automático para la producción de biohidrógeno a partir de efluentes vitivinícolas. In (*Tesis de Maestría*) Instituto de Ingeniería (Aún por publicar). Universidad Nacional Autónoma de México.

Zhang, C., Brandt, M. J., Schwab, C., & Gänzle, M. G. (2010). Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. *Food Microbiology*, 27(3), 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.019>.

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

Zhang, F., Zhang, Y., Chen, M., Van Loosdrecht, M. C. M., & Zeng, R. J. (2013). A modified metabolic model for mixed culture fermentation with energy conserving electron bifurcation reaction and metabolite transport energy. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(7), 1884–1894. <https://doi.org/10.1002/bit.24855>.

Zhang, Q., & Zhang, Z. (2018). Biological Hydrogen Production From Renewable Resources by Photofermentation. In Y. Li & X. Ge (Eds.), *Advances in Bioenergy* (1st ed., Vol. 3, pp. 137–160). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2018.03.001>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.01.019>.

Ziara, R. M. M., Miller, D. N., Subbiah, J., & Dvorak, B. I. (2019). Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperature and initial pH on biohydrogen production and microbial community. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(2), 661–673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.045>.

