

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TÍTULO DEL TRABAJO:
**CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA DE UN
SISTEMA ACOPLADO DE FERMENTACIÓN OSCURA CON
FOTOFERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOH₂.**

TRABAJO ESCRITO CORRESPONDIENTE A LA OPCIÓN DE TITULACIÓN:
CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA:

WENDY ARACELI PÉREZ MORA

DIRIGIDA POR :

Dra. Elvía Inés García Peña

Ciudad de México, Diciembre de 2016.

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional
Presente

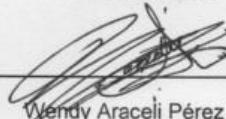
Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Wendy Araceli Pérez Mora, manifiesto ser autor (a) y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada Caracterización de la Población Microbiana de un Sistema Acoplado de Fermentación Oscura con Fotofermentación para la Producción de BioH₂, en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales (Publicación en disco en el repositorio Institucional) "La Tesis" por un período de 1 año contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., 14 de Diciembre de 2016.

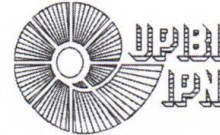
Atentamente



Wendy Araceli Pérez Mora



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

ACTA DE TRABAJO ESCRITO

En la Ciudad de México el día 12 de Diciembre del 2016, siendo las 12:07 se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: Caracterización de la Población Microbiana de un Sistema Acoplado de Fermentación Oscura con ^{Fermentación para la producción de Biotín} que presenta el alumno Wendley Araceli Pérez Mora con número de boleta 2012430966, aspirante a (Programa Académico).

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

COMISIÓN REVISORA.

Nombre y firma Director Externo

Cristina Niño Navarro
Cristina Niño Navarro

Nombre y firma Evaluador 1

Nombre y firma Director Interno
ELVA INES GARCIA PEÑA

ROSA A. JIMÉNEZ SIERRA

Nombre y firma Evaluador 2

Jones Martínez Limón

Nombre y firma
Director de Programa Académico

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente por el apoyo brindado a la Directora del proyecto:

Dra. Elvia Inés García Peña.

Mis asesores por los consejos y apoyo brindado:

M. en C. Cristina Niño Navarro

M. en C. César Agustín Jiménez Sierra.

A mis padres, mi hermano y mis abuelitos maternos.

GRACIAS

Contenido

1	CAPITULO I.....	1-1
1.1	INTRODUCCIÓN.....	1-1
1.1.1	Bioprocesos relacionados a la producción de BioH ₂	1-1
1.1.2	Fermentación oscura.....	1-2
1.2	JUSTIFICACIÓN.....	1-2
1.3	OBJETIVOS.....	1-3
1.3.1	Objetivo general.....	1-3
1.3.2	Objetivos específicos.....	1-3
2	CAPITULO II.....	2-4
2.1	MARCO TEÓRICO.....	2-4
2.1.1	Biohidrógeno.....	2-4
2.1.2	Procesos dependientes de luz.....	2-5
3	CAPITULO III.....	3-14
3.1	METODOLOGÍA.....	3-14
3.1.1	Fermentación Oscura.....	3-14
3.1.2	Fotofermentación.....	3-16
4	CAPÍTULO III.....	4-20
4.1	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	4-20
4.1.1	Fermentación oscura.....	4-20
4.1.2	Fotofermentación.....	4-25
4.2	CONCLUSIONES.....	4-28
4.3	ANEXOS.....	4-28
4.3.1	Anexo I. Determinación de azúcares reductores mediante el método “Ácido Dinitrisalicílico DNS”.....	4-28
4.3.2	Anexo II. Determinación de biomasa mediante el método de Bradford.....	4-30
4.3.3	Anexo V. Protocolo de extracción de ADN.....	4-32
4.3.4	Anexo VI. Determinación de concentración y pureza del ADN en el Nanodrop 2200.4-33	
4.4	REFERENCIAS.....	4-34

Índice de tablas

Tabla_ 1. Tabla de frutas y verduras que constituyen el medio de RSO para la fermentación oscura.	3-15
Tabla_ 2. Composición del medio de lactosa para la fermentación oscura.	3-15
Tabla_ 3. Características químicas del lactosuero.	3-15
Tabla_ 4. Composición del medio de cultivo de crecimiento para las fotobacterias.	3-17
Tabla_ 5. Composición del medio de cultivo de producción para las fotobacterias.	3-18
Tabla_ 6. Comparación de poblaciones productoras y volumen de BioH ₂ acumulado.	4-25
Tabla_ 7. Comparación de poblaciones productoras y volumen de BioH ₂ acumulado.	4-28
Tabla_ 8. Valores obtenidos de la curva patrón de la técnica de DNS.	4-29
Tabla_ 9. Valores obtenidos de la curva patrón para la técnica de Bradford.	4-31
Tabla_ 10. Solución de lavado.	4-33
Tabla_ 11. Resultados obtenidos de la lectura en el Nanodrop 2200 a partir del ADN obtenido.	4-33

Índice de figuras

Figura_ 1. Rutas biológicas de producir BioH ₂ . (Ghimire et al., 2015).....	2-4
Figura_ 2. Etapas de biodegradación y rutas microbiológicas implicadas en la degradación fermentativa de la biomasa residual (Peiris, Rathnasiri, Johansen, Kuhn, & Bakke, 2006).	2-9
Figura_ 3. Proporción de la población microbiana, determinada por pirosecuenciación de los genes de 16S rRNA de comunidades bacterianas. Inóculo adaptado en lactosa (Gomez-Romero, Gonzalez-Garcia, Chairez, Torres, & García-Peña, 2014).	3-14
Figura_ 4. Esquema gráfico de la forma en que se desplazó el biogás acumulado.	3-16
Figura_ 5. Poblaciones del consorcio C2 (Sánchez, 2016).	3-17
Figura_ 6. Cinética de lactosa.	4-20
Figura_ 7. Cinética de lactosuero.	4-21
Figura_ 8. Cinética de 100% RSO.	4-21
Figura_ 9. Población encontrada por pirosecuenciación del inóculo CJ en sustrato modelo a 30 g/L de lactosa.	4-23
Figura_ 10. Población microbiana presente del consorcio CJ en medio de cultivo de 100% residuos sólidos orgánicos en la producción de BioH ₂	4-24
Figura_ 11. Población microbiana del consorcio CJ presente en el lactosuero en la producción de BioH ₂	4-25
Figura_ 12. Cinética de crecimiento y producción de BioH ₂	4-26

Figura_ 13. Población presente en la fase de crecimiento en la fotofermentación a las 95 h. ---	4-27
Figura_ 14. Población presente en la fase de producción en la fotofermentación con 2 g/L de acetato.-----	4-27
Figura_ 15. Curva patrón para la técnica de DNS.-----	4-30
Figura_ 16. Curva patrón utilizada para la técnica de Bradford.-----	4-31

RESUMEN

La producción y uso de BioH₂ a través de bioprocesos de fermentación oscura y fotofermentación utiliza como sustratos los residuos sólidos orgánicos, aguas residuales y que traen varios beneficios como son la disminución de residuos y la disminución de gases de efecto invernadero.

En el presente trabajo se caracterizó la población microbiana fermentación oscura usando como sustratos 100% residuos sólidos orgánicos, lactosa y lactosuero, y en los tiempo finales se realizó extracción de ADN para la posterior secuenciación en Reaserch and Testing Laboratory (Texas, EUA).

En la fotofermentación para la producción de BioH₂, se realizó con sustrato modelo y con 2 g/L de acetato y se extrajo de ADN para la posterior secuenciación en los laboratorios de a Reaserch and Testing Laboratory (Texas, EUA).

Mediante la pirosecuenciación de los genes de 16S rRNA de comunidades bacterianas que se secuenciaron en Reaserch and Testing Laboratory (Texas, EUA) con Blue primer set (104F/530R), que son cebadores bacterianos 104F y 530R se usaron para amplificar las regiones hipervariables V2 y V3 y así saber el tipo de poblaciones presentes en la muestra.

En el análisis de las secuenciaciones de la fermentación oscura, la mayor productividad de bioH₂ (cantidad máxima) se obtuvo con lactosuero como sustrato. Esto se debió a una población predominante de *Clostridium* con 36%, *Enterobater* con 20% y *Bifidobacterium* con 29% (productoras de BioH₂).

Durante la fase de producción en el proceso de la fotofermentación se obtuvo una productividad con la población predominante de *Rhodopseudomonas* (77%), quienes se encuentran reportadas como productoras de BioH₂.

1 CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Se estima que los combustibles fósiles durarán unas cuatro o cinco décadas más, por lo que de mantenerse los actuales niveles de explotación, la nueva generación observará el fin de éstos. Actualmente se impone la necesidad de alcanzar un balance entre desarrollo y conservación del medio ambiente, que garantice un nuevo equilibrio entre la humanidad y la naturaleza y que permita una nueva armonía con esta. Entre los problemas actuales que enfrenta la humanidad están: el agotamiento no lejano de los combustibles fósiles, el cambio climático y la crisis energética mundial (León M. T. S., 2014).

Por otro lado, se encuentra la generación de residuos sólidos urbanos que se define como “los generados en las casas habitación, que resultan de la eliminación de los materiales que utilizan en sus actividades domésticas, de los productos que consumen y de sus envases, embalajes o empaques...” según la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPYGIR). En el 2014, en nuestro país se recolectan alrededor de 76'922,805 Kg de residuos orgánicos diarios de los cuales sólo a un promedio de 2'748,727 Kg de estos residuos se les da tratamiento. Siendo el Distrito Federal la entidad con mayor generación de residuos con un promedio de 22.67% ; pero también es la entidad donde más se le da tratamiento a los residuos orgánicos con un promedio de 13.61% (INEGI, 2014).

Por ello, se deben buscar alternativas energéticas donde se reduzcan la contaminación a la atmósfera y la generación de residuos. Proponiendo así el BioH₂ como combustible ya que evita la contaminación atmosférica y los residuos.

El hidrógeno es considerado combustible del futuro, debido a que puede producirse de forma renovable, presenta una densidad energética de 122 KJ/g, 2.73 veces más que cualquier combustible de origen fósil y su combustión solo genera agua (Kapdan et al., 2006; Rocha et al., 2011).

1.1.1 Bioprocesos relacionados a la producción de BioH₂

Actualmente, existen varios procesos químicos y biológicos que nos ayudan en la producción de BioH₂. Entre los procesos biológicos se encuentran la biofotólisis, fermentación oscura y la fotofermentación.

La biofotólisis y la fotofermentación son dependientes de la luz recibida de su entorno, mientras que la fermentación oscura no depende de la luz (Kapdan. I.K., 2006).

1.1.2 Fermentación oscura

La fermentación oscura consiste en la digestión de desechos orgánicos ricos en carbohidratos con ausencia de luz por bacterias anaerobias como son las bacterias *Enterobacter*, *Bacillus* y *Clostridium*, éstas se llegan a encontrar como cepas puras o en consorcio donde se ven beneficiadas para la adaptación en diferentes medios de cultivo, dado que sus rutas metabólicas se adaptan en respuesta a las condiciones de su entorno (Hung, Chang, & Chang, 2011).

Dentro las ventajas que se presentan en éste bioproceso es el uso de diferentes sustratos entre ellos los residuos sólidos orgánicos que suelen ser desechos ricos en carbono. Por lo anterior, este tipo de bioprocesos sugieren ser un enfoque prometedor para sustituir los combustibles fósiles. Bajo condiciones anaerobias y durante la conversión de desechos en ácidos grasos orgánicos se obtiene como subproducto el BioH_2 . Adicionalmente, los ácidos orgánicos son utilizados para la generación de metano. La fase acidogénica de la digestión anaerobia de los residuos puede ser manipulada para mejorar la producción de BioH_2 (Hallenbeck, 2009).

EL uso de consorcios en las fermentaciones han sido consideradas por los investigadores para una mayor eficiencia para la producción de BioH_2 .

Las especies de *Rhodobacter* son potentes productores de BioH_2 . Varios estudios han demostrado que las bacterias fotosintéticas púrpura no sulfurosas (PNS) tienen la habilidad de usar los ácidos orgánicos, azúcar simple, glucosa, fructosa y sucrosa, efluentes industriales y agrícolas para la producción de hidrógeno (Singhania, 2013).

1.2 JUSTIFICACIÓN

Los biocombustibles representan en la actualidad una fuente potencial de energía renovable, siendo una alternativa viable para sustituir los combustibles fósiles. Adicionalmente, debido a que la mayoría de los biocombustibles son producidos a partir de residuos agrícolas, su producción generaría nuevos y grandes mercados para esta actividad.

Es sabido que el BioH_2 en su combustión no produce gases de efecto invernadero y tiene un nivel energético de 122 KJ/g, que es 2.75 más eficiente que los combustibles fósiles. Existen varios métodos de producción; una opción es la producción química, sin embargo llega a ser muy costosa por el tipo de método que se llegan a emplear. Por otro lado, la producción biológica como la fermentación oscura y la fotofermentación, en ambos la producción de BioH_2 la realizan las

bacterias bajo ciertas condiciones. En la fermentación oscura es sabido que las bacterias productoras de BioH₂ son *Actinomyces spp.*, *Porphyromonos spp.*, *Clostridium spp* y *Enterobacter spp* y en la fotofermentación es la *Rhodobater sp.* Diferentes investigadores las han estudio en cepa pura o en consorcio. En el presente trabajo se estudiarán los consorcios denominados CJ en fermentación oscura y C2 para fotofermentación, mismos que más adelante se describen.

Sin embargo, su estudio individual no ha logrado que sea económicamente viable debido a su bajo rendimiento, por lo que el acoplar ambos sistemas implicaría plantear estrategias para optimizar el proceso de producción.

Una de las estrategias es el estudiar la dinámica poblacional de ambos procesos para optimizar la producción de BioH₂. La pirosecuenciación es una herramienta que se basa en la cuantificación del pirofosfato que se libera como resultado de la incorporación de nucleótidos en un templado amplificado y esto causa que se rompan las moléculas en fragmentos pequeños para determinar su composición de bases y deducir la secuencia a partir de fragmentos faltantes.

Por lo tanto, en este trabajo se realizará un estudio de la caracterización de la dinámica poblacional de un sistema acoplado de fermentación oscura con la foto fermentación para la producción de BioH₂ para sentar las bases de un sistema acoplado de fermentación oscura y fotofermentación.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Caracterizar la población microbiana de un sistema acoplado de fermentación oscura con fotofermentación para la producción de BioH₂.

1.3.2 Objetivos específicos

- I. Determinar el comportamiento y la composición de la población microbiana durante cinéticas de fermentación oscura para la producción de BioH₂ con distintas fuentes de carbono: RSO, lactosuero y lactosa.
- II. Establecer el comportamiento cinético y la distribución de poblaciones microbiana un proceso de fotofermentación con acetato para la producción de BioH₂.
- III. Caracterizar la población microbiana de un sistema acoplado de fermentación oscura con fotofermentación a través de pirosecuenciación.

2 CAPITULO II

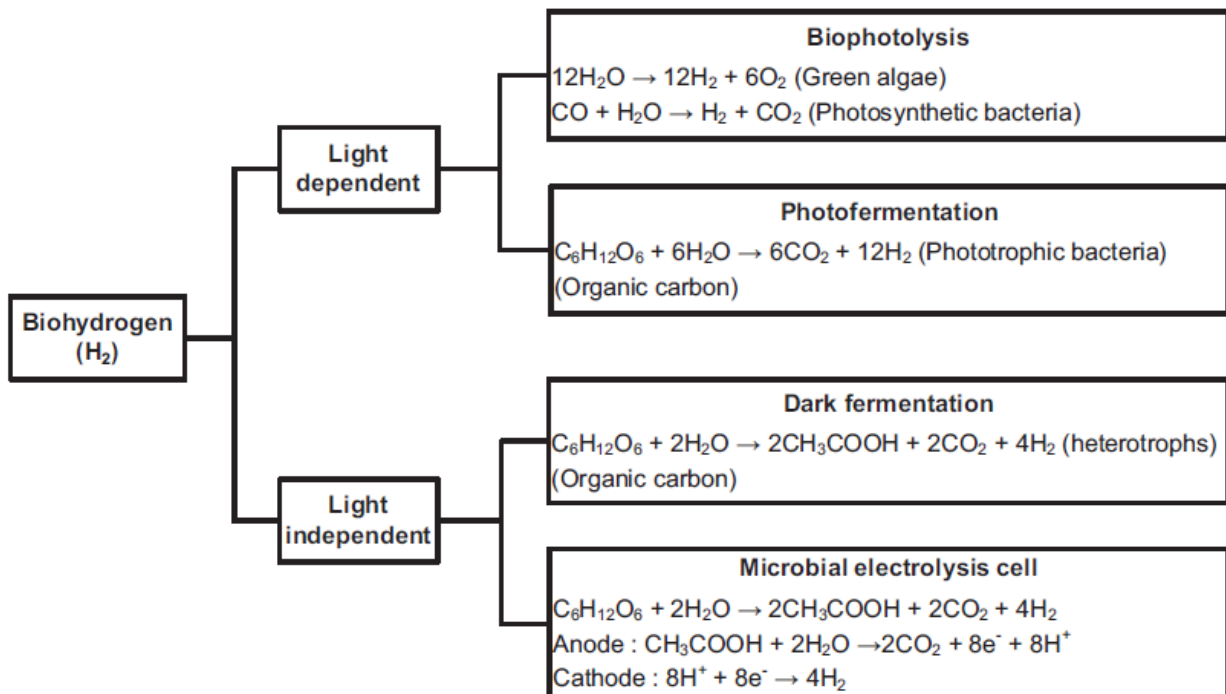
2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 Biohidrógeno

El hidrógeno es por mucho el elemento más abundante en el universo, el 75% de la masa de toda la materia. Es el más simple de todos los elementos y posee un nivel energético de 122 KJ/g, que es 2.75 más eficiente que los combustibles fósiles (Kapdan. I.K., 2006). Y al consumirse el hidrógeno, los únicos productos que se generan son agua y calor, disminuyendo así la cantidad de los gases de efecto invernadero, sólo por mencionar algunas de las ventajas de este elemento.

Alrededor del 95% del hidrógeno se produce a partir de materias primas fósiles, como la reforma del gas natural y la gasificación del carbón; Sólo el 4% es producido por electrólisis de agua procedente de fuentes renovables y el 1% restante es generado por procesos biológicos (Debabrata Das & Veziroglu, 2008).

Una de las formas de obtenerlo es a través de microorganismos anaerobios y al hidrógeno obtenido por ellos se le llama BioH₂. Los procesos biológicos que se pueden emplear y que son conocidos son la biofotólisis, la fermentación oscura y la fotofermentación.



Figura_ 1. Rutas biológicas de producir BioH₂. (Ghimire et al., 2015)

2.1.2 Procesos dependientes de luz

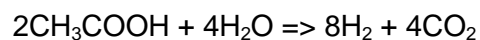
2.1.2.1 Biofotólisis

La energía que proviene de la luz es necesaria para que los microorganismos, en este caso, las microalgas verdes, y se obtenga hidrógeno a través de las células fotosintéticas.

Las microalgas verdes fotoautótrofas y las cianobacterias utilizan la luz solar y el CO₂ como la energía y carbono. El poder reductor de la fotosíntesis celular y / o biofotólisis proviene de la oxidación del agua bajo irradiación de luz (Maria L. Ghirardi, 2000; Yu & Takahashi, 2007). La biofotólisis es la acción de la luz sobre los sistemas biológicos que resulta en la disociación del agua en hidrógeno molecular y oxígeno, H₂O => H₂ + ½ O₂.

2.1.2.2 Fotofermentación

Las bacterias fotosintéticas como las de color púrpura sin azufre (PNS) que descomponen pequeñas moléculas orgánicas a BioH₂ en la presencia de luz como:



Este proceso difiere de la biofotólisis donde moléculas orgánicas se utilizan como el portador de hidrógeno en lugar de agua. Este proceso tiene un mayor rendimiento de BioH₂ que la fermentación oscura y puede utilizar una gama más amplia de sustratos que la biofotólisis. Sin embargo, las tasa de producción volumétrica de BioH₂ son inferiores a la fermentación oscura y demasiado lento para la aplicación comercial (Juan Liu, 2015).

Las bacterias PNS corresponden a un grupo versátil de microorganismos que pueden crecer de forma fotoheterótrofa, fotoautótrofa y quimioheterótrofa, cambiando de un modo u otro dependiendo de las condiciones de crecimiento donde se tenga la bacteria: grado de anaerobiosis, la viabilidad para metabolizar la fuente de carbono (CO₂ para crecimiento autótrofo y compuestos orgánicos para heterótrofo) y la intensidad de luz (para crecimiento fototrófico). Para la producción de hidrógeno se lleva a cabo un proceso fotoheterotrófico, donde se utiliza la energía fotosintética para poder oxidar los ácidos orgánicos como el acetato y el butirato (Basak, N. & Das, 2007).

2.1.2.2.1 Microorganismos presentes de un consorcio fotoheterotrófico

2.1.2.2.1.1 *Bacteroides*

Algunas especies de *Bacteroides* tiene la habilidad de obtener carbono y energía a través de la hidrólisis de solubilidad o de polisacáridos hidratados (Betian, Linehan, Bryant, & Holdeman, 1977). Se ha reportado con la habilidad de usar la celulosa pura. Sin embargo, los polisacáridos insolubles, que se encuentran principalmente en la pared celular de las plantas (cereales, frutas y verduras), constituyen una de las principales fuentes de hidratos de carbono que se degradan ampliamente por la microbiota del intestino humano, la población fibrolítica implicada en la degradación de estos sustratos sigue siendo muy poco estudiado. Durante el curso de un estudio sobre la comunidad degradante de celulosa predominante del colon humano, se aisló una bacteria Gram-negativa que mostraba alta similitud de secuencia de genes de rRNA 16S con miembros del género *Bacteroides* (Robert, Chassard, Lawson, & Bernalier-Donadille, 2007).

2.1.2.2.1.2 *Citrobacter*

Las bacterias del género *Citrobacter* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos y anaerobios facultativos que exhiben reacciones catalasa-positiva y oxidasa-negativa (Paradis, S., et al, 2005). En adición, ciertas características fenotípicas como la motilidad, la capacidad para tomar el citrato como fuente de carbono y la producción de H₂S, se han considerado elementos clave en su diagnóstico y determinación hasta el nivel de especie (Brenner et al., 1999; Janda, Abbott, Cheung, & Hanson, 1994).

Los perfiles electroforéticos obtenidos pueden ser utilizados para identificar especies, siempre y cuando se cuente con el número y tipo adecuado de enzimas de restricción (Malik, Beer, Megharaj, & Naidu, 2008; Sklarz, Angel, Gillor, & Soares, 2009). Esta técnica se basa en la digestión del gen ribosomal 16S previamente amplificado mediante la PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction) con lo cual el producto obtenido se separa mediante electroforesis en gel de agarosa para una identificación adecuada (Malik et al., 2008).

2.1.2.2.1.3 *Clostridium* sp

En ausencia de oxígeno *Clostridium butyricum* fermenta la lactosa y produce ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno; otros *Clostridios* producen butanol, acetona, alcohol isopropílico y gases de hidrógeno y CO₂. Se puede producir en el ensilado de pastos y forrajes (Puerta Quintero, 2010)

2.1.2.2.1.4 *Dysgonomonas sp*

El género *Dysgonomonas* está asociado con la fermentación de la glucosa con la producción de ácido pero no de gas en condiciones anaeróbicas facultativas. Su presencia en el biofilm tolerante podría atribuirse a las complejas interacciones sintróficas que existían en la biopelícula, que son posibles para acelerar la tasa metabólica de *Dysgonomonas* para oxidar sustratos a bajas temperaturas. El biofilm de cultivo mixto puede proporcionar protección para *Dysgonomonas* frente a condiciones ambientales adversas (Lu, Xing, Ren, & Logan, 2012). El género *Bacteroides* es una importante bacteria fermentativa mesófila implicada en el catabolismo del azúcar (Daday, Platz, & Smith, 1977), con productos importantes de la fermentación de la glucosa que incluyen propionato, acetato, lactato, formiato, succinato y fumarato.

2.1.2.2.1.5 *Rhodopseudomonas palustris*

Rhodopseudomonas palustris es una bacteria púrpura no de azufre fototrófica que se encuentra comúnmente en los suelos y el agua, que hace su vida convirtiendo la luz solar en energía celular y absorbiendo el dióxido de carbono atmosférico y convirtiéndolo en biomasa. Este microbio también puede degradar y reciclar una variedad de compuestos aromáticos que comprenden la lignina, el componente principal de la madera y el segundo polímero más abundante en la tierra.

R. palustris es una de las bacterias más metabólicamente versátiles jamás descritas. No sólo puede convertir gas dióxido de carbono en el material de la célula sino nitrógeno en amoníaco, y puede producir gas hidrógeno. Crece tanto en ausencia como en presencia de oxígeno. En ausencia de oxígeno, prefiere aprovechar la energía de la luz a través de la fotosíntesis. Crece y aumenta su biomasa mediante la absorción de dióxido de carbono, pero también puede aumentar la biomasa mediante la degradación de los compuestos orgánicos, incluidos compuestos tóxicos tales como 3-clorobenzoateto. Cuando el oxígeno está presente, *R. palustris* genera energía degradando una variedad de compuestos que contienen carbono (incluyendo azúcares, monómeros de lignina y metanol) y realizando la respiración.

R. palustris experimenta dos grandes procesos de desarrollo. La primera es la división celular por brotación. Este proceso de división celular asimétrica da lugar a dos tipos diferentes de células hijas, una célula swarmer móvil y la otra, a células no motrices acechadas. La segunda es la diferenciación de un elaborado sistema de vesículas intracitoplasmáticas de membrana cuando las células se quedan sin oxígeno y se colocan en luz. Las membranas se utilizan para albergar pigmentos fotosintéticos y proteínas asociadas. La división en brotación y la diferenciación a células fotosintéticamente competentes requieren un programa de expresión génica

temporalmente regulado seguido de un patrón de localización precisa de productos proteicos (Nordberg H, et al, 2014).

2.1.2.3 Fermentación Oscura

La fermentación oscura es la tecnología más estudiada y prometedora para la producción de BioH₂ debido a sus mayores tasas de producción y capacidad de tratamiento de residuos orgánicos. También se pueden utilizar varios sustratos ricos en carbohidratos, tales como cultivos de combustible de primera generación (por ejemplo, caña de azúcar, trigo, maíz y remolacha azucarera), así como biomasa de segunda generación como residuos agrícolas, así como residuos industriales y aguas residuales (Debabrata Das & Veziroglu, 2008).

En la actualidad, el desarrollo del bioproceso de fermentación oscura a escala industrial está limitado por su menor rendimiento de BioH₂ comparado con su rendimiento máximo teórico de 4 moles de H₂ por moles de hexosa, así como los costes estimados asociados con la producción de H₂ (Ghimire et al., 2015).

Factores que influyen en el rendimiento fermentativo de BioH₂:

- Fuentes de inóculo y métodos de enriquecimiento
- Tratamiento de los sustratos (residuos sólidos orgánicos)
- Operación y diseño del biorreactor (pH del cultivo, temperatura y presión parcial del hidrógeno, adición de nutrientes y elementos traza)
- Utilización de residuos en la fermentación oscura

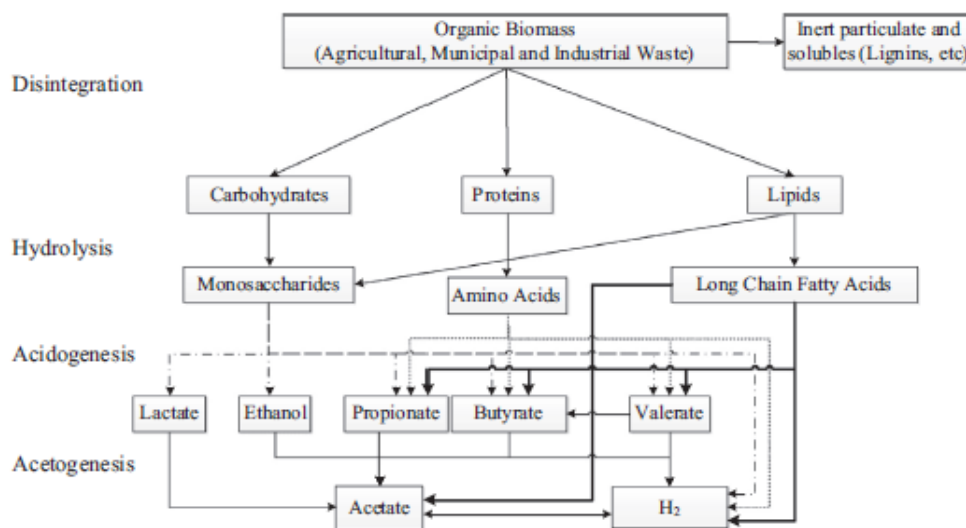
En los procesos de fermentación oscura, los sustratos ricos en carbohidratos se descomponen anaerobiamente por microorganismos productores de hidrógeno, como anaerobios facultativos y anaerobios obligatorios. El BioH₂ se produce en el proceso de eliminación de los electrones en exceso a través de la actividad de la enzima hidrogenasa (D Das, 2001; Li & Fang, 2007). Bajo ambientes anaeróbicos, los protones (H⁺) pueden actuar como aceptores de electrones para neutralizar los electrones generados por la oxidación de sustratos orgánicos, produciendo BioH₂. En contraste con la respiración aeróbica, donde el oxígeno se reduce y el agua es el producto final (D Das, 2001; Wang & Wan, 2009).

En la fermentación oscura de glucosa como el sustrato modelo, las bacterias productoras de BioH₂, convierten la glucosa en piruvato a través de la vía glicolítica que produce adenosina trifosfato (ATP) a partir de difosfato de adenosina (ADP) y la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) (Li & Fang, 2007). El piruvato se oxida adicionalmente a acetil Coenzima A (acetil-CoA), dióxido de carbono (CO₂) e hidrógeno por piruvato ferredoxina

oxidorreductasa e hidrogenasa. Dependiendo del tipo de microorganismo y las condiciones ambientales, el piruvato también puede convertirse en acetyl-CoA y formiato que se puede convertir adicionalmente en hidrógeno y CO₂. Además, la acetyl-CoA podría convertirse a acetato, butirato y etanol (Li & Fang, 2007). En la fermentación oscura, los carbohidratos complejos por microbiota anaeróbica mixta puede dar lugar a una amplia gama de productos intermedios y subproductos dependiendo de los parámetros operativos, tales como el tipo de sustrato, la tasa de carga del sustrato, el pH, la temperatura y otras condiciones operativas y ambientales, ya que también influyen en el microbioma de los biorreactores.

En la Figura_ 2, da una representación esquemática de las diferentes etapas y vías bioquímicas implicadas en la fermentación oscura de biomasa orgánica compleja. Estas vías bioquímicas pueden ser mediadas por anaerobios estrictos (*Clostridia*, metilótrofos, bacterias del rumen, bacterias metanogénicas, archaea, etc.), anaerobios facultativos (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*), e incluso aerobios (*Alcaligenes*, *Bacillus*). Acetato y butirato son los productos más comunes de la fermentación oscura (Nath & Das, 2004).

Cuando la vía metabólica es tal que favorece la producción de ácido acético, el rendimiento estequiométrico de BioH₂ es de 4 moles por cada mol de glucosa (es decir, 544 mL H₂ / g de hexosa a 25°C), mientras que el rendimiento del BioH₂ es de 2 moles para un mol de glucosa (es decir, 272 mL de H₂ / g de hexosa a 25°C) cuando el producto final es ácido butírico. Sin embargo, el rendimiento real de hidrógeno es menor que el rendimiento teórico como parte del sustrato se utiliza para la producción de biomasa y la degradación de los sustratos podría seguir otras vías bioquímicas sin producción de hidrógeno (Hallenbeck & Benemann, 2002; Nath & Das, 2004). Bajo ciertas condiciones, las vías metabólicas conducen a la producción de etanol y acetato, disminuyendo el rendimiento estequiométrico de hidrógeno a 2 mol de BioH₂ por un mol de glucosa (es decir, 272 mL H₂ / g de hexosa a 25°C) (Ghimire et al., 2015).



Figura_ 2. Etapas de biodegradación y rutas microbiológicas implicadas en la degradación fermentativa de la biomasa residual (Peiris, Rathnasiri, Johansen, Kuhn, & Bakke, 2006).

2.1.2.3.1 Microorganismos de un consorcio fermentación oscura

2.1.2.3.1.1 *Acetobacter lovaniensis*

Tienen una coloración de gram negativo y una morfología elipsoidal, en forma de varilla, a menudo con ligeras curvas, tiene un tamaño entre 0,6-0,9 x 1,0-1,4 μm . Las colonias tienden a ser de colores pálidos, pequeñas y elevadas. El *Acetobacter* puede ser floculento y puede formar una película en la fase de crecimiento en un medio líquido.

Puede sobrevivir por un tiempo limitado sin oxígeno, pero es obligatoriamente aeróbico para la actividad metabólica. Se oxida acetato, lactosa, etanol y glucosa para gluconato. 2-cetogluconato y 5-cetogluconato no se producen. Es catalasa positiva. No produce ácido de d-fructosa, l-sorbosa, d-manitol, d-sorbitol, glicerol, sacarosa o lactosa. La producción de ácido a partir de d-manosa, d-galactosa, l-arabinosa y d-xilosa depende de la tensión.

La bacteria se encuentra comúnmente en frutas, flores, vinagres y en alimentos y bebidas fermentadas.

Aunque es estrictamente aeróbico, puede sobrevivir durante algún tiempo en el vino y oxidar el etanol en ácido acético y acetato de etilo. Si los sustratos no están agotados, puede continuar la actividad después de que el ML haya terminado, en botella. Los métodos comunes de control incluyen el uso de SO_2 , evitar del exceso de oxígeno y el saneamiento (König H., 2009).

2.1.2.3.1.2 *Bifidobacterium*

Los microorganismos del género *Bifidobacterium* pertenecen al grupo gram positivo, no esporulados, anaerobios, catalasa negativa y no motiles. Su morfología es bacilar globular, irregulares, usualmente cóncavos y de extremos abultados, forman protuberancias con una o más ramificaciones. Son bacilos polimórficos, dependiendo del medio de crecimiento se observan en forma de V o de Y (\cup). Se arreglan en pares o solos, miden 0.5 – 1.3 x 1.5 – 8 μm . La enzima fructuosa-6-fosfato fosfoacetolasa, enzima principal de la fermentación glicolítica para estos microorganismos, sirve como característica taxonómica en la identificación del género, pero no permite la diferenciación interespecies (J., 1993).

Con relación a la tolerancia de oxígeno, este grupo de microorganismos son anaerobios estrictos, sin embargo, dicha tolerancia dependerá de la especie y medio de cultivo donde crezca.

En presencia de CO₂, la sensibilidad al oxígeno varía considerablemente dependiendo de la cepa (Charteris, Kelly, Morelli, & Collins, 1997).

Dependiendo de las especies, estos microorganismos presentan una temperatura óptima de crecimiento entre 37 – 41 °C (Holt, Krieg, Sneath, Staley, & Williams, 1994).

El pH óptimo de crecimiento para *Bifidobacterium* se encuentra entre 6.5 y 7.0; no ocurre crecimiento debajo de 4.5 – 5.0 o por encima de 8.0 – 8.5 (Holt et al., 1994; J., 1993).

En el género *Bifidobacterium*, las hexosas son degradadas exclusiva y específicamente por la ruta fermentativa fructuosa-6-fosfato (J., 1993). En estos microorganismos, las enzimas aldolasa y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa están ausentes, mientras que se encuentra la fructuosa-6-fosfato fosfoacetolasa. La fermentación de dos moles de glucosa por las bifidobacterias conduce globalmente a tres moles de acetato y dos moles de lactato (Charteris et al., 1997).

2.1.2.3.1.3 *Clostridium* y *Enterobacter*

Tanto *Clostridium* como *Enterobacter*, son consideradas dentro de las bacterias principales microorganismos fermentadores. Estas bacterias predominan en los suelos, pantanosos, mucosas y en partes del cuerpo donde hay poco oxígeno, como la placa dental, las vías respiratorias altas, los genitales, el intestino, el colon, y a veces se encuentran en las glándulas sebáceas de la piel (Alcalá, Betriu, & Reig, 2004).

En ausencia de oxígeno, *Clostridium butyricum* fermenta la lactosa y produce ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono y bioH₂.

2.1.2.3.1.4 *Disulfovibrium*

El *Desulfovibrio* es uno de los primeros géneros descritos y el género más estudiado entre las bacterias reductoras de sulfato (Devereux, Delaney, Widdel, & Stahl, 1989; Legall et al., 1990). Estos son bacilos gram-negativos, no fermentadores, anaeróbicos, caracterizados por la presencia de un pigmento, la desulfoviridina, que fluoresce rojo en pH alcalino y azul-verde en pH ácido bajo luz UV de longitud de onda larga (Laue, Friedrich, Ruff, & Cook, 2001) y un fuerte olor sulfuroso en medio de cultivo (Warren, Citron, Merriam, & Goldstein, 2005).

Además de usar sulfato como aceptor de electrones, muchas de estas bacterias crecen usando nitrato (NO₃⁻) como aceptor de electrones, reduciendo el NO₃⁻ a amoníaco (NH₃), o pueden usar ciertos compuestos orgánicos para generar energía a partir de vías metabólicas fermentativas en ausencia absoluta de sulfato o de otros aceptores terminales de electrones.

El compuesto más común es el piruvato, que mediante la reacción produce acetato, CO₂ y BioH₂. Con lactato o etanol, la fermentación no produce suficiente energía y se requiere sulfato (Chavez, 2008).

2.1.2.3.1.5 *Gluconobacter*

Las bacterias del ácido acético (*Acetobacter* y *Gluconobacter*) presentan las características comunes del grupo de bacterias similares a *Pseudomonas* que se presentaron anteriormente. Viven en la superficie de las plantas donde constituyen una microflora secundaria que utiliza los productos de desecho de la microflora primaria (bacterias lácticas y levaduras). Esto es así porque presentan la capacidad de utilizar alcoholes como fuente de carbono y energía produciendo su oxidación a ácido (bacterias suboxidantes como *Gluconobacter*) o a CO₂ y H₂O (bacterias superoxidantes como *Acetobacter*). La producción de ácido acético por estas bacterias las hace extremadamente acidófilas.

Las bacterias suboxidantes carecen de un ciclo de los ácidos tricarboxílicos completo por lo que oxidan de forma estequiométrica el etanol a acético. Las bacterias superoxidantes realizan una primera oxidación a acético; pero la presencia de ciclo de ácidos tricarboxílicos permite la oxidación total mucho más lenta. Otra particularidad del grupo es que la utilización de azúcares se produce únicamente por la ruta de las pentosas.

Además de por su diferente capacidad de oxidación de alcoholes las dos bacterias del ácido acético pueden diferenciarse por su flagelación polar en *Gluconobacter* y peritrica en *Acetobacter* (Holt et al., 1994).

2.1.2.3.1.6 *Lactobacillus*

Las bacterias lácticas se definen como microorganismos Gram positivos, generalmente inmóviles, no esporulados, no pigmentados y no reductores de nitratos. Tampoco licúan la gelatina y no producen indol ni ácido sulfhídrico. Son anaerobios aerotolerantes ya que, aunque en general carecen de catalasa, poseen peroxidasas y superóxido dismutasas que destruyen, respectivamente, el H₂O₂ y el O₂⁻ que se forman en condiciones aerobias.

La mayoría de las bacterias lácticas sólo pueden obtener energía a partir de azúcares y otros compuestos relacionados. Debido a su limitada capacidad biosintética son muy exigentes nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Boukhemis, Djeghri-hocine, Tahar, & Amrane, 2009).

Estos microorganismos forman un grupo muy heterogéneo, cuya característica aglutinadora es la generación de cantidades apreciables de ácido láctico como principal producto de su metabolismo fermentativo (Orla-Jensen, 1919).

2.1.2.4 Pirosecuenciación

La tecnología de pirosecuenciación se basa en el principio de secuenciación por síntesis. Después de la incorporación exitosa de un nucleótido por una polimerasa usando un fragmento de PCR de una cadena (o RT-PCR) como plantilla, el PPi liberado se convierte en luz mediante una cascada enzimática: ATP sulfurilasa convierte PPi en ATP en presencia de APS. Este ATP conduce la conversión mediada por luciferasa de luciferina a oxiluciferina que genera luz visible, que es detectada por sensores CCD y vista como un pico en la salida de datos sin procesar (Pyrogram®). La apirasa degrada continuamente los nucleótidos no incorporados y el ATP. La altura de cada pico (señal luminosa) es proporcional al número de nucleótidos incorporados (Hochstein et al., 2010).

La adición secuencial de nucleótidos permite la decodificación cuantitativa de la secuencia para analizar.

La información de secuencia proporciona datos confiables para aplicaciones de genotipificación microbiana. Dado que las secuencias de pirosecuencia mediante la síntesis de nuevas copias de la plantilla de ADN, los resultados proporcionan información inequívoca. Los usuarios pueden comprobar la secuencia que rodea el sitio variable asegurando que se analizó la región de ADN correcta. A diferencia de las técnicas de hibridación, la pirosecuenciación permite la identificación de un gran número de especies utilizando un único cebador conservado. En consecuencia, el ADN extraído de múltiples especies de microbios puede secuenciarse en la misma secuencia de pirosecuencia.

Con un software compila bases de datos de secuencias locales contra las cuales las salidas de la pirosecuenciación importadas, se alinean rápidamente. Los datos brutos, los impactos coincidentes y el porcentaje de concordancia de cada golpe se presentan en informes detallados.

Dependiendo del diseño del ensayo, la secuencia puede usarse para discriminar especies microbianas, tipos y cepas, o detectar mutaciones genéticas (Hochstein et al., 2010).

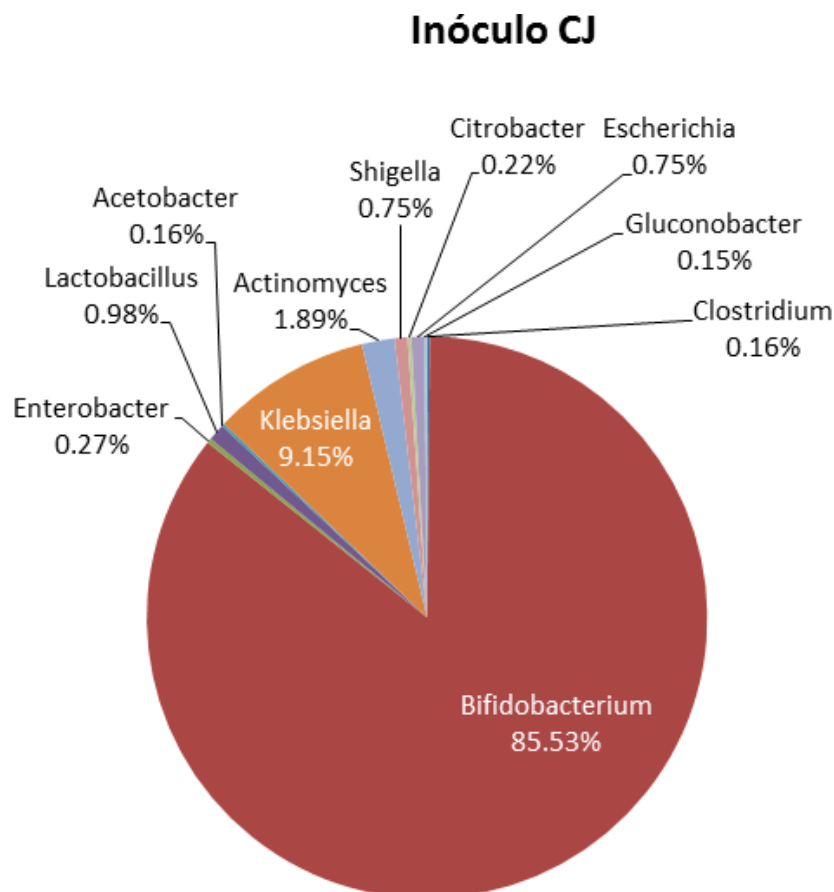
3 CAPITULO III

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Fermentación Oscura

3.1.1.1 Arranque de inóculo

El inóculo que se utilizó está constituido por las poblaciones microbianas que se muestra en la Figura_ 3. Este consorcio bacteriano se cultivó en residuos sólidos orgánicos (RSO) y lactosuero (LS), así como en un medio de cultivo con sustrato modelo (lactosa). Los RSO están constituidos por una mezcla de frutas y verduras, la cual se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Se procedió a licuar y se tamizó para retirar toda fibra que pudiera obstruir las jeringas de la toma de muestra líquida. La lactosa se preparó con los reactivos que se muestran en la Tabla_ 2. Se le reguló el pH a 5.8 con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido sulfúrico (H₂SO₄). Se inóculo con 10% del consorcio CJ. El lactosuero se diluyó en 1 L de agua destilada con 30 g de lactosuero en polvo y se reguló el pH a 5.8, el lactosuero contiene las características químicas que se encuentran en la Tabla_ 3.



Figura_ 3. Proporción de la población microbiana, determinada por pirosecuenciación de los genes de 16S rRNA de comunidades bacterianas. Inóculo adaptado en lactosa (Gomez-Romero, Gonzalez-Garcia, Chairez, Torres, & García-Peña, 2014).

Tabla_ 1. Tabla de frutas y verduras que constituyen el medio de RSO para la fermentación oscura.

	Cantidad (g)
Piña	250
Lechuga	250
Jitomate	250
Naranja	250
Plátano	250
Papaya	250

Tabla_ 2. Composición del medio de lactosa para la fermentación oscura.

Compuesto	Cantidad (g/L)
Lactosa	30
KH₂PO₄	0.6
(NH₄)SO₄	3
K₂HPO₄	2.4
MgSO₄*7H₂O	1.5
FeSO₄	0.03
CaSO₄	0.15

Tabla_ 3. Características químicas del lactosuero.

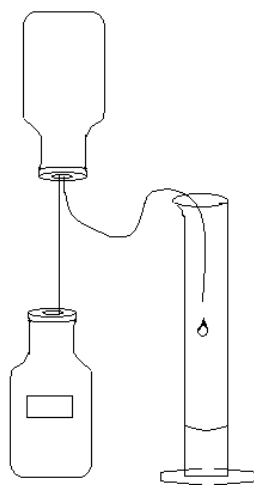
Grasa de la leche	1.50%	MAX.
Humedad	4.00%	MAX.
Proteína (jkn *6.38)	11.00%	APPROX.
Lactosa	70.00%	MIN.
Mineral /ASH	8.00%	APPROX.
Acidez	0.17%	MAX.
Índice de solubilidad	1.5 mL	MAX.
Prticulas quemadas	DISQUE B (15.0 mg)	MAX.
pH	6.0 – 6.8	

Para iniciar las cinéticas se utilizaron botellas serológicas ámbar de 120 mL, en ellas se colocaron 80 mL de medio de cultivo en las proporciones ya antes mencionadas, se adicionaron 8 mL de inóculo (que corresponde al 10% del volumen del medio) se sellaron las botellas con septos y se desplazó el oxígeno presente en el interior de la botella durante 3 minutos con nitrógeno (N₂) para obtener una atmósfera anaerobia. Finalmente se incubaron a 36 °C, con agitación permanente y constante de 150 rpm.

3.1.1.2 Seguimiento de cinética

Cada 24 horas las botellas se les desplazó el biogás contenido como se muestra en la Figura_ 4 de las botellas serológicas ámbar y se registró la cantidad de agua desplazada. Posteriormente se inyectó en el cromatógrafo de gases con una jeringa de inyección de gases y se registró el área bajo la curva detectada por el cromatógrafo de gases, obteniendo así a través del análisis el porcentaje (%v/v) de hidrógeno.

El pH no se monitoreó durante la cinética.



Figura_ 4. Esquema gráfico de la forma en que se desplazó el biogás acumulado.

3.1.1.3 Muestra líquida

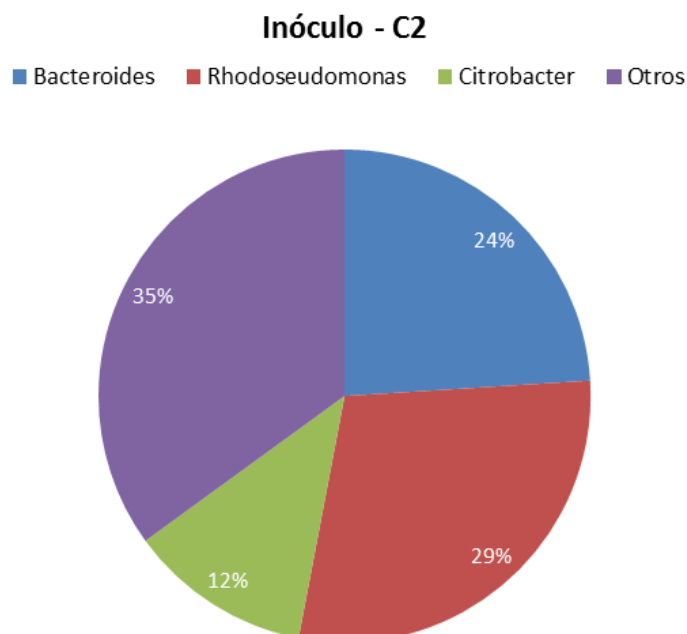
La muestra líquida se tomó con una jeringa dedicada para cada concentración, se extrajo 5 mL de la muestra líquida en la fermentación oscura. Las muestras líquidas se utilizaron para el análisis de producción de ácidos grasos volátiles (AGV's), la cantidad de proteína mediante Bradford, DQO para determinar cantidad de sustrato, y DNS para determinar cantidad de azúcares. Todos los métodos mencionados se explican en los anexos.

3.1.2 Fotofermentación

3.1.2.1 Arranque del inóculo para la fase de crecimiento

Del consorcio C2 de fotobacterias que se muestra en la Figura_ 5 previamente preparado, se centrifugó el inóculo a 3500 rpm por 20 minutos. Posteriormente, en la campana de flujo laminar se le retiró el sobrenadante al consorcio C2 en su totalidad y se resuspendió en 80 mL de medio

de crecimiento estéril con 2 g de acetato de sodio con un pH de 6.8 que fue regulado con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido sulfúrico (H₂SO₄). Se selló la botella serológica y se desplazó el aire contenido en el interior de la botella serológica por 3 minutos con argón (Ar), todo en condiciones estériles. Se incubó por 96 horas. En la Tabla_ 4 se muestran los componentes del medio de crecimiento.



Figura_ 5. Poblaciones del consorcio C2 (Sánchez, 2016).

Tabla_ 4. Composición del medio de cultivo de crecimiento para las fotobacterias.

Reactivo	Cantidad (g/L)
Levadura	0.2
Solución traza	1 mL/L
FeSO₄	0.012
MgSO₄	0.2
CaCl₂*2H₂O	0.075
(NH₄)₂SO₄	1
EDTA disódico	0.02
K₂HPO₄	0.975
Na₂HPO*H₂O	0.1295
Acetato	2

3.1.2.2 Inicio de cinética en fase de crecimiento

Se centrifugó el inóculo a 3500 rpm durante 20 minutos, y se resuspende en 80 mL de medio de crecimiento de la Tabla_ 4. En botellas serológicas estériles por triplicado se colocó el 10% de inóculo y en un volumen final de 80 mL con medio estéril de crecimiento a un pH de 6.8 regulado con NaOH y H₂SO₄. Se sellaron las botellas serológicas y se desplazó el aire contenido en el interior de la botella serológica por 3 minutos con Ar, todo en condiciones asépticas para

garantizar la no contaminación y crear una atmosfera anaerobia en el interior de las botellas. La fase de crecimiento tuvo una duración de 96 horas.

3.1.2.3 Seguimiento de la fotofermentación en fase de crecimiento

En la cinética de la fase de crecimiento se tomó muestra líquida cada 24 horas. En tubos eppendorf de 2 mL y con jeringa dedicada estéril y se colocó 2 mL de la muestra. A estas muestras se les midió densidad óptica para analizar el crecimiento celular (biomasa) y se leyeron a 660 nm. Las muestras líquidas se conservaron en congelación para utilizar la biomasa en el análisis de la cuantificación de proteína por medio del método de Bradford y el sobrenadante se usó para el análisis de consumo de sustrato en el HPLC. Estos métodos se mencionan en el anexo.

3.1.2.4 Fase de producción

Se centrifugaron las botellas serológicas de crecimiento a 3500 rpm por 20 minutos y posteriormente se retiró el sobrenadante. Se le añadió 80 mL de medio de producción con la composición que se encuentran en la Tabla_ 5 (sin fuente de amonio) y se sellaron las botellas serológicas y se desplazó el aire contenido en el interior de la botella con Ar por 3 minutos.

Cada 24 horas a las botellas se les desplazó el biogás contenido como se muestra en la Figura_ 4, y se registró la cantidad de agua desplazada. Posteriormente se inyectó en el cromatógrafo de gases. La lectura obtenida se registró.

Tabla_ 5. Composición del medio de cultivo de producción para las fotobacterias.

Reactivo	Cantidad (g/L)
Solución traza	1 mL/L
FeSO ₄	0.012
MgSO ₄	0.2
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.075
EDTA disódico	0.02
K ₂ HPO ₄	0.975
Na ₂ HPO*H ₂ O	0.1295

Se tomaron muestras líquidas de 2 mL en tubos eppendorf y se midió la densidad óptica con el espectrofotómetro a 660 nm y se registraron las lecturas.

3.1.2.5 Extracción de ADN

La extracción de ADN en el caso de la fermentación oscura se realizó a las 120 h con el protocolo de suelos que se menciona en el anexo.

En la fotofermentación, se realizó la extracción de ADN en fase de crecimiento a las 96 h, antes de pasar a producción y a las 96 h de haber iniciado la fase de producción con el protocolo de suelos del anexo.

3.1.2.6 Pirosecuenciación

Las muestras que se mandaron a pirosecuenciar a Reaserch and Testing Laboratory (Texas, EUA) con Blue primer set (104F/530R), que son cebadores bacterianos 104F y 530R se usaron para amplificar las regiones hipervariables V2 y V3 del gen rRNA 16S nucleados 137-242 y 433-497 pares de bases, respectivamente (numeración basada en el gen del ARNr 16S de *Escherichia coli*).

El laboratorio entregó los resultados obtenidos de las secuenciaciones de las bacterias que se lograron identificar y su porcentaje de predominancia en las muestras.

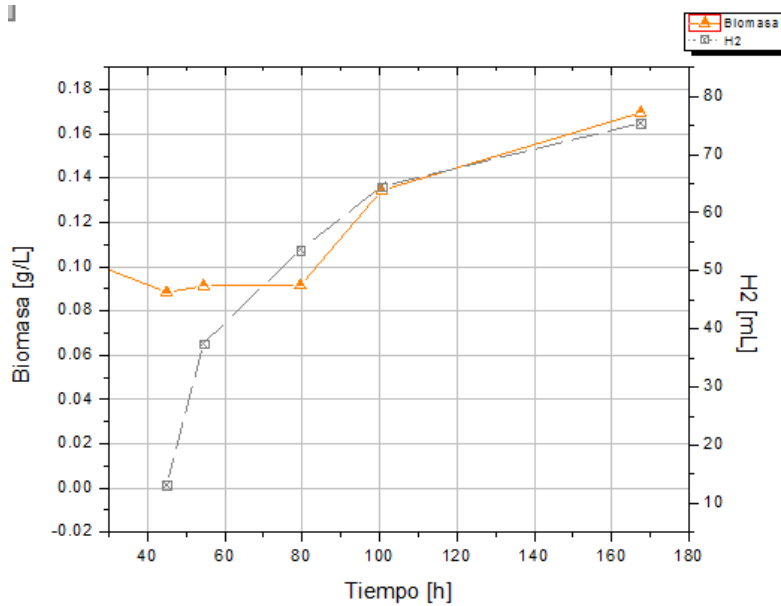
4 CAPÍTULO III

4.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 Fermentación oscura

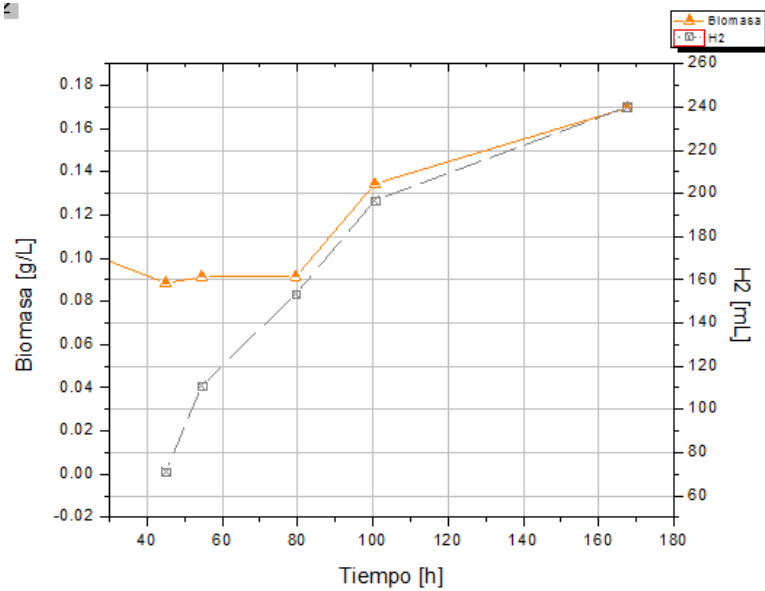
4.1.1.1 Cinéticas de producción de BioH₂ a partir del consorcio CJ en la fermentación oscura.

Como se puede observar en la Figura_ 6, durante la fermentación oscura con el sustrato de lactosa como fuente de carbono, podemos ver que a las 42 h, el consorcio CJ empezó a producir BioH₂, es decir que en inóculo CJ en cuanto se adapta a las condiciones que le ofrece el medio con sustrato de lactosa, las bacterias degradadoras de carbohidratos lo realizan en un periodo de 42 h aproximadamente, posteriormente permite que las bacterias productoras del metabolito de interés generen en este caso BioH₂. Y posterior a las 100 h, se observa un mantenimiento de producción, obteniendo como volumen máximo 75.41 mL de BioH₂ al final de la cinética.



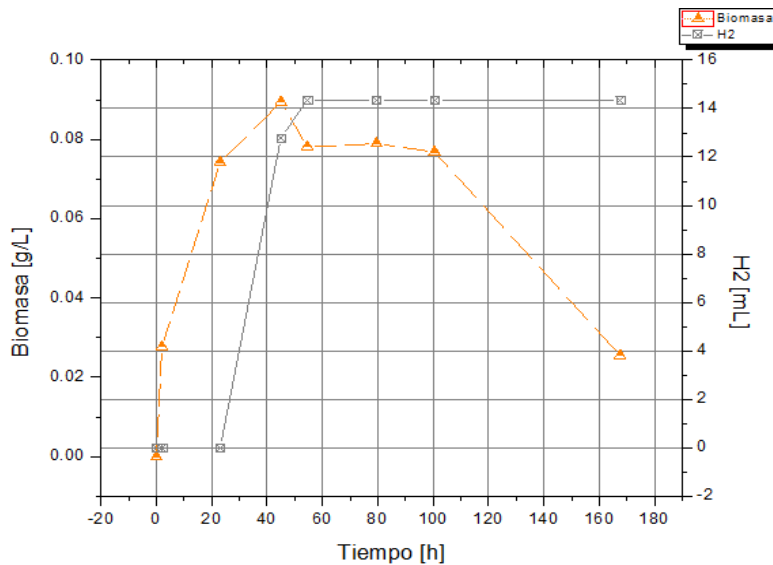
Figura_ 6. Cinética de lactosa.

La cinética de fermentación oscura con lactosuero como sustrato se observa en la Figura_ 7, donde se observa que al igual que en la cinética con lactosa, posterior a las 42 h empezó la producción de BioH_2 ya que el inóculo se adaptó rápidamente al medio y empezó a producir hasta 240.02 mL de BioH_2 , que hasta el momento ha sido el sustrato que se ha acercado a los 270 mL reportados por (Hallenbeck & Benemann, 2002; Nath & Das, 2004). Por lo que las condiciones en las que se encontraba el inóculo fueron aptas para la producción de BioH_2 .



Figura_ 7. Cinética de lactosuero.

En la cinética de 100% RSO que se muestra en la Figura_ 8, podemos observar que debido a que el medio en las primeras 42 h tenía un pH de 5.8 y que después de la degradación de la fuente de carbono, la producción de ácidos grasos fue mayor, por lo que causó la muerte de varias poblaciones de bacterias, y que sólo se obtuviera un volumen máximo de 14.34 mL de BioH_2 .



Figura_ 8. Cinética de 100% RSO.

4.1.1.2 Evaluación de la población del consorcio CJ en cinéticas de fermentación oscura para la producción de BioH₂ en diferentes fuentes de carbono.

Posterior a las 120 h de la fermentación oscura se tomaron las muestras para la secuenciación de ADN del consorcio CJ. En este caso, se realizaron tres experimentaciones. En primero que se presenta es en medio de cultivo con sustrato modelo, es decir, lactosa y de forma anaerobia con un pH inicial de 5.8, y como se mencionó anteriormente, no se reguló el pH en toda la cinética. El segundo experimento fue con 100% residuos sólidos orgánicos, en un sistema anaerobio y con un pH de 5.8. El tercer experimento fue con 30 g de lactosuero en polvo diluido en 1 L de agua destilada con un pH inicial de 5.8 de forma anaerobia. La lactosa, lactosuero y los residuos sólidos orgánicos fueron usados como fuente de carbono para la producción de BioH₂.

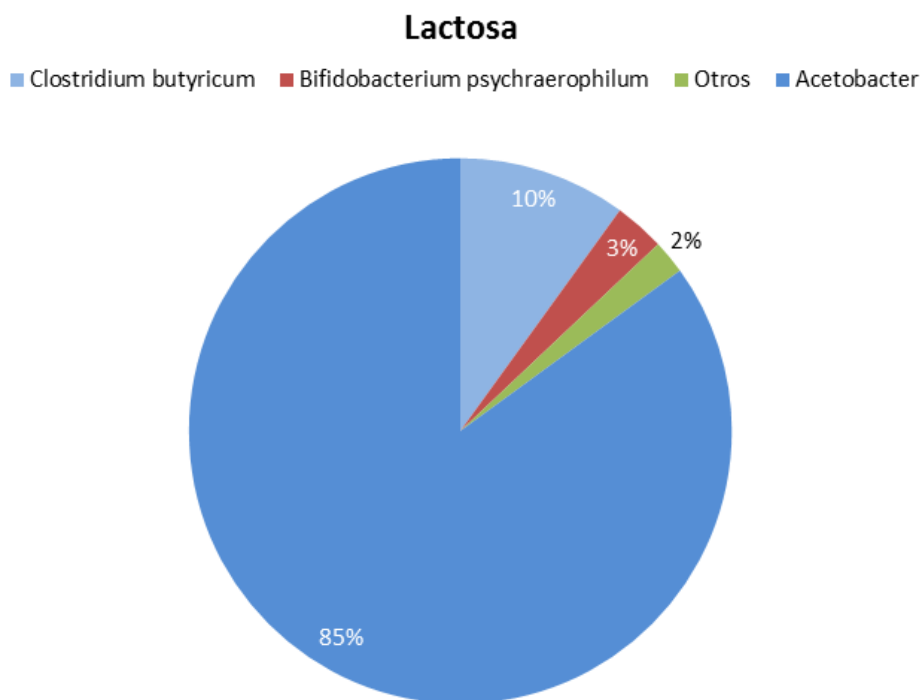
La secuenciación del consorcio CJ a cabo de los 5 días de producción en un medio de lactosa, se puede observar en la Figura_ 9 que la población bacteriana predominante es *Acetobacter* con un 85%, esto se puede ver que como reporta König H., 2009, en particular *Acetobacter lovaniensis*, se caracteriza por ser estrictamente aeróbico, aunque puede sobrevivir durante algún tiempo de forma anaerobia y producir la lactosa en ácidos grasos volátiles como el ácido acético y acetato de etilo, los cuales se podrían usar en el acoplamiento con a fotofermentación.

Como segunda población bacteriana presente es *Clostridium butyricum* con un 10%, y como se reporta que es una bacteria anaerobia que fermenta la lactosa y produce ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono y BioH₂.

Y *Bifidobacterium psychraerophilum* se encuentra en un 3%, también degrada el azúcar, como la glucosa o lactosa produciendo a través de la fermentación acetato y lactato, ácidos grasos volátiles que de igual forma pueden ser utilizados como medio para las fotobacterias.

Como reportan Nath & Das, 2009 tanto *Clostridium* como *Bifidobacterium* son la que con mayor frecuencia están presentes en la fermentación oscura en forma de simbiosis en la producción de BioH₂.

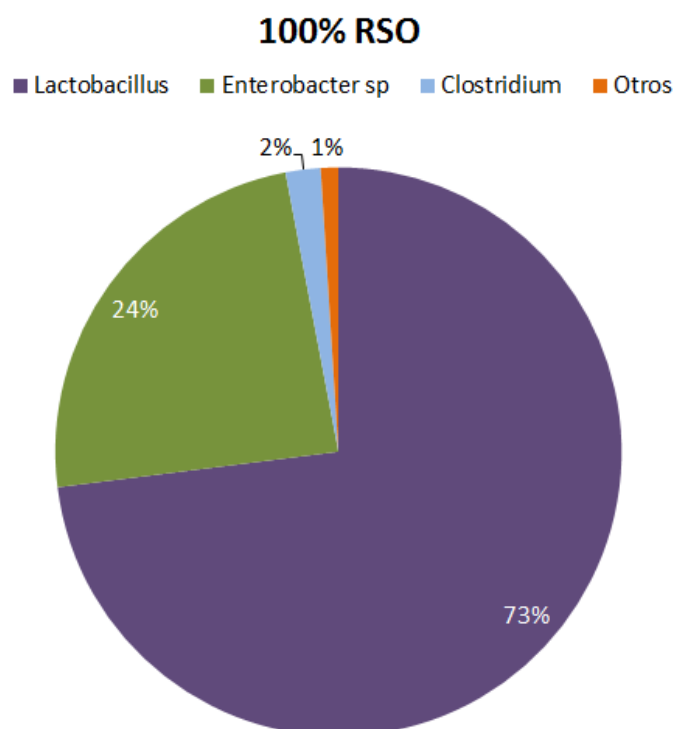
Como también se puede observar la población inicial presente en la Figura_ 9, puede deberse a las condiciones finales en la que se encontraba al cabo de las 120 h, a pesar de que fuera el mismo medio que se manejó del consorcio CJ.



Figura_ 9. Población encontrada por pirosecuenciación del inóculo CJ en sustrato modelo a 30 g/L de lactosa.

La secuenciación del consorcio CJ en un medio de cultivo de 100% de RSO, como se puede observar en la Figura_ 10, el 73% de la población microbiana presente corresponde a Lactobacillus, esto se debe a que se llega a encontrar en las plantas, y al estar en un medio ácido, favorece la predominancia de este tipo de bacterias.

Como segunda población predominante se encuentra *Enterobater*, que se sabe que es productora de BioH₂ y que degrada la fuente de carbono hasta producir ácido láctico.

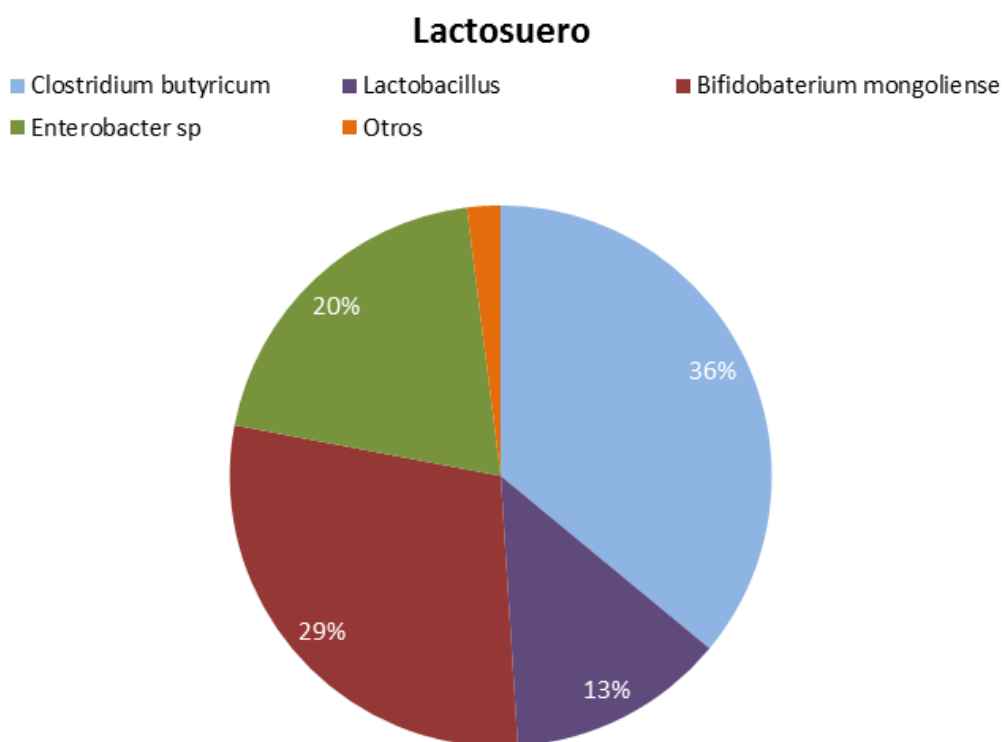


Figura_ 10. Población microbiana presente del consorcio CJ en medio de cultivo de 100% residuos sólidos orgánicos en la producción de BioH₂.

En la Figura_ 11 podemos observar que existe un equilibrio entre las poblaciones microbianas entre las que degradan la fuente de carbono haciéndolo más simple y otras poblaciones con las que hacen simbiosis y aprovechan los productos de otras bacterias para producir BioH₂.

Entre las que se encuentran son: *Clostridium* con un 36%, *Enterobacter* en un 20% y *Bifidobacterium* en un 29%, mostrándose así un total de 85% de bacterias productoras de bioH₂, mientras que el 13% corresponde a *Lactobacillus*, que convierte la glucosa en azúcares más simples y que pueden ser aprovechadas por las bacterias productoras de bioH₂.

Otra posible razón es como lo menciona Gomez-Romero et al., 2014 , la co-digestión es una sinergia positiva donde existe un equilibrio entre el carbono y el nitrógeno, lo que permite aumentar la capacidad de un efecto buffer en el sistema, reduciendo así los efectos inhibitorios y aumenta la producción de BioH₂.



Figura_ 11. Población microbiana del consorcio CJ presente en el lactosuero en la producción de BioH₂.

4.1.2 Fotofermentación

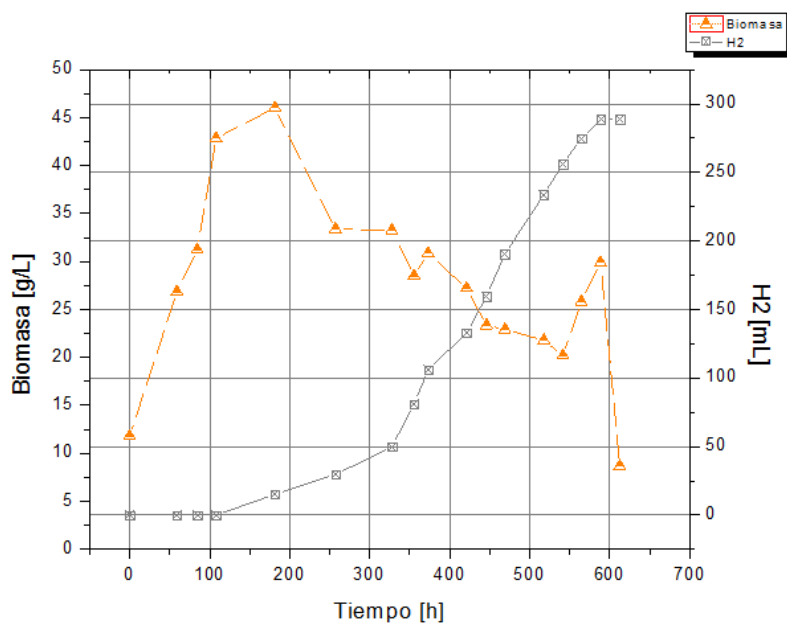
4.1.2.1 Cinética de producción de BioH₂ a partir del consorcio C2 en la fotofermentación.

Como se puede observar en la Figura_ 12, se muestra la cinética de crecimiento y producción de BioH₂.

En las primeras 108 h, el inóculo permanece en medio de crecimiento, razón por la que no se muestra producción de BioH₂. Después de este tiempo, el inóculo se pasó a medio de producción en las mismas condiciones ambientales. Y se observa como a las 140 h de haber cambiado el medio, se genera una muerte celular, sin embargo, las células más aptas logran producir BioH₂ hasta 288.9 mL de BioH₂. Debido a la gran presencia de poblaciones productoras de BioH₂ y por el medio de cultivo son sustrato modelo de 2 g/L de acetato.

Tabla_ 6. Comparación de poblaciones productoras y volumen de BioH₂ acumulado.

	Población productora (%)	Volumen de BioH ₂ acumulado (mL)
CJ	86.71	-
Lactosa	13	75
Lactosuero	85	240
100% RSO	26	14.34



Figura_ 12. Cinética de crecimiento y producción de BioH₂.

4.1.2.2 Evaluación de la población del consorcio C2 en cinéticas de fotofermentación para la producción de BioH₂ con 2 g/L de Acetato.

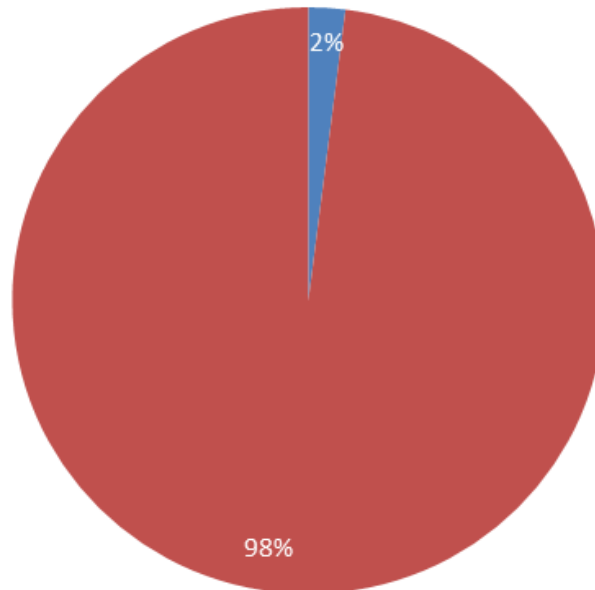
En la fotofermentación se realizó la secuenciación del consorcio C2 que se muestra en la Figura_ 13, el cual inicialmente se encontraba en medio de cultivo de crecimiento modelo que se muestra en la tabla 3, con 2 g/L de acetato, que en presencia de amonio y levadura se favorece el crecimiento de las células y por tanto de la biomasa.

Como se puede observar, el consorcio inicial que se encuentra en la Figura_ 5 comparado con la población de la Figura_ 13, se ve modificada, ya que el inóculo inicial siempre se mantuvo como inóculo y en ningún momento se pasó a medio de producción y se puede esperar que la población con mayor predominancia sea *Rhodopseudomonas*, ya que le es más fácil utilizar como fuente de carbono al acetato en 2 g/L. A las 95 h de haberse tomado la muestra para la secuenciación, se encontró que el 98% de la población microbiana presente era *Rhodopseudomonas*, donde se puede decir que se tuvo una cepa casi pura y sólo 2 % hasta ese momento no se podían identificar el tipo de microorganismos presentes.

Sin embargo, al pasar de la fase de crecimiento a la fase de producción, como se observa en la Figura_ 14, vemos como influyó la remoción de la fuente de amonio, que dio lugar tanto a la presencia de otras bacterias como son *Desulfovibrio* con un 6%, *Bacteroides* en un 4% y *Dysgonomonas* con un 2%, como a la producción de bioH₂. *Rhodopseudomonas* sigue presente dentro de la población con un 77%, lo que no muestra que la remoción de la fuente de amonio sí afecta al crecimiento de las bacterias presentes, sin embargo, crea una simbiosis con las demás bacterias presentes con las que se puede mejorar la producción de BioH₂.

2 g/L Acetato - Crecimiento

■ Otros ■ Rhodopseudomonas sp

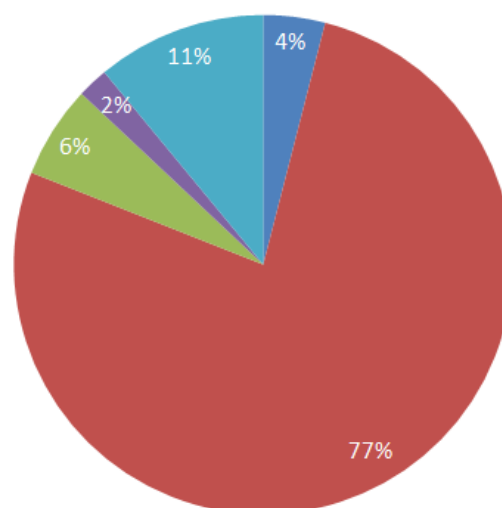


Figura_ 13. Población presente en la fase de crecimiento en la fotofermentación a las 95 h.

Como podemos observar existe un equilibrio entre poblaciones degradadoras de fuentes de carbono como acetato y ácidos grasos (*Dysgonomonas*, *Desulfobvibrio*), y las bacterias productoras de BioH_2 (*Bacteroides*, *Rhodopseudomonas*).

2 g/L Acetato - Producción

■ Bateroides sp ■ Rhodopseudomonas sp ■ Desulfobvibrio
■ Dysgonomonas sp ■ Otros



Figura_ 14. Población presente en la fase de producción en la fotofermentación con 2 g/L de acetato.

Tabla_ 7. Comparación de poblaciones productoras y volumen de BioH₂ acumulado.

	Población productora (%)	Volumen de BioH₂ acumulado (mL)
C2	53	-
Crecimiento	98	-
Producción	83	20.63

4.2 CONCLUSIONES

La población se modificó como una función de la variación de sustratos tanto en la fermentación oscura como en la fotofermentación.

En la fermentación oscura, la mayor productividad de bioH₂ (cantidad máxima) se obtuvo con lactosuero como sustrato. Esto se debió a una población predominante de *Clostridium* con 36%, *Enterobater* con 20% y *Bifidobacterium* con 29% (productoras de H₂).

En la fotofermentación con sustrato modelo y 2 g/L de acetato en fase de crecimiento la población de *Rhodopseudomonas* se incrementó hasta alcanzar un 98%.

Durante la fase de producción en el proceso de la fotofermentación se obtuvo una productividad con la población predominante de *Rhodopseudomonas* (77%), quienes se encuentran reportadas como productoras de BioH₂.

4.3 ANEXOS

4.3.1 Anexo I. Determinación de azúcares reductores mediante el método “Ácido Dinitrisalicílico DNS”

Pasos para preparar el reactivo DNS.

1. Disolver 1.6g de NaOH en agua destilada.
2. Adicionar 30g de tartrato de Na y K.
3. Adicionar 1g de DNS.
4. Aforar a 100 mL con agua destilada.
5. Almacenar en frasco ámbar a 4°C

Preparación de la curva tipo de DNS

1. Preparar una solución stock de glucosa 2 mg/mL y almacenarla a 4°C

2. A partir de la solución de glucosa se preparan las soluciones para hacer la curva patrón con las siguientes concentraciones (g/L): 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2

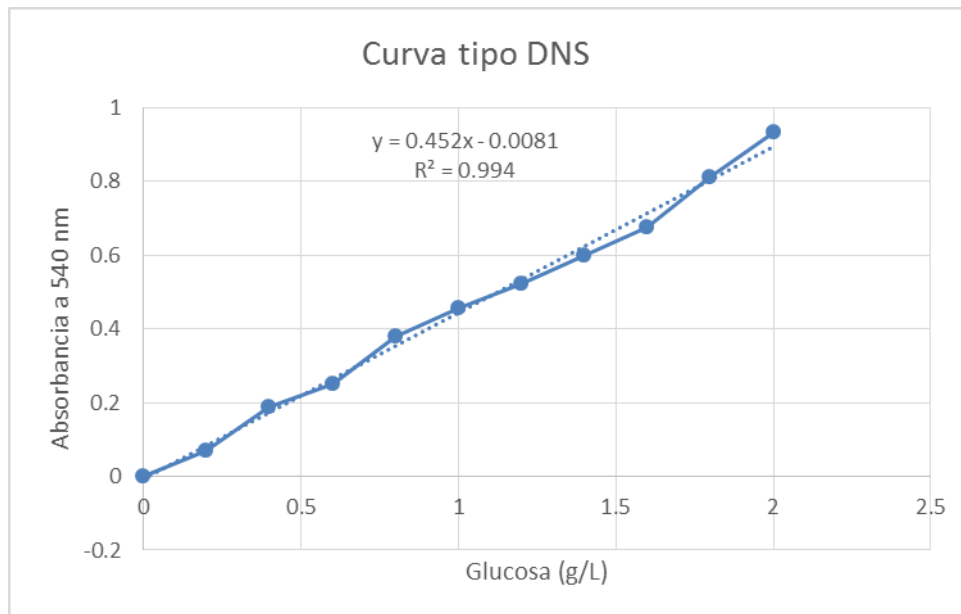
Procedimiento para el análisis

1. Tomar 0.5 mL de cada dilución y agregar 0.5 mL de reactivo DNS.
2. Preparar una muestra blanco por dilución de 0.5 mL de agua destilada a
3. 0.5 mL del reactivo de DNS.
4. Agitar todas las muestras.
5. Colocar a ebullición las muestras en baño maría por 5 minutos.
6. Enfriar con hielo.
7. Adicionar 5 mL de agua destilada.
8. Agitar y dejar reposar 15 minutos.
9. Leer a 540 nm.
10. Graficar absorbancia versus concentración.

Para el análisis de las muestras de este trabajo se realizó y utilizo la siguiente curva tipo.

Tabla_ 8. Valores obtenidos de la curva patrón de la técnica de DNS.

Glucosa (g/l)	Absorbancia
0	0
0.2	0.068
0.4	0.1875
0.6	0.251
0.8	0.379
1	0.456
1.2	0.523
1.4	0.598
1.6	0.674
1.8	0.812
2	0.934



Figura_ 15. Curva patrón para la técnica de DNS.

4.3.2 Anexo II. Determinación de biomasa mediante el método de Bradford

Fundamento del método

Este método involucra la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a la proteína. Esta unión provoca un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595 nm, cuantificando los miligramos de proteína a una absorbancia de 595 nm.

Reactivos

- Azul brillante de Coomassie G-250.
- Etanol al 95%
- Ácido fosfórico.
- Albúmina de suero bovino (BSA).

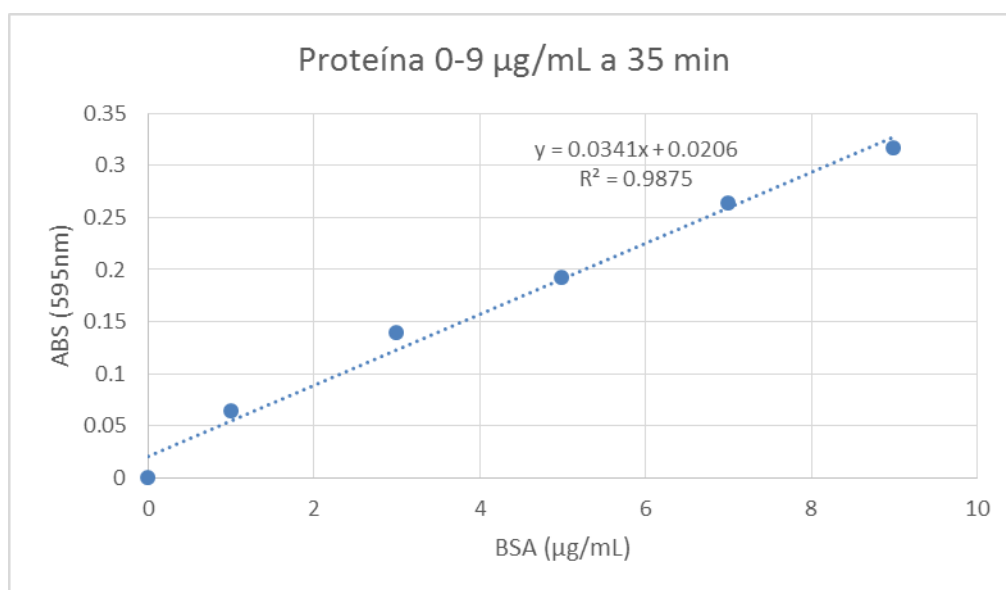
Procedimiento para el diseño de la curva tipo

1. Partiendo de una solución stock de albúmina sérica bovina con concentración de 1mg/ml (BSA-SIGMA), tomar diferentes alícuotas con micropipeta y colocarlas en tubos de 13 x 100 (ver Tabla 19)
2. Graficar la absorbancia obtenida contra los mg/ml que contenía cada una de las alícuotas para obtener una curva patrón.

Para el análisis de las muestras de este trabajo se realizó y utilizó la siguiente curva tipo.

Tabla_ 9. Valores obtenidos de la curva patrón para la técnica de Bradford.

BSA $\mu\text{g/mL}$	Absorbancia a 595 nm
0	0
1	0.064
3	0.139
5	0.189
7	0.266
9	0.318



Figura_ 16. Curva patrón utilizada para la técnica de Bradford.

Procedimiento para el análisis de las muestras

1. Alicuotar en tubos eppendorf 1 ml de muestra.
2. Centrifugar 10 min a 6000 rpm
3. Decantar el sobrenadante a otros tubos y eliminar la pastilla.
4. Adicionar 1 ml de NaOH 0.1 N
5. Centrifugar 10 min a 6000 rpm
6. Adicional 1 ml de reactivo de Bradford
7. Esperar 30 min
8. Leer en espectrofotómetro a 595 nm

4.3.3 Anexo V. Protocolo de extracción de ADN

Primer día. Preparar las soluciones bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), éste reactivo nos ayuda procesar tejidos con alta concentración de polisacáridos y polifenoles así como la eliminación de inhibidores que afectan la PCR, el cloroformo-etanol, el TE, el fenol-cloroformo, el cloruro de sodio, y la solución de lavado.

De la cinética se toma 2 mL de muestra líquida de cada una de las fases de crecimiento de las cinéticas en cada una de las fases de la fermentación (crecimiento, exponencial, estacionaria y muerte celular). Centrifugar a 3400 rpm por 15 minutos, recuperando así la biomasa y desechando el sobrenadante. Se le adicionó 9 mL de CTAB precalentado a 65 °C a las muestras y suavemente se mezcló por inversión hasta homogenizar las muestras. Éste paso sirvió para romper las paredes de las células.

Se incubaron durante 1 hora en baño de agua a 65 °C con agitación constante. Se esperó a que se enfriarán a temperatura ambiente y se le añadió 4.5 mL de cloroformo-etanol en una proporción de 24:1. Se cerraron los tubos y se mezclaron por 10 minutos. Se centrifugaron por 10 minutos a 3200 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa a un tubo nuevo de 15 mL estéril y se le adicionó 4.5 mL de cloroformo-etanol 24:1. Se mezcló suavemente por inversión durante 10 minutos. Se volvió a centrifugar por 10 minutos a 3200 rpm a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió a un tubo estéril de 15 mL y se añadió 6 mL de isopropanol. Se mezcló por inversión por 6 minutos. Se centrifugó a 3200 rpm por 10 minutos y se obtuvo una pastilla blanca en el fondo del tubo. Se le retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de TE y se colocó en un tubo eppendorf estéril y se dejó reposar por 12 horas a 4°C.

Segundo día. Se le añadió 1 mL de fenol-cloroformo 1:1, esto para retirar las sales residuales existentes, y se mezclaron por inversión por 2 minutos y se centrifugaron a 3200 rpm por 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se le añadió cloroformo-etanol 24:1. Se centrifugó la muestra a 3200 rpm por 10 minutos. La fase acuosa se colocó en un tubo estéril. Se precipitó el ADN con 50 µL de NaCl 5 M y después se le añadió etanol absoluto y se mezcló suavemente por inversión. Se centrifugaron a 12,000 rpm por un minuto, esto para precipitar el ADN. Posteriormente se le añadió la solución de lavado de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.0** y por inversión se mezcló durante 20 minutos. Terminado el tiempo se centrifugó a 12,000 rpm por un minuto y se recuperó la pastilla y se decantó el sobrenadante. Finalmente se le añadió 1 mL de TE, esto para conservar lo mejor posible el ADN y se dejó reposar por 12 horas.

Para conocer la concentración del ADN y de la pureza que se tuvo en cada una de las extracciones se usó el Nanodrop 2000 de Thermo Fisher, el cual es un espectrofotómetro que mide la concentración en ng/µL y el grado de purificación del ADN mediante la relación de absorbancias 260/280 el cual, sí se encuentra entre 1.8 y 2, significa que la pureza que se obtuvo es ideal.

Tabla_ 10. Solución de lavado.

Stock	100 mL
NaOH 2.5 M	8 mL
Etanol absoluto	76 mL
Agua MiliQ	16 mL

4.3.4 Anexo VI. Determinación de concentración y pureza del ADN en el Nanodrop 2200.

Tabla_ 11. Resultados obtenidos de la lectura en el Nanodrop 2200 a partir del ADN obtenido.

Etiquetado	Nombre	Concentración (ng/uL)	Pureza (260/280)
2AC1	2 g/L de acetato en fase de crecimiento	168.1	1.26
2AP1	2 g/L de acetato en fase de producción	143.8	1.06
Lac1	Lactosa	1019.1	1.94
LS1	Lactosuero	1,749.4	2
RSO1001	100% residuos sólidos orgánicos	104	1.56

4.4 REFERENCIAS

- Alcalá, L., Betriu, C., & Reig, J. E. G. S. M. (2004). *Bacteria Anaerobias. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 16).
- Basak, N. & Das, D. (2007). The Prospect of Purple Non-Sulfur (PNS) Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production: The Present State of the Art. *World J Microbiol Biotechnol*, 23(31), 31–42. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9190-9>
- Betian, H. G., Linehan, B. a, Bryant, M. P., & Holdeman, L. V. (1977). Isolation of a cellulolytic *Bacteroides* sp. from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(4), 1009–1010.
- Boukhemis, M., Djeghri-hocine, B., Tahar, A., & Amrane, A. (2009). Phenotypic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from different biotopes, 8(19), 5011–5020.
- Brenner, D. J., O'Hara, C. M., Grimont, P. A. D., Janda, J. M., Falsen, E., Aldova, E., ... Steigerwalt, A. G. (1999). Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 10) and *Citrobacter murlinae* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 11). *Journal of Clinical Microbiology*, 37(8), 2619–2624.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01222-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01222-6)
- Chavez, D. C. P. (2008). *Aislamiento Y Caracterizacion Bioquimica Y Morfológica De Bacterias Reductoras De Sulfato (Brs) Provenientes De Aguas De Producción De Un Campo Petrolero*.
- Daday, A., Platz, R. A., & Smith, G. D. (1977). Anaerobic and aerobic hydrogen gas formation by the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(5), 478–483.
- Das, D. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1), 13–28. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00058-6)
- 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>
- Devereux, R., Delaney, M., Widdel, F., & Stahl, D. A. (1989). Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6689–6695.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trabaly, 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>

- Gomez-Romero, J., Gonzalez-Garcia, A., Chairez, I., Torres, L., & García-Peña, E. I. (2014). Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(24), 12541–12550. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.050>
- Hallenbeck, P. C. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27(5), 287–297.
- Hallenbeck, P. C., & Benemann, J. R. (2002). Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 27, pp. 1185–1193). [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00131-3)
- Hochstein, N., Honsel, D., Kappmeier, C., Rütjes, T., Andreou, I., Kreutz, M., ... Strasse, Q. (2010). Pyrosequencing ® and its applications Sample & Assay Technologies. Retrieved from <https://icmb.utexas.edu/images/ICMB/Facilities/Pyrosequencing-and-its-applications.pdf>
- Holt, J. H., Krieg, N. R., Sneath, P. H. a., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology ninth edition. *European Journal of Paediatric Neurology : EJPN : Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 13(6), 560. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2008.10.006>
- Hung, C. H., Chang, Y. T., & Chang, Y. J. (2011). Roles of microorganisms other than Clostridium and Enterobacter in anaerobic fermentative biohydrogen production systems - A review. *Bioresource Technology*, 102(18), 8437–8444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.084>
- J., B. (1993). *Bifidobacteria and probiotic action*. Salminen S & von Wright A.
- Janda, J. M., Abbott, S. L., Cheung, W. K. W., & Hanson, D. F. (1994). Biochemical identification of citrobacteria in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8), 1850–1854.
- Juan Liu, Yang Liu, Naiyun Liu, Yuzhi Han, Xing Zhang, Hui Huang, Yeshayahu Lifshitz, Shuit-Tong Le, Jun Zhong, Z. K. (2015). Metal-free efficient photocatalyst for stable visible water splitting via a two-electron pathway. *Science*, 347(6225), 970–974. Retrieved from [10.1126/science.aaa3145](https://doi.org/10.1126/science.aaa3145)
- Kapdan. I.K., K. F. (2006). Bio-hydrogen production from waste materials. *EL SEVIER*, 38(5), 569–582. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.015>
- König H., G. U. and J. F. (2009). Biology of Microorganisms on Grapes, in Must, and in Wine. Retrieved from http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria/acetobacter_lovaniensis.html
- Laue, H., Friedrich, M., Ruff, J., & Cook, A. M. (2001). Dissimilatory sulfite reductase (Desulfoviridin) of the taurine-degrading, non-sulfate-reducing bacterium *Bilophila wadsworthia* RZATAU contains a fused DsrB-DsrD subunit. *Journal of Bacteriology*, 183(5), 1727–1733. <https://doi.org/10.1128/JB.183.5.1727-1733.2001>
- Legall, J., Whitman, W. B., Devereux, R., He, S., Doyle, C. L., Orkland, S., & Stahl, D. A. (1990). Diversity and Origin of *Desulfovibrio* Species – Phylogenetic Definition of a Family Diversity

and Origin of *Desulfovibrio* Species : Phylogenetic Definition of a Family. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3609–3019.

- León M. T. S., D. R. D. . T. H. O. . M. E. M. (2014). Caracterización de los residuos de la cosecha de la caña de azúcar almacenados a granel. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 48(1), 65–70. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223131337010.pdf>
- Li, C., & Fang, H. H. P. (2007). Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(1), 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>
- Lu, L., Xing, D., Ren, N., & Logan, B. E. (2012). Syntrophic interactions drive the hydrogen production from glucose at low temperature in microbial electrolysis cells. *Bioresource Technology*, 124, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.040>
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2008). The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34(2), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.001>
- Maria L. Ghirardi, Liping Zhang, James W. Lee, Timothy Flynn, Michael Seibert, Elias Greenbaum, A. M. (2000). Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*, 18(12), 506–511. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01511-0](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01511-0)
- Nath, K., & Das, D. (2004). Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1644-0>
- Nath, K., & Das, D. (2009). Effect of light intensity and initial pH during hydrogen production by an integrated dark and photofermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7497–7501. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.065>
- Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, Smirnova T, Grigoriev IV, D. I. (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. Retrieved December 3, 2016, from <http://genome.jgi.doe.gov/rhopa/rhopa.home.html>
- Paradis, S., Boissinot, M., Paquette, N. D., Be´ Langer, D., Martel, E., Boudreau, D., Picard, F., Ouellette, M., Roy, P., y Bergeron, M. (2005). Phylogeny of the enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase b-subunit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2013–2025.
- Peiris, B. R. H., Rathnasiri, P. G., Johansen, J. E., Kuhn, A., & Bakke, R. (2006). ADM1 simulations of hydrogen production. *Water Science and Technology*, 53(8), 129–137. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.243>
- Puerta Quintero, G. I. (2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Avances Técnicos Cenicafé*, 402, 8–10. Retrieved from <http://www.cenicafe.org/es/publications/avt0402.pdf>
- Residuos sólidos urbanos. Municipios y delegaciones con tratamiento a residuos orgánicos según cantidad por entidad federativa. (2014). Retrieved from

<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=mamb1170&s=est&c=35614>

Robert, C., Chassard, C., Lawson, P. A., & Bernalier-Donadille, A. (2007). *Bacteroides cellulolyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1516–1520.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64998-0>

Sánchez, G. G. S. (2016). Evolución microbiana de consorcios fototróficos durante la producción de Hidrógeno y polihidroxibutiratos (PHB).

Singhania, R. R., Patel, A. K., Christophe, G., Fontanille, P., & Larroche, C. (2013). Biological upgrading of volatile fatty acids, key intermediates for the valorization of biowaste through dark anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*, 145, 166–174.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.137>

Sklarz, M. Y., Angel, R., Gillor, O., & Soares, M. I. M. (2009). Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 96(4), 659–664.
<https://doi.org/10.1007/s10482-009-9380-1>

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

Warren, Y. A., Citron, D. M., Merriam, C. V., & Goldstein, E. J. C. (2005). Biochemical differentiation and comparison of *Desulfovibrio* species and other phenotypically similar genera. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4041–4045.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4041-4045.2005>

Yu, J., & Takahashi, P. (2007). Biophotolysis-based Hydrogen Production by Cyanobacteria and Green Microalgae. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1, 79–89.