



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
AMBIENTAL

**“EFECTO DE LA BIOAUMENTACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
HIDRÓGENO A PARTIR DE RESIDUOS DE ALIMENTOS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:

BLANCA EDITH VILLANUEVA GALINDO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE INGENIERÍA

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
AMBIENTAL**

**“EFECTO DE LA BIOAUMENTACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE
HIDRÓGENO A PARTIR DE RESIDUOS DE ALIMENTOS”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

PRESENTA:

BLANCA EDITH VILLANUEVA GALINDO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. IVÁN MORENO ANDRADE, INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR:

**DR. SIMÓN GONZÁLEZ MARTÍNEZ, INSTITUTO DE INGENIERÍA
DR. CHRISTIAN EDUARDO HERNÁNDEZ MENDOZA, CONACYT – UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2020.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Julián Carrillo Reyes
Secretario: Dr. Simón González Martínez
1er vocal: Dr. Carlos Alberto Quintal Franco
2do vocal: Dr. Christian Eduardo Hernández Mendoza
3er vocal: Dr. Iván Moreno Andrade

LUGAR O LUGARES DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas de la Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México.

TUTOR DE TESIS

Dr. Iván Moreno Andrade

FIRMA



**INSTITUTO
DE INGENIERÍA
UNAM**

LIPATA

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN
EN PROCESOS AVANZADOS DE
TRATAMIENTO DE AGUAS

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas (LIPATA) de la Unidad Académica Juriquilla del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio del proyecto 240087.

Así mismo, se agradece al “Fondo de Sustentabilidad Energética SENER_CONACYT” por el apoyo recibido a través del proyecto 247006 – Clúster de Biocombustibles Gaseosos

Finalmente, se reconoce el apoyo del CONACYT mediante la beca otorgada para realizar los estudios de maestría y a la Universidad Nacional Autónoma de México por las facilidades y atenciones recibidas durante el posgrado.

Lograríamos más cosas si no pensáramos en ellas como imposibles.

Vince Lombardi

Eres tan fuerte como pienses que puedes serlo.

Melissa Benoist

DEDICATORIA

A mi madre, Sonia Edith.

A mis abuelas, Blanca María y Emelina[†].

Por ser grandes ejemplos de vida, mujeres dignas de respeto y admiración.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco primeramente a Dios, por prestarme vida y darme fortaleza para concretar este sueño.

A mi madre, por todo su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi vida. No hay palabras para expresar mi agradecimiento y admiración hacia ti.

A mi familia de Ciudad de México, don Arturo, doña Vicky y Leslie, por todo su apoyo y cariño hacia mi persona.

A mi tío Sergio, por siempre animarme a crecer tanto en el ámbito personal como profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Ingeniería, por abrirme las puertas y proporcionarme lo necesario para mi formación académica. Es un orgullo haber pertenecido a tan prestigiosa casa de estudios.

A mi director de tesis, el Dr. Iván Moreno Andrade, por confiar en mí para la realización de este proyecto, por sus valiosos consejos y su genuino interés en mi desarrollo profesional y personal.

Al Dr. Christian Hernández Mendoza y al Dr. Simón Gonzalez Martínez, por su valiosa asesoría y el tiempo dedicado con el fin de mejorar la presente tesis. De igual forma, al Dr. Julián Carrillo Reyes y al Dr. Carlos Quintal Franco, por su amable disposición y contribución como miembros del jurado.

Al M. en B. Jaime Pérez y a la M. en C. Gloria Moreno, por su orientación y apoyo en la realización de las actividades de laboratorio y al Lic. Ángel Avízua Hernández Huerta por su apoyo técnico.

A mis compañeros de la maestría, por hacer más ameno y divertido mi estancia en el LIPATA.

A Yeinner Tarazona, por dedicar su tiempo a enseñarme y compartirme lo necesario para iniciar este proyecto.

A Diana Tenorio y Martín Barragán, por su cariño, apoyo y sus valiosas enseñanzas en laboratorio cuando más lo necesité.

A Manuel Canto, por ser mi mentor en la parte experimental y análisis de mi tesis. Agradezco de corazón por toda tu paciencia y el tiempo dedicado.

A mis amigas, Ange, Fátima e Ygda, por su genuina amistad que ha trascendido la distancia.

A Dani, por todas tus atenciones y tu cariño sincero. Por estar para mí.

A todas las personas que hicieron posible concretar este logro.

Gracias.



ÍNDICE GENERAL

Resumen	16
Abstract	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
2. MARCO TEÓRICO	19
2.1 Definición de residuos de alimentos (RA).....	19
2.2 Situación actual de los RA en América del Norte	19
2.3 Efectos ambientales y socioeconómicos de los RA.....	21
2.2 Fundamentos de la DA	22
2.2.1 Procesos biológicos de la DA.....	22
2.2.1.1 Hidrólisis	23
2.2.1.2 Bacterias hidrolíticas (Grupo I).....	23
2.2.1.3 Fermentación o Acidogénesis.....	25
2.2.1.4 Bacterias fermentativas (Grupo I)	25
2.2.1.5 Acetogénesis.....	26
2.2.1.6 Bacterias acetogénicas (Grupo II)	27
2.2.1.7 Metanogénesis	28
2.2.1.8 Bacterias metanogénicas (Grupo III).....	28
2.3 Rutas metabólicas descritas en la producción de H ₂ durante la FO	29
2.3.1 Ruta PFL.....	30
2.3.2 Ruta PFOR	31
2.4 Grupos microbianos productores de H ₂ durante la FO	31
2.4.1 Anaerobios obligados formadores de esporas	31
2.4.2 Anaerobios obligados no formadores de esporas	33
2.4.2 Anaerobios facultativos fermentativos	33
2.5 Interacciones microbianas en sistemas de producción de H ₂	34
2.5.1 Interacciones positivas	34
2.5.1 Interacciones negativas.....	36
2.5.1.1 Consumo de H ₂	36
2.5.1.2 Competencia e inhibición de las HPB	36
2.5 Parámetros fisicoquímicos que influyen en la FO	37
2.5.1 pH y alcalinidad.....	37



2.4.2 Tamaño de partícula	38
2.4.3 Composición del sustrato	39
2.4.4 Nutrientes	39
2.4.5 Presión parcial de H ₂	40
2.5 <i>Parámetros operacionales que influyen en la FO</i>	41
2.5.1 Temperatura.....	41
2.5.2 Agitación	42
2.5.3 Tiempo de retención hidráulico.....	42
2.5.4 Tiempo de retención de sólidos.....	43
2.5.5 Carga Orgánica.....	44
2.6 <i>Configuración de reactores y modo de operación empleados en la producción de H₂</i>	44
2.6.1 Reactor CSTR.....	45
2.6.2 Reactor de membranas	45
2.6.3 Reactor anaerobio de flujo ascendente	45
2.6.4 Reactor de lecho fluidizado	46
2.6.5 Reactor anaerobio discontinuo secuencial (ASBR).....	46
2.7 <i>Bioaumentación</i>	47
2.7.1 Fallas en la bioaumentación	48
3. ANTECEDENTES	50
4. JUSTIFICACIÓN.....	52
5. OBJETIVOS.....	53
5.1 <i>Objetivo General</i>	53
5.2 <i>Objetivos Particulares</i>	53
6. ALCANCES	53
7. METAS	53
8. METODOLOGÍA	54
8.1 <i>Etapa 1. Evaluación de la bioaumentación de cepas puras en la producción de H₂</i>	55
8.1.1 Crecimiento de cepas puras	55
8.1.2 Obtención y caracterización del sustrato	56
8.1.3 Preparación del inóculo	57
8.1.4 Pruebas de potencial bioquímico de H ₂ (PBH)	57
8.1.4.1 Determinación de parámetros cinéticos.....	59



8.2 Etapa 2. Bioaumentación en un reactor ASBR.....	60
8.2.1 Arranque del ASBR.....	60
8.2.2 Bioaumentación.....	61
8.2.3 Caracterización de muestras.....	61
8.3 Métodos Analíticos.....	61
8.3.1 Balance de masa.....	63
9. RESULTADOS.....	64
9.1 Etapa 1. Evaluación de la bioaumentación de cepas puras en la producción de H ₂ a partir de RA.....	64
9.1.1 Análisis estadístico.....	67
9.1.1 Determinación de parámetros cinéticos.....	69
9.2 Etapa 2. Bioaumentación en un reactor ASBR.....	76
9.2.1 Desempeño del reactor ASBR.....	76
9.2.2 Análisis estadístico del desempeño del reactor.....	78
9.2.3 Balance de masa del reactor.....	79
9.2.4 Análisis de la comunidad microbiana.....	80
10. CONCLUSIONES.....	82
11. RECOMENDACIONES.....	83
12. PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTA TESIS.....	83
13. BIBLIOGRAFÍA.....	84
14. ANEXOS.....	94



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimaciones de RA en la cadena de abasto alimentaria de América del Norte, por país.	20
Figura 2. Estimaciones de RA, per cápita, en la cadena de abasto alimentaria de América del Norte.	20
Figura 3. Esquema General de la DA de la materia orgánica.	22
Figura 4. Vías metabólicas implicadas en la producción de H ₂ durante la FO.	32
Figura 5. Etapas de operación de un ASBR.	47
Figura 6. Esquema metodológico.	54
Figura 7. Cultivo de cepas puras para su uso en los ensayos.	56
Figura 8. Montaje experimental de la Prueba de Potencial Bioquímico de H ₂ : a) Baño regulador de temperatura, b) Reactores con agitación, c) Trampa de CO ₂ con solución alcalina y d) Sistema de medición de volumen de biogás.	57
Figura 9. Curva de crecimiento bacteriano.	59
Figura 10. Reactor ASBR para la producción de H ₂	60
Figura 11. Volumen de H ₂ producido por la cepa <i>Paenibacillus polymyxa</i>	64
Figura 12. Volumen de H ₂ producido por la cepa <i>Bacillus subtilis</i>	65
Figura 13. Volumen de H ₂ producido por la cepa <i>Clostridium saccharobutylicum</i>	65
Figura 14. Volumen de H ₂ producido por la cepa <i>Clostridium beijerinckii</i>	66
Figura 15. Gráfica de medias de la comparación múltiple correspondiente al volumen acumulado de H ₂ de los ensayos en lote.	69
Figura 16. Porcentaje de producción de AGV (mg/L) en las bioaumentaciones evaluadas.	73
Figura 17. Degradación de carbohidratos en las bioaumentaciones evaluadas.	73
Figura 18. Volumen y composición de biogás producido durante la operación del reactor ASBR.	76
Figura 19. Rendimiento de H ₂ durante la operación del reactor ASBR.	77
Figura 20. Porcentajes de remoción durante la operación del reactor ASBR.	77
Figura 21. Clasificación taxonómica a nivel de género de los microorganismos presentes en la operación del reactor ASBR, inóculo y sustrato empleados.	81



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos ambientales y socioeconómicos de los RA.	21
Tabla 2. Especies de bacterias hidrolíticas en la DA.	24
Tabla 3. Especies de bacterias acidogénicas en la DA.	26
Tabla 4. Especies de bacterias acetogénicas en la DA.	27
Tabla 5. Especies de arqueas metanogénicas en la DA.	29
Tabla 6. Reacciones de producción y consumo de H ₂ en procesos anaerobios.	30
Tabla 7. Anaerobios obligados no formadores de esporas reportados en la producción de H ₂	33
Tabla 8. Anaerobios facultativos reportados en la producción de H ₂	34
Tabla 9. Interacciones que favorecen la producción de H ₂	34
Tabla 10. Microorganismos y sus contribuciones positivas en la producción de H ₂	35
Tabla 11. Microorganismos afectan la producción de H ₂ a través de su consumo.	36
Tabla 12. Microorganismos que afectan la producción de H ₂ por competencia e inhibición de las HPB.	37
Tabla 13. Valores de pH óptimo de crecimiento para microorganismos hidrolíticos y fermentativos.	38
Tabla 14. Cantidad de macronutrientes necesaria en reactores anaerobios.	40
Tabla 15. Influencia de iones metálicos en la producción de H ₂	40
Tabla 16. Temperaturas de crecimiento para bacterias y arqueas que participan en la DA.	41
Tabla 17. Fallas presentadas durante la bioaumentación en la producción de H ₂	49
Tabla 18. Efecto de la bioaumentación de diferentes cepas microbianas en la producción de H ₂	51
Tabla 19. Condiciones de cultivo para cepas puras de acuerdo al ATCC.	56
Tabla 20. Configuración de ensayos en lote.	58
Tabla 21. Métodos analíticos.	61
Tabla 22. Determinación de microorganismos presentes en las bioaumentaciones empleadas.	62
Tabla 23. Análisis de varianza del efecto de la bioaumentación.	68
Tabla 24. Análisis de diferencia mínima significativa de los diferentes tratamientos empleados sobre la producción de H ₂	68
Tabla 25. Resultados del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Gompertz.	70
Tabla 26. Valores de H _{max} obtenidos en ensayos en lote empleando la bioaumentación de diferentes cepas microbianas en ensayos en lote a 37 °C.	71
Tabla 27. Comparación del PBH obtenido en los tratamientos evaluados en los ensayos en lote con respecto al valor teórico.	74
Tabla 28. Comparación de diferentes estrategias aplicadas en ensayos en lote para la mejora de la producción de H ₂	75
Tabla 29. Comparación de los resultados obtenidos en el reactor durante su desempeño.	78
Tabla 30. Producción de AGV obtenidos durante la operación del reactor.	78
Tabla 31. Balance de masa de la operación del reactor.	79



Tabla 32. Caracterización del sustrato.	94
Tabla 33. Configuración de ensayos en lote de la bioaumentación con la cepa <i>Paenibacillus polymyxa</i>	95
Tabla 34. Configuración de ensayos en lote de la bioaumentación con la cepa <i>Bacillus subtilis</i>	96
Tabla 35. Configuración de ensayos en lote de la bioaumentación con la cepa <i>C. saccharobutylicum</i>	97
Tabla 36. Configuración de ensayos en lote de la bioaumentación con la cepa <i>C. beijerinckii</i>	98
Tabla 37. Configuración de ensayos en lote.	99



GLOSARIO DE TÉRMINOS Y SIGLAS

ASBR	Reactor anaerobio discontinuo secuencial
AGV	Ácidos grasos volátiles
CH₄	Metano
CO₂	Dióxido de carbono
CO	Carga orgánica
CSTR	Continuos stirred tank reactor (Reactor continuo de tanque agitado)
DA	Digestión anaerobia
DO	Densidad óptica
DQO	Demanda química de oxígeno
FBR	Reactor de lecho fluidizado
FO	Fermentación oscura
FORSM	Fracción orgánica de residuos sólidos municipales
GEI	Gases de efecto invernadero
HPB	Bacterias productoras de H ₂
H_{max}	Cantidad máxima de H ₂ producido
H₂	Hidrógeno
LAB	Lactic acid bacteria (Bacteria ácido láctica)
MBR	Reactro de membrana
OHPA	Acetógenos productores obligados de H ₂
O₂	Oxígeno
PBH	Potencial bioquímico de H ₂
PFR	Plug Flow Reactor (Reactor flujo pistón)
PO₄⁻³	Ortofosfato
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
Q_{H2}	Productividad volumétrica de H ₂
RA	Residuos de alimentos
R_{max}	Tasa de producción de H ₂
RP	Residuos de plátano



ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
TRH	Tiempo de retención hidráulico
TRS	Tiempo de retención de sólidos
UASB	Reactor anaerobio de flujo ascendente
Y_{H_2}	Rendimiento de producción de H_2
λ	Tiempo antes de la producción exponencial de H_2



Resumen

La necesidad de energías alternativas se enfoca no únicamente a la reducción de la dependencia de los combustibles fósiles sino también como medida para paliar los efectos del cambio climático ocasionado por las actividades humanas (Cabrol *et al.*, 2017). Por lo anterior, una alternativa que resulta interesante es el hidrógeno (H_2), el cual es ampliamente conocido por ser una fuente de energía no contaminante (Karthikeyan *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2019). En comparación con otros métodos de producción de H_2 , la fermentación oscura ha recibido mucho interés debido a la posibilidad de emplear una amplia variedad de materia orgánica, la cual es convertida en H_2 con una alta productividad (Kleerebezem & van Loosdrecht, 2007). No obstante, la eficiencia en la producción de H_2 depende de factores cruciales como las condiciones operacionales y la comunidad microbiana (Wong *et al.*, 2014). Para incrementar la producción de H_2 y su rendimiento, se han aplicado diversos métodos, uno de ellos es la bioaumentación, la cual consiste en agregar una o más cepas deseadas a la comunidad nativa para mejorar la degradación del sustrato o soportar fluctuaciones del proceso (Venkata *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dos cepas hidrolíticas (*Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus subtilis*) y dos fermentativas (*Clostridium saccharobutylicum* y *Clostridium. beijerinckii*) en la producción de H_2 durante la fermentación oscura en ensayos en lote, los cuales se llevaron a cabo empleando residuos de alimentos (RA) como sustrato, lodo anaerobio tratado térmicamente como inóculo y diferentes concentraciones de los microorganismos evaluados (1x, 2x, 3x y 4x). La bioaumentación con *B. subtilis* 4x mostró el mejor desempeño, obteniendo un rendimiento (Y_{H_2}) de 2.9 veces más con respecto a los ensayos sin bioaumentar (control), así como un aumento en la producción de butirato (485% más) y una reducción significativa de la fase de latencia (de 7.9 h a 3.5 h). Por otro lado, la bioaumentación de *C. saccharobutylicum* 4x mostró un efecto antagónico al obtener un Y_{H_2} inferior (-19.5%) con respecto al control y una mínima reducción de la fase lag (de 7.9 h a 6.7 h).

Finalmente, se llevó a cabo la operación de un reactor ASBR, con un volumen de trabajo de 1 L, en el que se aplicó la bioaumentación de *B. subtilis* 4x, obteniéndose un efecto significativo ($p < 0.05$) en la productividad volumétrica (Q_{H_2}), registrando un aumento de 22.2 $mLH_2/L_{reactor}/d$ a 59.3 $mLH_2/L_{reactor}/d$, con respecto a su operación sin la adición de microorganismos, así como también un incremento en el Y_{H_2} (de 4.4 mLH_2/gSV a 11.8 mLH_2/gSV). El análisis de la comunidad microbiana presente durante la bioaumentación mostró un dominio importante en la abundancia de bacterias ácido-lácticas (LAB) como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, cuya actividad metabólica fue determinante en el desempeño del reactor, permitiendo inferir una relación sinérgica con el microorganismo añadido. Cabe mencionar, si bien la bioaumentación de *B. subtilis* mejoró la producción de H_2 en el sistema, su efecto no es permanente (observado en la disminución de la Q_{H_2} de 98.6 $mLH_2/L_{reactor}/d$ a 45.4 $mLH_2/L_{reactor}/d$), requiriendo eventualmente la adición de más microorganismos.



Abstract

The need for alternative energies is focused not only to reduce the dependence on fossil fuels but also to mitigate climate change due to human activities (Cabrol *et al.*, 2017). Therefore, an interesting alternative is hydrogen (H_2), which is widely known as a non-polluting energy source (Karthikeyan *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2019). Compared to other hydrogen production methods, dark fermentation has received much interest due to the possibility of using a wide variety of organic matter, which is converted to H_2 with high productivity (Kleerebezem & van Loosdrecht, 2007). However, the H_2 production efficiency depends on crucial factors such as operational conditions and the microbial community (Wong *et al.*, 2014). To increase H_2 production and yield, several methods have been applied, one of which is bioaugmentation, which consists of adding one or more desired strains to the native community in order to improve substrate degradation or withstand process fluctuations (Venkata *et al.*, 2005).

The aim of this work was to evaluate the effect of two hydrolytic (*Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus subtilis*) and two fermentative (*Clostridium saccharobutylicum* and *C. beijerinckii*) strains on H_2 production during dark fermentation in batch tests, using food waste as substrate, pretreated anaerobic sludge as inoculum and different concentrations of the evaluated microorganisms (1x, 2x, 3x and 4x). Bioaugmentation with *B. subtilis* 4x showed the best performance, obtaining a yield (Y_{H_2}) improvement of 2.9 fold in comparison with the non-bioaugmented tests (control), as well as an increase in butyrate production (485% more) and a significant shortening of lag phase (from 7.9 h to 3.5 h). On the other hand, bioaugmentation with *C. saccharobutylicum* 4x showed an antagonistic effect, obtaining a lower Y_{H_2} (-19.5%) in comparison with the control, and a minimal reduction of lag phase (from 7.9 h to 6.7 h).

Finally, an ASBR reactor (working volume of 1 L) was operated, in which the bioaugmentation of *B. subtilis* 4x was applied, obtaining a significant effect ($p < 0.05$) on volumetric productivity (Q_{H_2}), reaching an increase of $22.2 \text{ mLH}_2/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ to $59.3 \text{ mLH}_2/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$, in comparison with its operation without the addition of microorganisms, as well as an increase in Y_{H_2} (from $4.4 \text{ mLH}_2/\text{gSV}$ to $11.8 \text{ mLH}_2/\text{gSV}$). The microbial community analysis during bioaugmentation showed an important domain in lactic acid bacteria (LAB) abundance such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, whose metabolic activity was decisive in the reactor performance, inferring a synergistic relationship with the added microorganism. Although the bioaugmentation of *B. subtilis* improved H_2 production in the system, its effect is not permanent (observed in Q_{H_2} decreased from $98.6 \text{ mLH}_2/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$ a $45.4 \text{ mLH}_2/\text{L}_{\text{reactor}}/\text{d}$), requiring eventually the addition of more microorganisms.



1. INTRODUCCIÓN

Debido al aumento en la generación de gases de efecto invernadero (GEI) y la creciente necesidad de energía (Secretaría de Energía y Comisión Federal de Electricidad., 2012; Secretaría de Energía, 2015), se ha determinado que el H₂ es una alternativa que puede ayudar a la transición de la actual economía basada en combustibles fósiles a una basada en energías renovables (Anzwar *et al.*, 2014). Considerado el combustible del futuro, el H₂ posee el mayor contenido energético por unidad de peso, 122 kJ/g - 142 kJ/g, comparado con cualquier combustible conocido y es una opción prometedora para reemplazar los combustibles convencionales porque es renovable, limpio y produce durante su combustión únicamente vapor de agua y energía (Argun & Kargi, 2011).

Aunque existen métodos para la obtención de H₂ a partir de combustibles fósiles como el reformado de vapor, oxidación parcial, oxidación autotérmica y gasificación, los métodos biológicos de producción de H₂ como la fermentación oscura (FO) de residuos sólidos orgánicos constituidos principalmente por residuos alimenticios utilizados como sustrato, demuestra ser el enfoque más atractivo y ecológico (Lee *et al.*, 2010; Castillo-Hernández *et al.*, 2015; Bakonyi *et al.*, 2014).

Sin embargo, la eficiencia de la producción de H₂ depende de las condiciones operativas y de la comunidad microbiana (Wong *et al.*, 2014), en el que participan ecosistemas complejos y diversos que dependen de microorganismos que interactúan entre sí, donde los productores directos de H₂ no son los únicos que participan en el ecosistema, la comunidad microbiana presente en el inóculo y sustrato resultan ser un factor importante que puede afectar la productividad del sistema debido a la presencia de microorganismos que pueden interactuar de forma negativa mediante el consumo de H₂ o competencia por el sustrato (Cabrol *et al.*, 2017). Por tal razón, para potenciar la productividad de los sistemas, se han realizado pretratamientos al inóculo y sustrato con diferentes grados de éxito, los cuales se basan principalmente en el sometimiento a condiciones de estrés térmico y químico con el objetivo de seleccionar microorganismos productores de H₂ formadoras de esporas e inhibir a los consumidores de H₂ como las arqueas metanogénicas que no esporulan (Mohan *et al.*, 2008).

No obstante, con el desarrollo de herramientas moleculares, se ha revelado una amplia diversidad filogenética que contribuye de diferentes maneras a la producción de H₂ en cultivos mixtos durante la FO, como los anaerobios facultativos, los cuales pueden ser atractivos por su menor sensibilidad al O₂, actividad hidrolítica y agregación celular, sin embargo su presencia se encuentra limitada por los drásticos pretratamientos del inóculo y sustrato (Cabrol *et al.*, 2017). Por lo anterior, es posible considerar la adición de microorganismos específicos a un sistema fermentativo, conocido como bioaumentación (Venkata *et al.*, 2005), como una estrategia prometedora para mejorar el Y_{H2} cuando se emplean bacterias apropiadas (Marone *et al.*, 2012; Sharma & Melkania, 2018), permitiendo reducir el periodo de arranque (Ma *et al.*, 2009) y proteger a la comunidad microbiana (Venkata *et al.*, 2005).



2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Definición de residuos de alimentos (RA)*

De acuerdo con la Comisión para la Cooperación Ambiental, la pérdida de alimentos se refiere a la disminución en calidad o cantidad de los alimentos destinados al consumo humano provocado por fallos en el sistema de producción y distribución de estos. La causa principal de estas pérdidas son las deficiencias en la cadena de abasto alimentaria (e.g. alimentos que se pudren en el campo o bodegas de almacenamiento). Por otro lado, el desperdicio de alimentos se refiere a aquellos que son desechados de forma intencional, incluyendo partes comestibles como no comestibles (CCA, 2017).

La diferencia principal entre ambas radica en que la pérdida de alimentos se centra en las primeras etapas de la cadena de abasto (producción y procesamiento), en cambio, el desperdicio se concentra en las etapas finales (distribución, venta al menudeo, servicios de preparación y consumo).

Aunque en ambas definiciones existen variaciones entre ellas, los dos términos se traslapan de forma significativa, por tanto, para efectos del siguiente trabajo se empleará residuos de alimentos (RA) para referirse tanto a la pérdida como al desperdicio.

2.2 *Situación actual de los RA en América del Norte*

Se calcula que América del Norte genera 168 millones de toneladas de RA al año, abarcando todas las etapas de la cadena de abasto alimentaria (producción de alimentos poscosecha, procesamiento, distribución, venta al menudeo y servicios alimentarios) incluyendo precosecha y consumo. Por país, la cifra anterior equivale a 13 millones de toneladas en Canadá, 126 en Estados Unidos y 28 en México (Gustavsson *et al.*, 2013) (Figura 1).

Los países de América del Norte, tienen junto con Oceanía (Australia y Nueva Zelanda), el volumen de RA per cápita más alto del mundo: Estados Unidos con 415 kg/persona/año, Canadá con 396 kg/persona/año y México con 249 kg/persona/año (Gustavsson *et al.*, 2013) (Figura 2).

Las pérdidas de alimentos en los países industrializados son tan altas como en los países en desarrollo, sin embargo, éstas se diferencian por producirse en diferentes etapas de la cadena de abasto alimentaria, por tanto, más del 40% de las pérdidas de alimentos en los países en desarrollo se produce en las etapas de poscosecha y procesamiento, mientras que en los países industrializados dichas pérdidas se presentan en la venta minorista y el consumo. No obstante, las causas exactas de



las pérdidas de alimentos varían en las diferentes partes del mundo y dependen sobre todo de las condiciones específicas y situación local de cada país (Gustavsson *et al.*, 2013).

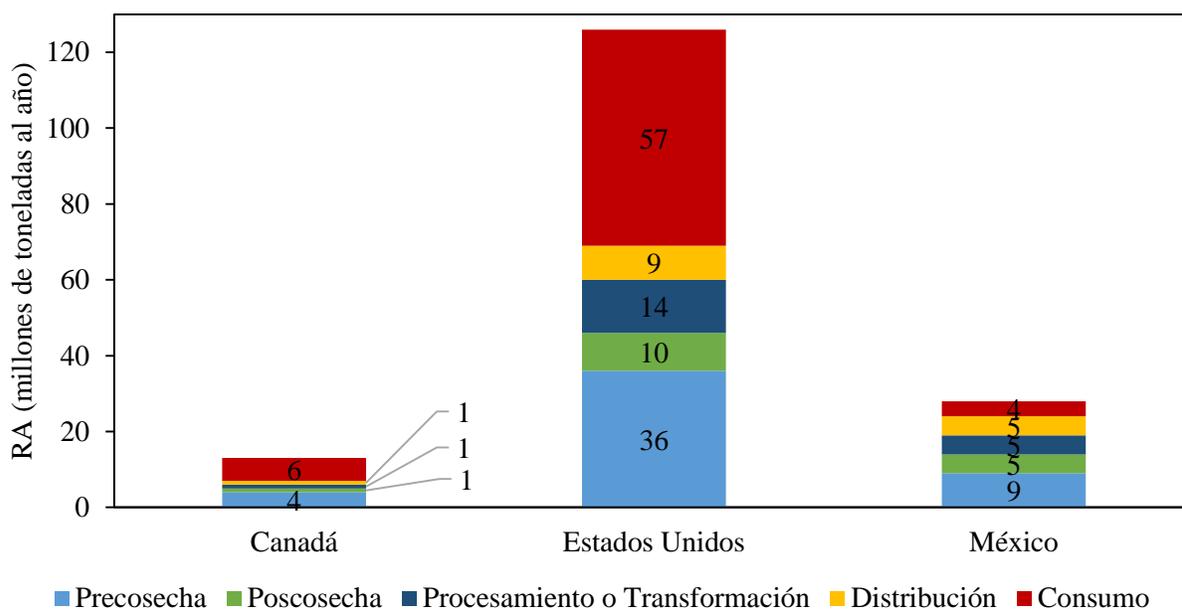


Figura 1. Estimaciones de RA en la cadena de abasto alimentaria de América del Norte, por país.

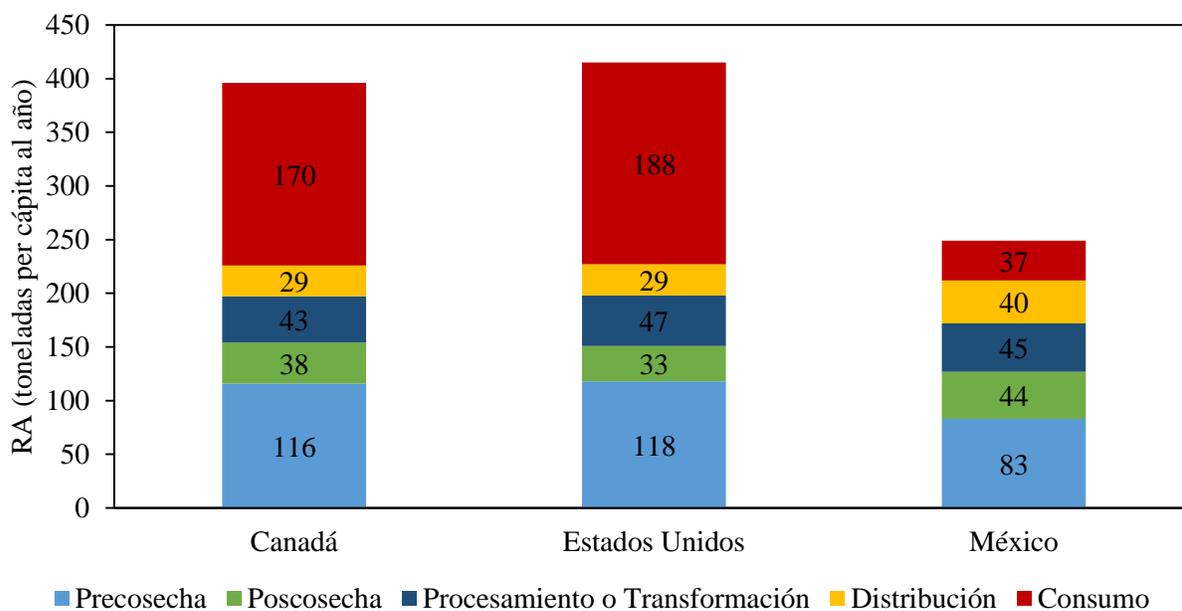


Figura 2. Estimaciones de RA, per cápita, en la cadena de abasto alimentaria de América del Norte.



2.3 Efectos ambientales y socioeconómicos de los RA

En toda la cadena alimentaria, los RA contribuyen de manera significativa a efectos ambientales y socioeconómicos asociados con emisiones de GEI, consumo de agua, uso de la tierra, uso de fertilizantes, consumo de energía, pérdida de biodiversidad y espacio desperdiciado en rellenos sanitarios. En la Tabla 1, se presentan por país, las estimaciones de dichos efectos debido a los RA en América del Norte (CCA, 2017).

Por lo anterior, en cualquier país, la cantidad de RA debería mantenerse al mínimo, sin importar el nivel de desarrollo económico y de la madurez de sus sistemas, ya que la generación de dichos residuos conlleva al desperdicio de recursos utilizados en la producción, como tierra, agua, energía e insumos. Producir comida que no va a consumirse supone emisiones innecesarias de dióxido de carbono (CO₂) además de pérdidas en el valor añadido de los alimentos producidos.

Tabla 1. Efectos ambientales y socioeconómicos de los RA.

Efecto	Unidad	Canadá	Estados Unidos	México	América del Norte
Emisiones de GEI de los RA en rellenos sanitarios	Millones de ton. de CO ₂ eq. al año	21	123	49	193
Consumo de agua	Miles de millones de m ³ al año	1.5	13.4	2.7	17.6
Tierras de cultivo desperdiciadas	Millones de has. al año	1.8	15.9	4.4	22.1
Uso de fertilizantes	Millones de ton. al año	0.33	2.97	0.63	3.94
Consumo de energía	10 ¹⁸ joules al año	1.0	8.9	3.4	13.3
Pérdida de biodiversidad	Millones de dls al año	26	229	64	319
Espacio desperdiciado en rellenos sanitarios	Millones de m ³ al año	4.2	25.9	8.6	38.6

*El espacio desperdiciado en rellenos sanitarios se calculó sólo para los RA depositados en rellenos sanitarios; las estimaciones no incluyen RA eliminados de otra forma, ni cultivos no cosechados o alimentos perdidos por otras vías.

Fuente: Adaptado de CCA, 2017.



2.2 Fundamentos de la DA

La digestión anaerobia (DA) es un proceso complejo debido al número de reacciones llevadas a cabo y por la cantidad de microorganismos que participan en ellas. Tal complejidad resulta en que dichas reacciones ocurren de forma simultánea (Varnero, 2011). En los siguientes capítulos, se abordará con más detalle cada una de las etapas que conforman la DA.

2.2.1 Procesos biológicos de la DA

La DA es una serie de reacciones bioquímicas en las que la materia orgánica es convertida en una mezcla de metano (CH_4), CO_2 e H_2 por microorganismos en ausencia de oxígeno (O_2) (Adekunle & Okolie, 2015). Dicho proceso incluye cuatro diferentes etapas, llamadas hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Khan *et al.*, 2016) como se observa en la Figura 3.

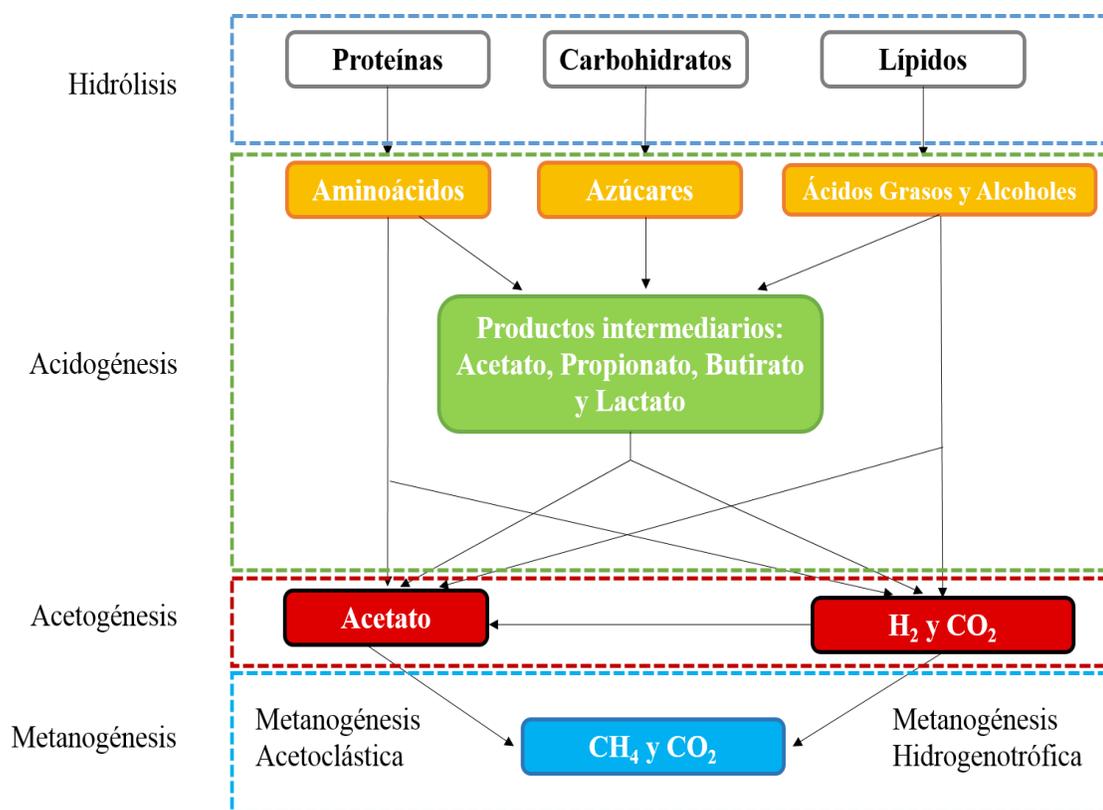


Figura 3. Esquema General de la DA de la materia orgánica.
Fuente: Adaptado de Gujer & Zehnder, 1983.



En el proceso de degradación de la materia orgánica intervienen diversos grupos de bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas, las cuales utilizan de forma secuencial los productos metabólicos generados por cada grupo. El flujo de carbonos y electrones producidos durante la DA de los compuestos orgánicos involucra tres grandes grupos tróficos (Díaz-Baez *et al.*, 2002):

- Grupo I: bacterias hidrolíticas y fermentativas.
- Grupo II: bacterias acetogénicas.
- Grupo III: bacterias metanogénicas.

La DA se inicia con la hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos por la acción de enzimas extracelulares producidas por las bacterias del Grupo I. Los productos de esta reacción son moléculas de bajo peso molecular (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y alcoholes), los cuales son transportados a través de la membrana celular; posteriormente son fermentados a ácidos grasos con bajo número de carbonos como el ácido acético, fórmico, propiónico y butírico, así como compuestos reducidos como el etanol, además de H₂ y CO₂. Los productos de la fermentación son convertidos a acetato, H₂ y CO₂ por acción de las bacterias del Grupo II. Finalmente, las bacterias del Grupo III o metanogénicas convierten el acetato a CH₄ y CO₂ o reducen el CO₂ a CH₄.

2.2.1.1 Hidrólisis

La hidrólisis es el primer paso en el proceso de DA que involucra la transformación de materia orgánica insoluble de mayor masa molecular en compuestos solubles (Adekunle & Okolie, 2015). En esta fase, las moléculas orgánicas complejas y no disueltas (carbohidratos, grasas y proteínas) se transforman en compuestos más simples (aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y algunos alcoholes, entre otros), mediante la acción de enzimas extracelulares secretadas por algunos microorganismos como las celulasas, amilasas, proteasas y lipasas. Los compuestos solubles (diferentes tipos de oligosacáridos y azúcares, alcoholes, aminoácidos y ácidos grasos) son transportados a través de la pared celular y constituyen las principales fuentes de carbono y energía para los microorganismos (Schnürer & Jarvis, 2010).

2.2.1.2 Bacterias hidrolíticas (Grupo I)

El aprovechamiento de polímeros complejos requiere que los microorganismos encargados de su degradación sean capaces de transformar las moléculas de carbohidratos, proteínas y lípidos a compuestos simples como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos. Las bacterias que llevan a cabo estas reacciones son anaerobias facultativas y los géneros más frecuentes son: *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* (Díaz-Baez *et al.*, 2002).



Tanto en la hidrólisis como en la acidogénesis hay aproximadamente 50 géneros de bacterias como: *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Proteobacteria*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, etc (Seon *et al.*, 2014). En la Tabla 2 se presentan los principales microorganismos que participan en la hidrólisis de la DA.

Tabla 2. Especies de bacterias hidrolíticas en la DA.

Género	Especie	Descripción	Metabolismo
<i>Bacteroides</i>	<i>uniformis</i> <i>acidifaciens</i> <i>vulgatus</i> <i>splanchnicus</i> <i>ruminicola</i>	Bacilos Gram-negativas, móviles.	Utilizan carbohidratos, aminoácidos y ácidos orgánicos como sustrato. Sus productos metabólicos son succinato, acetato, formato y lactato.
<i>Lactobacillus</i>	<i>pentosus</i> <i>plantarum</i> <i>agilis</i> <i>aviarius</i> <i>lindneri</i>	Bacilos Gram-positiva, móviles, formadora de esporas.	Fermentan la glucosa a lactato y otros ácidos orgánicos.
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	Bacilos Gram-positivas, móviles, formadoras de esporas.	Degradan almidón, glucosa, caseína y otros polisacáridos. Sus productos son la acetoína, lactato, acetato e H ₂ .
<i>Propionibacterium</i>	<i>microaerophilum</i> <i>granulosum</i> <i>lymphophilum</i> <i>acnes</i> <i>avidum</i> <i>propionicus</i> <i>combesii</i>	Bacilos Gram-positivas, móviles y formadoras de esporas.	Producen propionato y acetato en la fermentación de carbohidratos.
<i>Sphingomonas</i>	<i>aromaticivorans</i> <i>subterranea</i> <i>stygia</i>	Bacilos Gram-negativas.	Los subproductos de la fermentación son: isovalerato, formato, succinato, lactato y CO ₂ .
<i>Sporobacterium</i>	<i>olearium</i>	Gram-positivas.	Los productos de su fermentación son acetato y butirato.
<i>Megasphaera</i>	<i>elsdenii</i>	Pertenecen a la subclase de Negativicutes.	Fermentan piruvato para producir propionato.
<i>Bifidobacterium</i>		Gram-positivas, no móviles.	Producen lactato y acetato a partir de la fermentación de la glucosa.

Fuente: Deublein & Steinhauser, 2010.



2.2.1.3 Fermentación o Acidogénesis

En la acidogénesis, los monómeros y los compuestos solubles de la etapa anterior son convertidos a ácidos grasos volátiles (AGV), H₂, CO₂ y alcoholes (Kumaran *et al.*, 2016).

En esta etapa, también conocida como fermentación oscura (FO) debido a que no requiere de luz para llevarse a cabo (Cabrol *et al.*, 2017), se produce la conversión de compuestos orgánicos sin un aceptor específico de electrones para producir compuestos oxidados o reducidos. Los dos mayores grupos sujetos a la FO bajo condiciones anaerobias son los azúcares y los aminoácidos. Los primeros son fermentados principalmente por la ruta Embden-Meyerhof-Parnas a piruvato y subsecuentemente a moléculas de 3 carbonos (propionato o lactato), o compuestos de 2 a 6 carbonos vía acetyl-CoA (Batstone & Jensen, 2011). Por otra parte, el metabolismo anaerobio de los aminoácidos se lleva a cabo por medio de tres procesos: la reacción de Stickland, la desanimación oxidativa de un solo aminoácido y la desanimación reductiva de un solo aminoácido. No obstante, el 90% de la degradación anaerobia de los aminoácidos se lleva a cabo por la reacción de Stickland la cual no produce H₂, la desanimación oxidativa no es termodinámicamente favorable a menos que la presión parcial de H₂ sea baja y la desanimación reductiva consume H₂ (Dong *et al.*, 2009). Todas las reacciones anteriores son reguladas por las condiciones del medio, incluyendo el pH, concentración de H₂ en fase gas, temperatura y tiempo de retención celular (Batstone & Jensen, 2011).

2.2.1.4 Bacterias fermentativas (Grupo I)

Generalmente, todos los microorganismos de esta etapa también participan en la hidrólisis. Los géneros *Clostridium*, *Paenibacillus* y *Ruminococcus* se encuentran de forma dominante en la etapa de acidogénesis (Deublein & Steinhauser, 2010).

Los *Clostridium* presentan una diversidad fenotípica y genotípica extensa. Las especies de este tipo pueden utilizar una gama amplia de sustratos para producir AGV, alcoholes, CO₂ e H₂ (Kandylis *et al.*, 2016).

El género *Paenibacillus* comprende al menos dos especies que producen lactato, formiato, acetato y propionato. Se considera que estos microorganismos pertenecen a los descomponedores primarios en la fermentación de la biomasa (Deublein & Steinhauser, 2010).

Las especies del género *Ruminococcus* son cocos anaerobios quimiorganótrofos que fermentan carbohidratos para producir acetato, formiato, lactato, etanol, H₂ y CO₂ (Kumaran *et al.*, 2016). En la Tabla 3, se presentan algunas especies de los géneros mencionados.



Tabla 3. Especies de bacterias acidogénicas en la DA.

Género	Especie	Sustrato
<i>Clostridium</i>	<i>beijerinckii</i>	Sacarosa, dextrina, pectina, fructosa y galactosa.
	<i>saccharobutylicum</i>	Glucosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, almidón y glucógeno.
	<i>butyricum</i>	Polímeros como pectina.
	<i>tyrobutyricum</i>	Monosacáridos.
	<i>propionicum</i>	Aminoácidos, lactato y acrilato, que son fermentados para producir propionato, butirato y acetato.
	<i>clostridiiformis</i>	Degrada carbohidratos para producir acetato, lactato y formato.
<i>Paenibacillus</i>	<i>alkaliterrae</i>	Xilosa, glucosa, fructosa, celobiosa y galactosa.
	<i>koreensis</i>	Caseína, quitina y almidón.
	<i>polymyxa</i>	Celulosa, quitina, almidón y xilano.
<i>Ruminococcus</i>	<i>hydrogenotrophicus</i>	H ₂ , CO ₂ y ácidos grasos de cadena corta.
	<i>gnavus</i>	Degrada azúcar para producir etanol.
	<i>bromii</i>	Degrada azúcar y almidón para producir etanol.
	<i>flavefaciens</i>	Celulosa.

Fuente: Deublein & Steinhauser, 2010.

2.2.1.5 Acetogénesis

Los productos de las etapas iniciales no pueden ser consumidos directamente (a excepción del acetato e H₂) por los microorganismos metanogénicos en la etapa final de la DA, por consiguiente, dichos productos son convertidos a acetato, H₂ y CO₂ (Adekunle & Okolie, 2015).

La producción de acetato se realiza a partir de dos rutas diferentes (Durán *et al.*, 2014):

1. *Deshidrogenación acetogénica*. Se realiza a través de la fermentación de AGVs o lactato y alcoholes. Estas reacciones dependen de la concentración de H₂ existente, por lo tanto, para que la acetogénesis tenga lugar en los reactores anaerobios, es necesario que el H₂ generado en el proceso sea utilizado con igual o mayor rapidez a la que se produce.
2. *Hidrogenación acetogénica*. Participan bacterias denominadas homoacetogénicas, que pueden crecer autotróficamente con CO₂ e H₂ para producir acetato como único producto de la reacción cuando las arqueas metanogénicas consumidoras de H₂ están inhibidas debido a un pH bajo.



La alta concentración de H₂ en esta etapa inhibe la conversión de ácidos grasos de cadena larga, de igual forma, una elevada presión parcial del H₂ provoca un cambio metabólico en la producción de lactato, etanol, acetona y butanol (Bundhoo & Mohee, 2016).

2.2.1.6 Bacterias acetogénicas (Grupo II)

Se consideran tres los grupos de bacterias acetogénicas: homoacetogénicas, sintótrofas (OHPA- *Obligate Hydrogen Producing Acetogens*, por sus siglas en inglés) y sulfato-reductoras (Arnáiz *et al.*, 2000).

Las bacterias homoacetogénicas producen acetato como único producto, característica que las distingue de los demás organismos acetogénicos. Por otro lado, las OHPA emplean la deshidrogenación acetogénica, por lo que su crecimiento depende de la eliminación del H₂, ya que es un inhibidor de la acetogénesis, por ende, es necesaria la actividad de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y de bacterias sulfato-reductoras, estas últimas, en presencia de sulfatos, establecen una relación de simbiosis con las OHPA, denominada como transferencia entre especies de H₂, lo que permite obtener un balance de energía favorable para llevar a cabo la acetogénesis. Adicionalmente, las bacterias sulfato-reductoras pueden degradar una amplia variedad de sustratos por lo que compiten con las acetogénicas y metanogénicas por el acetato, H₂, propionato y butirato (Arnáiz *et al.*, 2000). Existen dos grupos de bacterias sulfato-reductoras: de oxidación incompleta (*Desulfobulbus*, *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio*) y de oxidación completa (*Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema* y *Desulfosarcina*) (Durán *et al.*, 2014).

Las bacterias acetogénicas pueden sobrevivir sólo en simbiosis con los microorganismos consumidores de H₂ (Deublein & Steinhauser, 2010), debido a que en la producción de acetato, el H₂ se produce paralelamente, si éste se acumula, la presión parcial aumenta significativamente, provocando la inhibición de la actividad de las bacterias acetogénicas y por consiguiente, una disminución en la producción de acetato (Gerardi, 2003). En la Tabla 4 se presentan algunos géneros de bacterias acetogénicas.

Tabla 4. Especies de bacterias acetogénicas en la DA.

Género	Especie	Metabolismo
<i>Desulfovibrio</i>	<i>desulfuricans</i> <i>termitidis</i>	Oxida ácidos orgánicos y alcoholes para producir acetato.
<i>Aminobacterium</i>	<i>colombiens</i>	Fermenta aminoácidos y produce acetato.
<i>Acidaminococcus</i>		Fermentan aminoácidos para producir acetato, CO ₂ e H ₂ .

Fuente: Deublein & Steinhauser, 2010.



2.2.1.7 Metanogénesis

La metanogénesis es el último paso del proceso de DA, en la que la producción de CH₄ y CO₂ a partir de los productos de las etapas anteriores es llevado a cabo por arqueas metanogénicas bajo condiciones estrictamente anaerobias (Aslanzadeh, 2014).

Los microorganismos metanogénicos completan el proceso de DA mediante la formación de CH₄ a partir de sustratos monocarbonados o con dos átomos de carbono unidos por un enlace covalente: acetato, H₂, CO₂, formato, metanol y algunas metilaminas (Varnero, 2011).

La degradación metanogénica de cada sustrato depende tanto de la naturaleza del mismo como de la ruta metabólica seleccionada por los microorganismos para su degradación. Alrededor del 30% de la producción total de CH₄ se atribuye a la reducción del CO₂ a partir del H₂ y sólo el 5% - 6% de la formación total se atribuye al H₂ disuelto (Durán *et al.*, 2014).

2.2.1.8 Bacterias metanogénicas (Grupo III)

Los organismos metanogénicos se clasifican dentro del dominio Arquea el cual resulta ser polimórfico y se diferencia de otros dominios a través de la secuencia del 16S rRNA. Se caracterizan por poseer membranas constituidas de lípidos unidos a las moléculas de glicerol por enlaces éter, cuya resistencia química contribuye a la capacidad de estos microorganismos de sobrevivir a temperaturas extremas. Este dominio se divide en cuatro filos: Crenarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota y Euryarchaeota, siendo este último en el que pertenecen las arqueas metanogénicas (Deublein & Steinhauser, 2010).

En la metanogénesis se encuentran dos diferentes grupos de arqueas metanogénicas. Las acetoclásticas, que consumen el acetato y lo convierten en CH₄ y CO₂, y las hidrogenotróficas, que convierten el H₂ y el CO₂ en CH₄. Estas últimas actúan como consumidores de H₂ por lo que sus actividades deben ser suprimidas para asegurar la máxima producción de H₂ en la DA (André *et al.*, 2016).

Se han observado arqueas metanogénicas Gram-positivas como Gram-negativas, en forma de bacilos cortos y largos. Estas arqueas se clasifican en seis principales familias: Methanobacteriaceae, Methanosarcinaceae, Methanococcaeae, Methanothermaceae, Methanomicrobiaceae y Methanocorpusculaceae (Whitman *et al.*, 2006). Los principales géneros de arqueas acetoclásticas corresponden a *Methanosarcina* y *Methanothrix* (Gerardi, 2003). En la Tabla 5 se presentan algunas especies de arqueas metanogénicas presentes en la DA.



Tabla 5. Especies de arqueas metanogénicas en la DA.

Género	Especie	Descripción
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>ruminantium</i> <i>smithii</i> <i>curvatus</i> <i>cuticularis</i> <i>iliformis</i>	Las <i>Methanobrevibacter</i> son bacilos cortos. Algunas especies tienen flagelo. Crecen en condiciones mesofílicas.
<i>Methanobacterium</i>	<i>bryantii</i> <i>espanolae</i> <i>formicicum</i> <i>ivanovii</i> <i>thermoflexum</i>	<i>Methanobacterium</i> son bacilos largos e irregulares. Algunas especies poseen filamentos. Crecen en condiciones mesofílicas y termofílicas.
<i>Methanococcus</i>	<i>deltae</i> <i>vannielii</i> <i>aeolicus</i>	<i>Methanococcus</i> son Gram-negativas. Crecen en condiciones mesofílicas y termofílicas extremas.
<i>Methanogenium</i>	<i>cariaci</i> <i>liminatans</i> <i>organophilum</i> <i>frittonii</i> <i>frigidum</i>	<i>Methanogenium</i> son cocos irregulares. Algunas especies tienen flagelos.
<i>Methanocorpusculum</i>	<i>bavaricum</i> <i>labreanum</i> <i>parvum</i> <i>sinense</i>	<i>Methanocorpusculum</i> son cocos pequeños, Gram-negativas, cuentan con un flagelo.
<i>Methanosarcina</i>	<i>acetivorans</i> <i>barkeri</i> <i>frisii</i> <i>mazei</i> <i>thermophila</i>	La mayoría de las especies de <i>Methanosarcina</i> son Gram-positivas. Utilizan CO ₂ , H ₂ o acetato como sustrato.

Fuente: Deublein & Steinhauser, 2010.

2.3 Rutas metabólicas descritas en la producción de H₂ durante la FO

La producción de H₂ a partir de la FO resulta ser un fenómeno omnipresente que ocurre en la mayoría de los ambientes anaerobios. Consiste en una cascada de reacciones de reducción-oxidación (redox) que deben mantenerse en equilibrio. Estas reacciones son termodinámicamente favorables y espontáneas, no obstante, se encuentran restringidas por regulaciones biológicas de los microorganismos y por las interacciones de las comunidades microbianas (Moscoviz *et al.*, 2016).

La producción de H₂ es una respuesta natural de la necesidad celular de liberar el exceso de electrones y se lleva a cabo junto con la producción de AGV y/o alcoholes. Los subproductos más



comunes en la fermentación de la glucosa son acetato y butirato (Logan *et al.*, 2002), cuyos rendimientos estequiométricos son 4 mol_{H₂} por cada mol_{glucosa} cuando el ácido acético es el subproducto y 2 mol_{H₂} si se produce ácido butírico (Saady, 2013). En la práctica, el Y_{H₂} está dentro del rango de 1.2 mol_{H₂}/ mol_{glucosa} a 2.3 mol_{H₂}/ mol_{glucosa} (Agyeman *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2014) los cuales son inferiores al máximo estequiométrico de 4 mol_{H₂}. Esto se debe a que el proceso de fermentación naturalmente implica maximizar el crecimiento celular y no la producción de H₂, especialmente en cultivos microbianos mixtos, y adicionalmente, siendo el H₂ un producto intermediario clave, este puede ser consumido para la producción de metabolitos (Hallenbeck & Benemann, 2002; Saady, 2013) a partir de las reacciones que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Reacciones de producción y consumo de H₂ en procesos anaerobios.

Reacción	Ecuación	Referencia
Fermentación Acética	Glucosa + 2H ₂ O → 2Acetato + 2CO ₂ + 4H ₂	(Thauer <i>et al.</i> , 1977)
Fermentación Butírica	Glucosa → Butirato + 2CO ₂ + 2H ₂	(Dong <i>et al.</i> , 2009)
Fermentación Ácido-Mixta	4Glucosa → 2Acetato + 3Butirato + 8CO ₂ + 8H ₂	(Dong <i>et al.</i> , 2009)
Fermentación Propiónica	Glucosa + 2H ₂ → 2Propionato + 2H ₂ O	(Antonopoulou <i>et al.</i> , 2011)
Oxidación anaerobia	Butirato + 2H ₂ O → 2H ₂ + 2Acetato + H ⁺	(Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009)
Acetogénesis	4H ₂ + 2HCO ₃ ⁻ + H ⁺ → Acetato + 4H ₂ O	(Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009)
Sulfato-reducción	4H ₂ + SO ₄ ⁻² → HS ⁻ + 3H ₂ O + OH ⁻	(Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009)

De manera general, la producción de H₂ inicia con la conversión de la glucosa en piruvato a través de la glucólisis. Este último se transforma en acetyl-coA mediante dos rutas metabólicas: piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), asociada a los microorganismos anaerobios obligados, y piruvato formato liasa (PFL), la cual es común en anaerobios facultativos. En ambos casos el acetyl-coA es convertido en acetato, butirato o etanol, dependiendo de los microorganismos involucrados y las condiciones del ambiente (Ramírez-Morales *et al.*, 2015; Tapia-Venegas *et al.*, 2015).

2.3.1 Ruta PFL

Los anaerobios facultativos metabolizan total o parcialmente el piruvato proveniente de la glucólisis a formato, el cual es convertido en H₂ y CO₂ mediante el complejo hidrógeno formato liasa (FHL) (Figura 4a), que posee una hidrogenasa que, dependiendo de la especie microbiana involucrada, puede presentar iones de Níquel y Hierro ([NiFe] hidrogenasa o Ech hidrogenasa) o puede ser una



hidrogenasa dependiente de formato ([FeFe] hidrogenasa) (Tapia-Venegas *et al.*, 2015; Cabrol *et al.*, 2017). Los microorganismos que emplean esta ruta metabólica no son capaces de producir H₂ mediante la oxidación de NADH, por lo que están limitadas a un rendimiento teórico de 2 mol_{H₂} por mol_{glucosa} (Hallenbeck & Benemann, 2002).

2.3.2 Ruta PFOR

En esta ruta, el piruvato proveniente de la glucólisis es oxidado a acetyl-coA por la enzima PFOR, que genera también la reducción de una molécula de ferredoxina (Fd_{red}), la cual posteriormente es oxidada por una hidrogenasa dependiente de la ferredoxina (Fd-[FeFe]), que se encarga de transferir los electrones a los cationes de H₂ (H⁺), obteniéndose así hidrógeno molecular (H₂) (Figura 4b).

Anaerobios obligados como el género *Clostridium* pueden producir H₂ adicional a partir de las moléculas de nicotin adenin dinucleótido (NADH) generadas durante la glucólisis (Figura 4c), las cuales son oxidadas por acción de dos tipos de hidrogenasas, una dependiente de NADH (NADH-[FeFe]) y otra dependiente de NADH y ferredoxina reducida (NADH-Fd_{red})-[FeFe]), lo cual sucede en condiciones de baja presión parcial de H₂ (menores a 6x10⁻⁴ atm) (Mathews & Wang, 2009; Ramírez-Morales *et al.*, 2015).

2.4 Grupos microbianos productores de H₂ durante la FO

Las bacterias productoras de H₂ (HPB- *Hydrogen producing bacteria*, por sus siglas en inglés) se dividen en tres grupos principales: anaerobios obligados formadores de esporas, anaerobios obligados no formadores de esporas y anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo (Cabrol *et al.*, 2017).

2.4.1 Anaerobios obligados formadores de esporas

El género *Clostridium* es considerado como el más abundante y eficiente HPB en reactores productores de H₂, alcanzando rendimientos de 1.5 mol_{H₂}/mol_{hexosa} a 3 mol_{H₂}/mol_{hexosa} (Laothanachareon *et al.*, 2014). Debido a su capacidad de formar esporas, pueden resistir tratamientos térmicos facilitando su selección en el inóculo. Adicionalmente, las especies de este género exhiben diferentes patrones metabólicos y su abundancia relativa varía en función del sustrato empleado, las condiciones de operación y la configuración del proceso. Como ejemplo de lo anterior, la especie *C. acetobutylicum* puede cambiar de un metabolismo acidogénico (producción de H₂ a partir de acetato o butirato) a la solventogénesis (producción de acetona y butanol mediante el consumo de H₂), lo cual puede ocurrir en condiciones de bajo pH, baja tasa de crecimiento y altas

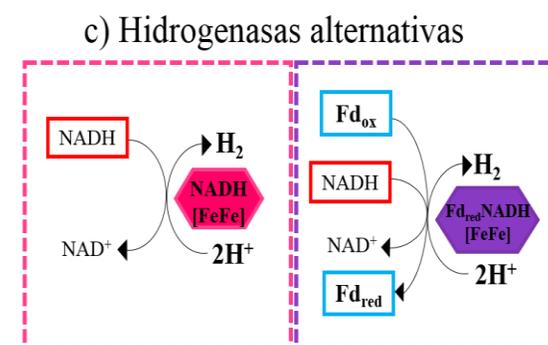
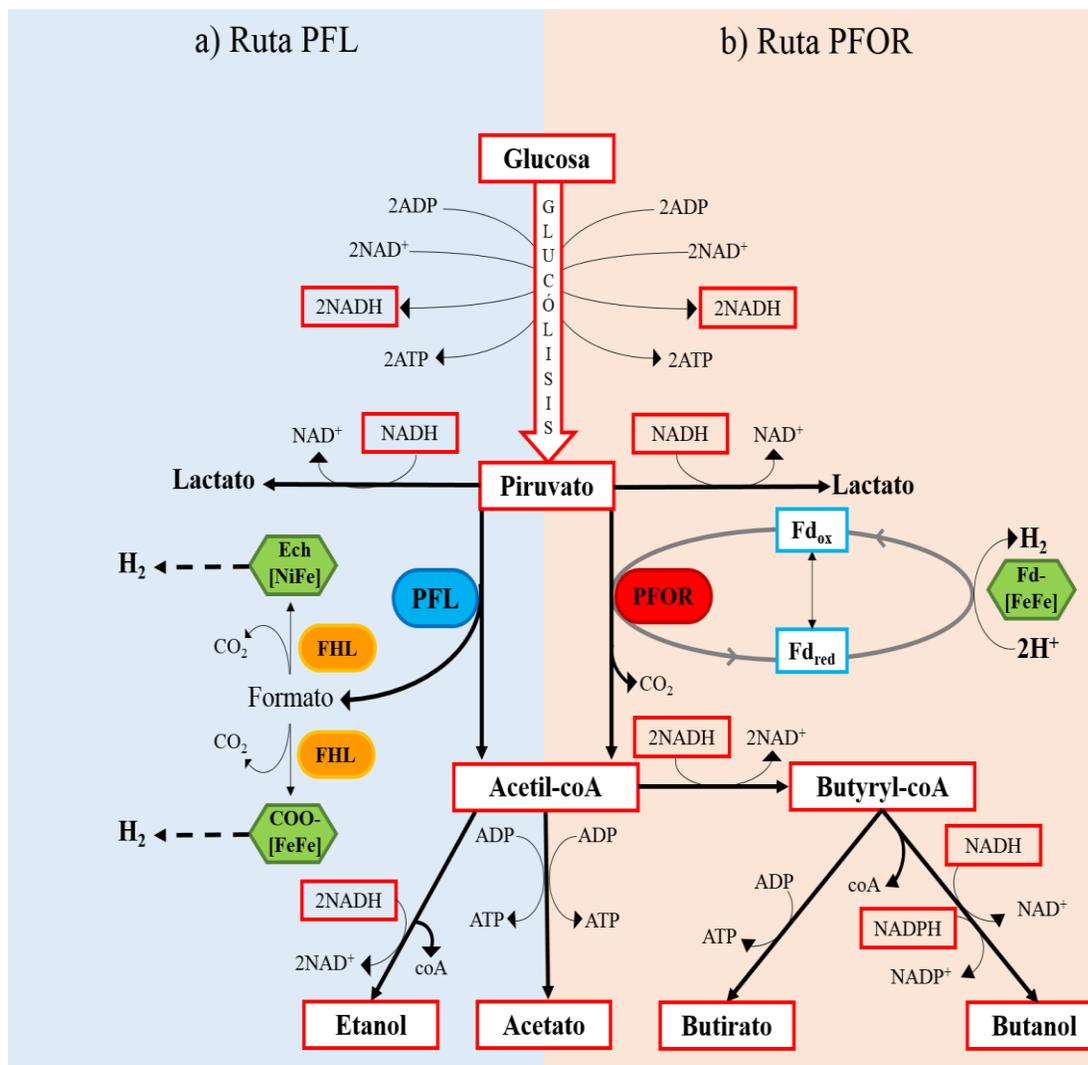


Figura 4. Vías metabólicas implicadas en la producción de H₂ durante la FO.

Fuente: Adaptado de Jones & Woods, 1986; Hallenbeck *et al.*, 2012.



concentraciones de carbohidratos (Lütke-Eversloh & Bahl, 2011). Finalmente, las especies de *Clostridium* poseen otras capacidades de interés como la actividad sacarolítica de *C. tyrobutylicum* (Jo *et al.*, 2007) o celulolítica de *C. celerecrescens* (Liang *et al.*, 2010) y *C. acetobutylicum* (Wang *et al.*, 2008).

2.4.2 Anaerobios obligados no formadores de esporas

Este tipo de microorganismo se ha reportado capaz de persistir e incluso dominar a pesar del tratamiento térmico empleado en cultivos mixtos cuando las condiciones de operación del reactor son favorables en términos de la fuente del inóculo, selección del sustrato y parámetros operativos. Bajo condiciones específicas de operación, la especie *Clostridium* podría no ser la HPB más adecuada para la producción de H₂, siendo otros microorganismos anaerobios obligados no formadores de esporas, pertenecientes al filo Firmicutes y Bacteroidetes principalmente (Tabla 7), capaces de obtener Y_{H₂} aceptables cuando las *Clostridium* permanecen inactivas (Cabrol *et al.*, 2017).

Tabla 7. Anaerobios obligados no formadores de esporas reportados en la producción de H₂.

Filo	Género/Especie	Productos metabólicos	Referencia
Firmicutes	<i>Ethanoligenes harbinense</i>	Acetato, etanol, H ₂ y CO ₂ .	(Xing <i>et al.</i> , 2008b)
	<i>Acetanaerobacterium elongatum</i>	Acetato, etanol, H ₂ y CO ₂ .	(Ren <i>et al.</i> , 2007)
	<i>Megasphaera elsdenii</i>	Acetato, propionato, butirato y ácido valérico.	(Ohnishi <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Selenomonas</i>	Acetato, propionato, CO ₂ , lactato e H ₂ .	(Luo <i>et al.</i> , 2008)
Bacteroidetes	<i>Prevotella</i>	Ácido succínico, acético e H ₂ .	(Hung <i>et al.</i> , 2011)

2.4.2 Anaerobios facultativos fermentativos

Son considerados como productores “desafiantes” de H₂ ya que en la práctica algunas especies han podido superar la productividad de H₂ reportada en cultivos de *Clostridium* (Patel *et al.*, 2014).

A pesar de sus menores rendimientos teóricos, los anaerobios facultativos pueden ser atractivos por razones relacionadas con su menor sensibilidad al O₂, consumiéndolo durante arranque del sistema, sin embargo, la presencia de estos microorganismos se encuentra limitada por los drásticos tratamientos del inóculo o sustrato (Cabrol *et al.*, 2017). En este grupo se encuentran miembros de la familia Enterobacteriaceae y Bacillaceae, dentro de los cuales destacan géneros como



Enterobacter y *Bacillus*, respectivamente (Cabrol *et al.*, 2017). En la Tabla 8 se muestran algunos microorganismos anaerobios facultativos reportados en la producción de H₂.

Tabla 8. Anaerobios facultativos reportados en la producción de H₂.

Filo	Familia	Género/Especie	Referencia
Proteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter aerogenes</i>	(Sharma & Melkania, 2018; Patel <i>et al.</i> , 2014)
		<i>Escherichia coli</i>	(Sharma & Melkania, 2018)
		<i>Klebsiella</i>	(Varrone <i>et al.</i> , 2013)
		<i>Buttiauxella</i>	(Marone <i>et al.</i> , 2012)
		<i>Shigella</i>	(Varrone <i>et al.</i> , 2013)
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Shiyan & Krishnaveni, 2013)
Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	(da Silva Mazareli <i>et al.</i> , 2019; Sharma & Melkania, 2018; Patel <i>et al.</i> , 2014)

2.5 Interacciones microbianas en sistemas de producción de H₂

En los procesos involucrados en la producción de H₂ participan ecosistemas complejos y diversos que dependen de las relaciones entre los microorganismos, donde además de las HPB, participan otros grupos microbianos, favoreciendo o perjudicando la producción de H₂ (Pakarinen *et al.*, 2008; Cabrol *et al.*, 2017).

2.5.1 Interacciones positivas

Como se ha reportado en muchos casos, microorganismos que no son capaces de producir H₂ o resultan ser menos eficientes, pueden contribuir positivamente a la comunidad microbiana del sistema y, por tanto, influir en la producción de H₂ a través de diferentes mecanismos (Cabrol *et al.*, 2017), como se explican en la Tabla 9 y 10.

Tabla 9. Interacciones que favorecen la producción de H₂.

Interacción	Descripción	Referencia
Consumo de O ₂	HPB anaerobios facultativos o especies no productoras de H ₂ pueden consumir trazas de O ₂ , creando condiciones para el desarrollo de anaerobios estrictos como <i>Clostridium</i> , favoreciendo vías metabólicas de alta producción de H ₂ .	(Cabrol <i>et al.</i> , 2017)



Regulación de pH	Mediante la acidificación del entorno, atribuido a bacterias ácido-lácticas (LAB- <i>Lactic acid bacteria</i>) y a través de la oxidación de ácidos grasos de cadena corta, previniendo su acumulación y logrando un efecto amortiguador.	(Chojnacka <i>et al.</i> , 2011)
Hidrólisis	Las moléculas orgánicas complejas son convertidas a moléculas más sencillas que las HPB puedan emplear, generando así una sinergia metabólica entre microorganismos hidrolíticos y productores de H ₂ , la cual resulta relevante en el empleo de sustratos complejos.	(Patel <i>et al.</i> , 2012).
Agregación celular	Incrementando la concentración celular en el reactor mediante la producción de exopolisacáridos (EPS) o formación de gránulos, previniendo el lavado o pérdida de biomasa y ofreciendo barreras contra ambientes tóxicos u hostiles para las HPB.	(Cabrol <i>et al.</i> , 2017)

Tabla 10. Microorganismos y sus contribuciones positivas en la producción de H₂.

	Género/Especie	Actividad	Referencia
Consumo de O₂	<i>Bacillus</i>	Eliminación de O ₂ favoreciendo a <i>Clostridium</i>	(Huang <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Eliminación de O ₂ favoreciendo a <i>C. butyricum</i> y <i>C. beijerinckii</i>	(Chou <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Klebsiella</i>	Eliminación de O ₂ favoreciendo a <i>Clostridium</i>	(Patra <i>et al.</i> , 2011)
Regulación de pH	<i>Leuconostocaceae</i> (LAB)	Producción de ácido láctico	(Chojnacka <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Streptococcaceae</i> (LAB)	Producción de ácido láctico	(Chojnacka <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Megasphaera elsdenii</i>	Consumo de ácido láctico	(Xing <i>et al.</i> , 2008a)
	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	Consumo de propionato	(Ohnishi <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Syntrophomonas wolfei</i>	Consumo de propionato	(Ohnishi <i>et al.</i> , 2010)
Hidrólisis	<i>Bifidobacterium</i> (LAB)	Hidrólisis de almidón	(Cheng <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Bacillus</i>	Hidrólisis de lignocelulosa y almidón	(Patel <i>et al.</i> , 2012; Bao <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Hidrólisis de glucosa, xilano, almidón y celulosa	(Lal & Tabacchioni, 2009)
	<i>C. acetobutylicum</i>	Degradación de celulosa	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Ruminococcus</i>	Degradación de celulosa y lignocelulosa	(Motte <i>et al.</i> , 2014)
Agregación celular	<i>Bacillus racemilacticus</i>	Desarrollo de biopelícula mediante producción de EPS	(Rafrafi <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Producción de EPS	(Lal & Tabacchioni, 2009)
	<i>Prevotella</i>	Formación de gránulos	(Liang <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Klebsiella</i>	Formación de gránulos	(Liang <i>et al.</i> , 2010)



2.5.1 Interacciones negativas

La presencia de microorganismos que no están directamente involucrados en el proceso de producción de H₂ pueden reducir significativamente el Y_{H₂} mediante el consumo directo de H₂, competencia con las HPB por el sustrato e inhibición de la actividad de las HPB (Cabrol *et al.*, 2017), las cuales se explican a continuación.

2.5.1.1 Consumo de H₂

La disminución de la producción de H₂ se debe principalmente a su consumo directo por cuatro grupos de bacterias (Tabla 11): metanogénicas, homoacetogénicas, sulfato-reductoras y productoras de propionato, las cuales lo emplean como donador de electrones en sus procesos metabólicos (Cabrol *et al.*, 2017).

Tabla 11. Microorganismos afectan la producción de H₂ a través de su consumo.

Grupo	Especies	Referencia
Metanogénicas	Methanobacteria	(Chaganti <i>et al.</i> , 2012)
	Methanomicrobia	(Chaganti <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Methanosarcina barkerii</i>	(Kulkarni <i>et al.</i> , 2009)
Homoacetogénicas	<i>Bacteroides</i>	(Saady <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Eubacterium</i>	(Saady <i>et al.</i> , 2012)
Sulfato-reductoras	<i>Desulfovibrio</i>	(Chaganti <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	(Li <i>et al.</i> , 2011)
Productoras de propionato	<i>Bidobacterium catenulatum</i>	(Sivagurunathan <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Propionispira arboris</i>	(Li <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Propionibacterium propionicus</i>	(Ren <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Selenomonas lactificex</i>	(Sivagurunathan <i>et al.</i> , 2014)

2.5.1.2 Competencia e inhibición de las HPB

A pesar de que a algunas especies de LAB se les atribuye un rol positivo en la producción de H₂ mediante actividades de hidrólisis y regulación de pH, estas bacterias han sido asociadas con interacciones negativas como la competencia con las HPB por el piruvato, sustrato involucrado en las rutas PFL y PFOR de la producción de H₂. Adicionalmente, las LAB pueden inhibir a las HPB mediante la disminución drástica de pH debido a la síntesis de ácido láctico, acético y propiónico o por la producción de compuestos tóxicos como bacteriocinas o peróxido de hidrógeno. En la Tabla



12 se presentan los microorganismos que influyen negativamente en la producción de H₂ a través de la competencia e inhibición.

Tabla 12. Microorganismos que afectan la producción de H₂ por competencia e inhibición de las HPB.

Actividad	Género/Especie	Referencia
Competencia	<i>Bidobacterium</i>	(Cheng <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Lactobacillus harbinensis</i>	(Pattra <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Lactobacillus</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Sporolactobacillus</i>	(Monlau <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Streptococcus</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2014)
Inhibición	<i>Lactobacillus</i>	(Jo <i>et al.</i> , 2007)

2.5 Parámetros fisicoquímicos que influyen en la FO

Varios parámetros pueden influir en la producción de H₂ durante la FO impactando en el Y_{H2} o las tasas de producción. Entre los parámetros fisicoquímicos más relevantes se encuentran los siguientes:

2.5.1 pH y alcalinidad

El pH es uno de los parámetros más importantes en la FO, ya que tiene un efecto sobre: la hidrólisis de sustratos complejos, la actividad de enzimas importantes para la producción de H₂ (e.g. hidrogenasa), la población microbiana predominante y sus principales vías metabólicas (Anzwar *et al.*, 2014).

El pH óptimo para la producción de H₂ se encuentra en un rango de 5.5-6 (Van Ginkel *et al.*, 2001), sin embargo se ha reportado un amplio rango de operación de 4.5-8.0, el cual se debe a la diversidad del inóculo y sustrato (Ghimire *et al.*, 2015). No obstante, un pH por debajo de 5.0 no se considera óptimo ya que en este valor se desencadena el cambio de la acidogénesis a la producción de alcoholes (Oh *et al.*, 2003).

Este parámetro también afecta en la solubilidad de las moléculas como el CO₂ y en la disponibilidad de algunos nutrientes como el amonio y fosfato, los cuales son esenciales para el crecimiento microbiano. Valores extremos de pH no son tolerados por los microorganismos, ya que, en condiciones ácidas o básicas, los componentes microbianos se hidrolizan o algunas enzimas se



desnaturalizan. Los niveles óptimos de pH para la actividad de los microorganismos acidogénicos se encuentran entre 5.5 y 6.5 (Gerardi, 2003). En la Tabla 13 se observan los rangos de pH óptimos para el desarrollo de microorganismos con actividad hidrolítica y fermentativa.

Tabla 13. Valores de pH óptimo de crecimiento para microorganismos hidrolíticos y fermentativos.

Género	pH
<i>Bacillus</i>	5.5-8.5
<i>Paenibacillus</i>	7.0
<i>Lactobacillus</i>	5.5-6.2
<i>Bacteroides</i>	7.0
<i>Clostridium</i>	6.5-7
<i>Megasphaera</i>	4.6-7.8
<i>Sporobacterium</i>	6.5-8.5

Fuente: Bergey & Holt, 2000.

En muchos casos, para mantener un pH óptimo en el reactor, es necesaria la adición de alcalinidad utilizando sustancias como bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o carbonato de calcio. Regularmente se utiliza bicarbonato de sodio debido a su alta solubilidad y baja toxicidad (Varnero, 2011).

2.4.2 Tamaño de partícula

Para que las reacciones químicas se lleven a cabo, es necesario que la superficie de los reactivos sea lo más grande posible. Al reducir el tamaño de la partícula a partir de tratamientos mecánicos acelera la degradación debido al aumento de la solubilidad y disponibilidad de la materia orgánica. Entre más pequeña es la partícula, mayor resulta el área superficial en la que actúan las bacterias, las cuales secretan enzimas y simultáneamente, absorben los productos resultantes de dicha reacción, incrementando de esta forma el rendimiento de biogás. El aumento del área de contacto se logra disminuyendo el tamaño de la partícula a través de la trituración o molienda (Durán, *et al.*, 2014).

Empleando RA como sustrato, se ha reportado que tamaños de partícula menores a 0.5 mm ofrecen mejores tasas de producción de H₂ que partículas superiores a dicho tamaño (Moreno-Andrade & Buitron, 2015).



2.4.3 Composición del sustrato

Tanto la rapidez de reacción como la calidad y cantidad del biogás dependerán del tipo de sustrato que se emplea (Gerardi, 2003; Deublein & Steinhauser, 2010; Schnürer & Jarvis, 2010). Las principales biomoléculas consideradas como sustrato directo durante la FO han demostrado tener una influencia sobre la producción de H_2 . Las productividades más elevadas se han asociado al uso de sustratos ricos en carbohidratos mientras que producciones bajas o nulas se relacionan con proporciones elevadas de lípidos y proteínas (Alibardi & Cossu, 2016).

En cuanto a la rapidez de la reacción, la hidrólisis de carbohidratos se lleva a cabo en cuestión de horas, a diferencia de la hidrólisis de proteínas y lípidos, que se realiza en términos de días. La lignina y la celulosa se degradan de forma lenta e incompleta y, por ende, necesitan de un tratamiento para lograr una degradación parcial (Deublein & Steinhauser, 2010).

2.4.4 Nutrientes

Además de una fuente de carbono, los microorganismos requieren otros elementos para su crecimiento como lo son los nutrientes. Por lo anterior, los requisitos de nutrición resultan importantes ya que afectan directamente el metabolismo microbiano durante la FO y, por tanto, la producción de H_2 (Chandrasekhar *et al.*, 2015). Los nutrientes que resultan necesarios por los microorganismos se clasifican de la siguiente manera:

➤ Macronutrientes

Son requeridos en grandes cantidades por todos los microorganismos (por ejemplo: fósforo y nitrógeno). La necesidad de estos en el proceso anaerobio es menor en comparación con los requeridos en los procesos aerobios (Gerardi, 2003).

En la mayoría de los sistemas microbiológicos, el nitrógeno y el fósforo se encuentran disponibles como nitrógeno amoniacal (NH_3/NH_4^+) y como ortofosfato (PO_4^{-3}), respectivamente. Estos nutrientes, como todos los demás, sólo son aprovechables por las bacterias en solución acuosa y la cantidad en la que se encuentran debe controlarse asegurando un mínimo con respecto al porcentaje de DQO (demanda química de oxígeno) en la alimentación al reactor (Tabla 14).



Tabla 14. Cantidad de macronutrientes necesaria en reactores anaerobios.

Nutriente	Mínimo recomendado (% de DQO)
Nitrógeno	3 – 4
Fósforo	0.5 – 1

Fuente: Varnero, 2011.

➤ Micronutrientes

Dentro de los micronutrientes, los iones metálicos juegan un papel importante contribuyendo al crecimiento celular y a la activación de enzimas y coenzimas (Tabla 15). Estos se pueden clasificar en iones metálicos ligeros: magnesio, sodio y calcio, y en iones de metales pesados: hierro y níquel. Entre estos últimos, el hierro es el más estudiado, ya que es necesario para el crecimiento bacteriano y para la biosíntesis de enzimas y proteínas como las hidrogenasas y ferredoxinas, las cuales son necesarias para la producción de H₂ durante la FO (Bundhoo & Mohee, 2016).

Tabla 15. Influencia de iones metálicos en la producción de H₂.

Ión metálico	Influencia	Referencia
Magnesio	Cofactor de 10 enzimas involucradas en la glucólisis (e.g. hexoquinasa, fosfofructocinasa y fosfoglicerato)	(Balachandar <i>et al.</i> , 2013)
Sodio	Mejora la reducción de Fd _{ox} por NADH.	(Bundhoo & Mohee, 2016)
Calcio	Promueve el crecimiento bacteriano.	(Berrocal-Bravo, 2017)
Hierro	Presente en enzimas hidrogenasas.	(Karadag & Puhakka, 2010)
Níquel	Presente en la hidrogenasa [NiFe] de la ruta PFL.	(Bundhoo & Mohee, 2016)

2.4.5 Presión parcial de H₂

La presión parcial de H₂ puede influir en la producción de este gas durante la FO, ya que valores bajos facilitan la transferencia de masa de H₂ de la fase líquida a la gaseosa. Durante la FO, si aumenta la concentración de H₂ en la fase líquida, la oxidación de la ferredoxina catalizada por la enzima hidrogenasa se vuelve menos favorable, reduciendo así la producción de H₂. (Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2012; Mandal *et al.*, 2006)

Un aumento de la presión parcial de dicho gas puede inhibir la conversión de ácidos grasos de cadena larga, provocando un cambio metabólico en la producción de lactato, etanol, acetona y butanol (Bundhoo & Mohee, 2016).



La cifra máxima aceptable de este parámetro depende de las especies acterianas y del sustrato. Un intervalo ideal se encuentra entre 9×10^{-4} a 9×10^{-6} atm (Ostrem, 2004).

2.5 Parámetros operacionales que influyen en la FO

Así como los parámetros fisicoquímicos mencionados anteriormente, los parámetros operacionales también resultan importantes para que se lleve a cabo la FO de forma eficiente, los cuales se presentan a continuación.

2.5.1 Temperatura

La elección y control de la temperatura son fundamentales, ya que impulsan la función de los microorganismos en el proceso (Rosińska & Karwowska, 2017).

Los valores mínimos y máximos de temperatura que un microorganismo puede tolerar determinan su supervivencia y el papel que desempeñará en cierto ecosistema (Tabla 16). Los microorganismos se clasifican en psicrófilos cuando la temperatura de crecimiento es baja ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $20\text{ }^{\circ}\text{C}$), mesófilos cuando son moderadas ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $40\text{ }^{\circ}\text{C}$), termófilos cuando son altas ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e hipertermófilos cuando son muy altas ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $100\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Atlas & Bartha, 2002).

Tabla 16. Temperaturas de crecimiento para bacterias y arqueas que participan en la DA.

Microorganismo	Temperatura mínima de crecimiento ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura máxima de crecimiento ($^{\circ}\text{C}$)
<i>Micrococcus cryophilus</i>	-8	25
<i>Escherichia coli</i>	7	41
<i>Vibrio cholerae</i>	11	41
<i>Bacillus subtilis</i>	15	50
<i>Bacillus coagulans</i>	25	65
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	30	70
<i>Methanococcus voltae</i>	25	50

Fuente: Atlas & Bartha, 2002.

La temperatura es un parámetro esencial en el crecimiento de los microorganismos y, por consiguiente, en la generación de biogás (Siddique & Wahid, 2018). Las condiciones mesofílicas resultan ser más estables en comparación a las termofílicas debido a la amplia variedad de



microorganismos favorecidas a dicho rango de temperatura, es decir, de 35 °C a 37 °C (Yang *et al.*, 2018). Aunque la tasa de producción de biogás aumenta con la temperatura, esto conlleva una reducción en el contenido de CH₄ (Dai *et al.*, 2017). Para el caso del H₂, se han reportado mayores rendimientos de producción (Y_{H2}) en condiciones termofílicas (Valdez-Vazquez *et al.*, 2005; Ziara *et al.*, 2019), lo que sugiere que las altas temperaturas mejoran la hidrólisis del sustrato. Además, tienen un efecto sobre las vías metabólicas y, por tanto, sobre la proporción de los metabolitos obtenidos (Ghimire *et al.*, 2015).

Adicionalmente, si este parámetro cae por debajo del valor óptimo, los organismos acidogénicos continuarán produciendo ácidos grasos y alcoholes y, por consiguiente, habrá una acumulación excesiva de estas sustancias, debido a la inactividad de los organismos metanogénicos, provocando una caída en el pH del sistema (Schnürer & Jarvis, 2010).

Independientemente de la temperatura bajo la que se opere, ésta debe mantenerse constante una vez que se haya llegado al estado estacionario, aunque puede variar hasta ± 0.5 °C, si se desea obtener una producción constante de biogás. Pequeñas fluctuaciones (± 3 °C) pueden tolerarse, especialmente si el proceso se mantiene estable en cuanto a otros parámetros importantes como lo son el pH y la alcalinidad (Durán *et al.*, 2014).

2.5.2 Agitación

En la agitación de un reactor, se tiene como objetivo remover los metabolitos producidos, mezclar el sustrato fresco con la población bacteriana, distribuir uniformemente la temperatura, evitar la formación de espacios muertos sin actividad biológica que podrían reducir el volumen efectivo del reactor, prevenir la formación de espumas y la sedimentación (Varnero, 2011).

Una velocidad de mezclado continua de 100 rpm en los reactores, mejora la estabilidad durante el arranque del proceso. El mezclado puede llevarse a cabo con agitadores mecánicos, recirculación de lodos o inyección de biogás, siendo la agitación mecánica la más efectiva (Endar, 2009).

2.5.3 Tiempo de retención hidráulico

La cantidad de tiempo necesario para que cualquier microorganismo consuma y sintetice el sustrato se define como tiempo de retención hidráulico (TRH) (Grosser, 2017), el cual se puede calcular de acuerdo a la Ecuación 1:

$$\text{TRH} = \frac{V}{Q} \quad \text{Ecuación 1}$$



Donde:

V: Volumen del reactor (m^3).

Q: Caudal de entrada en el reactor (m^3/d).

La elección del TRH para una biomasa específica depende de la degradabilidad de la materia orgánica, por lo que en caso de fácil degradación requiere un menor TRH. Un proceso en condiciones mesofílicas implica un mayor TRH que cuando se opera a condiciones termofílicas (Durán *et al.*, 2014).

Adicionalmente, este parámetro permite la selección de las poblaciones deseadas. En el contexto de la FO, esta es una buena manera de eliminar arqueas metanogénicas que crecen más lentamente ($TRH > 1$ d) que los microorganismos productores de H_2 (Ramírez-Morales *et al.*, 2015).

El TRH para el tratamiento de residuos orgánicos varía de 3 a 55 días, dependiendo del tipo de biomasa, carga orgánica, temperatura de operación, etapas y operación de los reactores. El TRH típico se encuentra entre 10 y 25 días, pero puede ser mayor (Schnürer & Jarvis, 2010).

2.5.4 Tiempo de retención de sólidos

El tiempo de retención de sólidos (TRS) determina la relación entre la cantidad de materia orgánica o de sólidos volátiles (SV) que ingresan al reactor y la cantidad que sale. En reactores del tipo CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*, por sus siglas en inglés) y PFR (*Plug Flow Reactor*, por sus siglas en inglés) sin recirculación, tanto el TRH como el TRS son iguales (Varnero, 2011), sin embargo, si existe recirculación de sólidos, el TRS y el TRH varían significativamente entre ellos.

El TRS es el factor más importante para controlar la conversión de sólidos a gas y para mantener la estabilidad de un sistema (Burke, 2001).

Este parámetro se puede calcular como se muestra en la Ecuación 2:

$$TRS = \frac{(V)(C_d)}{(Q_w)(C_w)} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

V: Volumen del reactor (m^3).

C_d : Concentración de sólidos en el reactor (kg_d/m^3).

Q_w : Caudal de lodos de salida del reactor por día (m^3/d).

C_w : Concentración de los sólidos a la salida (kg_w/m^3).



Se ha reportado que valores elevados de TRS pueden permitir una adecuada degradación del sustrato y evitar la pérdida de microorganismos productores de H₂, no obstante, también se puede favorecer el crecimiento de microorganismos que afectan el proceso como los consumidores de H₂ (e.g. bacterias homoacetogénicas, sulfato-reductoras y arqueas metanogénicas). Por otro lado, valores bajos de este parámetro pueden limitar el crecimiento de poblaciones microbianas que resultan nocivas para el proceso, sin embargo, la degradación del sustrato y la retención de la biomasa pueden verse comprometidas, afectando la productividad del sistema (Berrocal-Bravo, 2017).

2.5.5 Carga Orgánica

La Carga Orgánica (CO) es considerada como la cantidad de sólidos orgánicos secos ingresados por unidad de tiempo y volumen en el proceso de DA. Es un parámetro clave para lograr una actividad óptima en los microorganismos (Neshat *et al.*, 2017).

La CO se calcula como se indica en la siguiente Ecuación 3:

$$CO = \frac{(Q)(C_{SV})}{V} = \frac{C_{SV}}{TRH} [=] \frac{kgSV}{m^3 día} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

Q: Flujo volumétrico a la entrada (m³/día).

C_{SV}: Concentración de sólidos volátiles (kgSV/m³).

V: Volumen activo del reactor, ya sea fase sólida y/o líquida (m³).

Bajas cargas orgánicas conducen a una ineficiencia de la DA (Li *et al.*, 2015). De manera similar, cuando este parámetro es incrementado más allá de un rango específico, se produce un aumento en la acumulación de AGV y etanol, y la transferencia de calor se vuelve ineficiente (Rico *et al.*, 2015).

2.6 Configuración de reactores y modo de operación empleados en la producción de H₂

Para la producción de H₂ durante la FO, los reactores se pueden operar en modo continuo o en lote, siendo este último el más empleado en las pruebas que se reportan en la literatura debido a su simplicidad y flexibilidad (Anzwar *et al.*, 2014). Los procesos continuos son más recomendados cuando se considera aplicaciones industriales, principalmente debido a su viabilidad económica y su diseño práctico de ingeniería al tratar grandes cantidades de sustratos (Ramírez-Morales *et al.*, 2015).



2.6.1 Reactor CSTR

Los reactores más utilizados para la fermentación continua son los CSTR, los cuales consisten en recipientes cilíndricos equipados con un sistema de agitación mecánica. El sustrato es suministrado al reactor y el efluente es eliminado de un modo continuo (Jung *et al.*, 2011). Son de uso común debido a su diseño simple, fácil ajuste de las condiciones de operación y el patrón de agitación facilita la homogeneidad del medio y proporciona un buen contacto de los microorganismos con el sustrato. No obstante, su elevado grado de mezcla no permite su operación con valores pequeños de TRH debido a que la concentración de biomasa se vuelve limitada, ya que el tiempo que permanece en el reactor es idéntico al TRH, teniendo un efecto indiscutible en la tasa de producción de H₂ (Balachandar *et al.*, 2013).

2.6.2 Reactor de membranas

El reactor de membrana (MBR- *Membrane biorreactor*, por sus siglas en inglés), está equipado con una membrana o sistema de membrana, la cual puede colocarse fuera del reactor o sumergirse dentro de él, siendo esta última configuración más ventajosa, ya que tiene costos operativos más bajos y las membranas son más pequeñas. El uso de un MBR elimina el principal inconveniente de un CSTR que es la pérdida de biomasa, ya que la membrana retiene a los microorganismos dentro del reactor, lo que permite mantener la biomasa a una concentración alta y de forma constante. Sin embargo, esta tecnología presenta desventajas significativas como la continua saturación de las membranas y elevados costos de operación (Zhou *et al.*, 2020).

2.6.3 Reactor anaerobio de flujo ascendente

El reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB- *Upflow anaerobic sludge blanket reactor*, por sus siglas en inglés) consiste en un recipiente de forma alargada, en el cual el sustrato es suministrado en la parte inferior, ascendiendo a través del lecho de lodo anaerobio y entrando en contacto con la biomasa en forma de gránulos de 0.2 mm a 2 mm de diámetro, lo cual favorece la velocidad de sedimentación y permite el empleo de altas cargas orgánicas. Las burbujas de gas H₂ producidas durante la FO se mueven hacia la parte superior del reactor, provocando turbulencia y favoreciendo el mezclamiento del medio, por lo que la agitación mecánica no es necesaria. La desventaja de este tipo de tecnología es el largo tiempo requerido para la formación de la biomasa granular, por lo que el uso del UASB puede ser limitado (Jung *et al.*, 2011).



2.6.4 Reactor de lecho fluidizado

El reactor de lecho fluidizado (FBR- *Fluidized bed reactor*, por sus siglas en inglés) combinan características de dos reactores: CSTR y reactores de lecho empacado. Con esta tecnología se obtienen altas tasas de degradación de materia orgánica debido a que los microorganismos forman agregados en forma de biopelícula o gránulos, manteniéndose suspendidos y en contacto con el sustrato gracias a la fuerza de arrastre provocada por el flujo ascendente de la alimentación. Entre las ventajas que ofrece el FBR es una buena transferencia de masa y calor, sin embargo se requiere mayor energía para lograr la fluidización en el reactor y por tanto, los costos de operación resultan mayores (Balachandar *et al.*, 2013).

2.6.5 Reactor anaerobio discontinuo secuencial (ASBR)

El reactor anaerobio discontinuo secuencial (ASBR- *Anaerobic sequencing batch reactor*, por sus siglas en inglés) es una tecnología prometedora en sistemas de fermentación de residuos orgánicos debido a que permite desacoplar el TRS y el TRH. Estos están basados en la repetición periódica de una secuencia definida de fases: llenado, reacción, sedimentación y vaciado, las cuales ocurren en el mismo tanque (Mace & Mata-Alvarez, 2002). Un nuevo ciclo en el reactor empieza con la fase de llenado. Esta tecnología ha sido aplicada en la producción de H_2 a partir de residuos orgánicos como los RA (Chen *et al.*, 2009; Arreola-Vargas *et al.*, 2013; Moreno-Andrade *et al.*, 2015).

Las etapas del reactor ASBR se describen a continuación (Figura 5):

- Llenado: consiste en la alimentación o en la adición de sustrato al reactor. Al mezclar de forma continua durante esta fase, aumenta rápidamente la concentración del sustrato en el tanque. El volumen que se alimenta se determina de acuerdo con factores como TRH deseado, CO óptima, etc.
- Reacción: es la fase en la cual la materia orgánica se convierte en biogás. El tiempo requerido para dicha etapa, dependerá de parámetros como las características del sustrato, calidad del efluente, producción de biogás, concentración de biomasa, etc.
- Sedimentación: en la cual se detiene la agitación para permitir la separación de los sólidos, actuando el reactor como clarificador. El tiempo requerido para llevarlo a cabo depende de la sedimentabilidad, generalmente entre 10 y 30 minutos.
- Vacío: ocurre después de la adecuada separación de sólidos. El volumen vaciado, generalmente, es igual al volumen de alimentación. El tiempo de esta fase dependerá de la cantidad del efluente y de la velocidad de vaciado. Completada esta última fase, el reactor está listo para ser alimentado nuevamente, iniciando un nuevo ciclo.

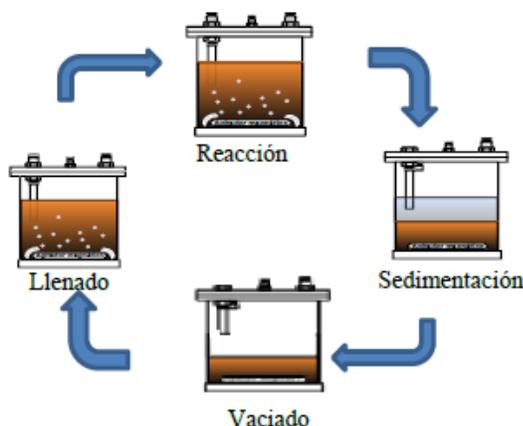


Figura 5. Etapas de operación de un ASBR.

Este tipo de reactor presenta ciertas características que lo hacen ventajoso frente a los sistemas convencionales continuos, entre las que destacan las siguientes (Varnero, 2011):

- Flexibilidad de operación, pudiendo lograrse la adaptación de la biomasa a un determinado tipo de sustrato.
- La biomasa se encuentra en un estado dinámico de abundancia y escasez de sustrato, simulando de mejor manera el estado fisiológico natural de los microorganismos.
- La etapa de sedimentación se realiza dentro del mismo reactor por lo que no es necesario una unidad aparte.
- Permite una mejora de la calidad del efluente, ya que la descarga puede ser llevada a cabo cuando éste presente los estándares requeridos.

Finalmente, si bien los reactores que emplean biomasa granular (e.g. UASB o FBR), así como los que utilizan membranas, resultan atractivos en cuanto a la retención de los microorganismos dentro del sistema, es importante considerar la pérdida de H_2 a través de la producción de CH_4 , lo cual puede deberse al desarrollo de arqueas metanogénicas debido a que en este tipo de reactores el crecimiento celular ya no es controlado directamente con el TRH (Hallenbeck & Ghosh, 2009). Por lo anterior, el empleo de reactores tipo ASBR resulta una opción prometedora debido a las ventajas mencionadas anteriormente como la flexibilidad de operación y menores costos.

2.7 Bioaumentación

La eficiencia de la producción de H_2 depende de las condiciones operativas y de la comunidad microbiana. Entre ellos, tanto la estructura como la naturaleza de la comunidad microbiana son factores cruciales para lograr dicha eficiencia (Wong *et al.*, 2014).



Una estrategia que se ha llevado a cabo para mejorar la producción de H₂ con diferentes grados de éxito es la bioaumentación (Ma *et al.*, 2009), la cual consiste en aumentar la comunidad microbiana nativa con cepas en crecimiento activo deseadas y especializadas con el fin de mejorar la capacidad microbiana para soportar las fluctuaciones del proceso y mejorar la degradación del sustrato (Venkata *et al.*, 2005).

La estrategia de bioaumentación se ha utilizado para varios propósitos, como mejorar el rendimiento del reactor, proteger a la comunidad microbiana de los efectos adversos (Venkata *et al.*, 2005), mejorar la puesta en marcha del reactor (Ma *et al.*, 2009), y compensar la sobrecarga hidráulica (Chong *et al.*, 1997). La bioaumentación también puede ser eficaz para superar la inhibición durante el proceso de producción de H₂ (Sharma & Melkania, 2018).

2.7.1 Fallas en la bioaumentación

Una de las principales fallas reportadas en la bioaumentación es que las cepas seleccionadas a menudo no muestran en condiciones ambientales las habilidades observadas como cultivos puros en el laboratorio, incluso en presencia de nutrientes adicionales (Boon *et al.*, 2000). Además, la interacción de los microorganismos inoculados al nuevo ambiente, en términos de actividad, supervivencia y migración, puede ser crítica en el éxito de cualquier estrategia de bioaumentación (El Fantroussi & Agathos, 2005).

La bioaumentación puede cambiar la composición de la comunidad microbiana nativa, por competencia e inhibición, provocando cambios positivos o negativos. Se ha reportado que a pesar de un incremento significativo en el rendimiento del reactor después de la bioaumentación, estos efectos positivos se mantienen por un corto periodo (Yu *et al.*, 2010).

En resumen, los problemas observados durante la aplicación de esta estrategia son (Tabla 17): limitación del crecimiento debido a condiciones de baja concentración de sustrato, presencia de sustancias inhibitorias liberadas por microorganismos antagónicos (e.g. antibióticos o bacteriocinas) y una disminución en la capacidad de formación de biopelículas (Songzhe *et al.*, 2009).



Tabla 17. Fallas presentadas durante la bioaumentación en la producción de H₂.

Sustrato/ Inóculo	Reactor	Cepa bioaumentada	Razón de falla	Referencia
Plumas de pollo/ lodo anaerobio de cervecera	Ensayo en lote	<i>Fervidobacterium pennivorans</i> (2.5 mL)	Acumulación de amoníaco y AGV.	(Costa <i>et al.</i> , 2012)
Residuos de cocina-césped/lodo anaerobio de residuos domésticos	CSTR	<i>Clostridium</i> sp. TCW1	Baja concentración de sustrato provocó competencia entre la comunidad nativa y <i>Clostridium</i> , disminuyendo la producción de H ₂ .	(Kuo <i>et al.</i> , 2012)
Residuos de papa/Lodo anaerobio de cervecera	Ensayo en lote	<i>Hydrogenospira ethanolica</i> (proporción bacteria/lodo 0.24)	Exceso de la adición de la cepa produjo un cambio en la comunidad microbiana favoreciendo el consumo de H ₂ .	(Yang <i>et al.</i> , 2016)



3. ANTECEDENTES

Anteriormente, la habilidad de producir H₂ en ambientes anaerobios mesofílicos se atribuía estrictamente a las especies *Clostridium*. Con la aparición de técnicas de caracterización molecular, varios trabajos han reportado evidencia genómica de la presencia, diversidad y actividad de otras comunidades bacterianas en la producción de H₂ (Cabrol *et al.*, 2017).

Marone *et al.*, (2012) evaluaron las especies de *Buttiauxella* sp.4, *Rahnella* sp. 10 y *Raoultella* sp. 47 en la mejora de la conversión de residuos vegetales a H₂. Los microorganismos pertenecientes a estos tres géneros son ampliamente conocidos por ser anaerobios facultativos, metabólicamente versátiles y capaces de crecer con el mínimo de sales minerales y de utilizar un amplio rango de fuentes de carbono (Bergey & Holt, 2000). En dicho estudio, las tres cepas evaluadas promovieron un incremento significativo en el Y_{H2} comparado con el control. *Buttiauxella* sp. 4 mostró el mejor desempeño (71.27 mL H₂/g SV), seguido de *Raoultella* sp. 47 (69.70 mL H₂/g SV) y *Rahnella* sp. 10 (47.54 mL H₂/g SV).

Sharma y Melkania, (2018) han reportado la bioaumentación con especies como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Enterobacter aerogenes* en la producción de H₂ a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos municipales (FORSM). Entre las actividades metabólicas de las cepas *E. coli* y *E. aerogenes* se encuentran la capacidad para producir H₂ (Das & Veziroğlu, 2001), similar a *B. subtilis*, cepa que posee muchas aplicaciones industriales y puede emplearse en un amplio rango de fuentes de carbono (Li & Fang, 2007; Goud *et al.*, 2012). Los valores más altos de volumen acumulado y producción volumétrica de H₂ (564.4 ± 10.9 mL y 1.61 L_{H2}/L_{sustrato}) fueron obtenidas con *B. subtilis*, seguido de *E. aerogenes* (486.3 ± 10.6 mL y 1.38 L_{H2}/L_{sustrato}) y *E. coli* (423.4 ± 10.6 mL y 1.20 L_{H2}/L_{sustrato}) con una relación bacteria/sustrato de: 0.25, 0.20 y 0.20, respectivamente.

Durante la FO y empleando como sustrato paja de trigo, Valdez-Vazquez *et al.*, (2019) evaluaron la bioaumentación de cepas *Clostridium cellulovorans* (Cc), conocidas por su capacidad hidrolítica para degradar compuestos como celulosa (Wen *et al.*, 2014), y *Clostridium acetobutylicum* (Ca), cuya actividad fermentativa permite la producción de H₂ a partir de compuestos solubles (Valdez-Vazquez *et al.*, 2015). Como inóculo se emplearon 36 mL de una o ambas cepas en diferentes proporciones de inoculación (Cc:Ca): 4:1, 1:4, 1:0 y 0:1, obteniéndose los valores más altos de H_{max} (cantidad máxima de H₂ producido) y R_{max} (tasa de producción de H₂) con una proporción de 0:1 (120 mL H₂/L y 5.0 mL H₂/h), seguida de 1:0 (111 mL H₂/L y 4.0 mL H₂/h) y finalmente, 4:1 (76 mL H₂/L y 3.0 mL H₂/h). Estos resultados indican que no se logró una cooperación sinérgica entre las dos cepas, por lo que se obtuvieron mejores desempeños cuando un solo microorganismo fue bioaumentado con suficiente concentración para competir con los miembros del consorcio nativo por los nutrientes.



Cabe mencionar que en ninguno de los estudios mencionados se empleó inóculo como lodo anaerobio, es decir, se evaluó la capacidad de producción de H₂ correspondiente a cada cepa de estudio, los cuales se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Efecto de la bioaumentación de diferentes cepas microbianas en la producción de H₂.

Cepa	Bioaumentación	Sustrato	H _{max} (mL H ₂ /L _{reactor})		Referencia
			Control	Bioaumentación	
<i>Buttiauxella</i> sp.4	10% v/v a una concentración celular de DO ₆₀₀	Residuos vegetales	201.80	672.00	(Marone <i>et al.</i> , 2012).
<i>Rahnella</i> sp. 10	10% v/v a una concentración celular de DO ₆₀₀	Residuos vegetales	201.80	448.40	(Marone <i>et al.</i> , 2012).
<i>Raoultella</i> sp. 47	10% v/v a una concentración celular de DO ₆₀₀	Residuos vegetales	201.80	807.60	(Marone <i>et al.</i> , 2012).
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Relación bacteria/sustrato: 0.20	FORSM*	636.57	1389.42	(Sharma & Melkania, 2018).
<i>Escherichia coli</i>	Relación bacteria/sustrato: 0.20	FORSM	628.00	1209.71	(Sharma & Melkania, 2018).
<i>Bacillus subtilis</i>	Relación bacteria/sustrato: 0.25	FORSM	661.14	1612.57	(Sharma & Melkania, 2018).
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Proporción v/v: 1:0	Paja de trigo	21.00	111.00	(Valdez-Vazquez <i>et al.</i> , 2019).
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Proporción v/v: 0:1	Paja de trigo	21.00	120.00	(Valdez-Vazquez <i>et al.</i> , 2019).

*FORSM esterilizada a 121 °C y 15 psi durante 30 minutos.

En conclusión, en los últimos años se han realizado estudios de bioaumentación empleando diferentes especies de microorganismos y sustratos, obteniéndose una mejora en la producción de H₂. Si bien, dichos estudios han sido un punto de partida para entender la complejidad de la aplicación de este método, también resulta necesario realizar investigaciones que permitan determinar el efecto de los microorganismos añadidos a un sistema fermentativo de cultivo mixto para la producción de H₂ y de este modo, diseñar estrategias para aumentar dicha producción y al mismo tiempo, procurar la estabilidad del sistema.



4. JUSTIFICACIÓN

La inseguridad energética y la contaminación ambiental son quizás los mayores desafíos que la humanidad ha enfrentado en el siglo XXI. La emisión de CO₂ y, por consiguiente, el calentamiento global, impulsan la búsqueda de fuentes de energía alternativas a los combustibles fósiles. En la actualidad, el uso de bioenergía es la mejor opción para el desarrollo económico y la mejora de la calidad de vida en los países en desarrollo (Ebner *et al.*, 2015)

La producción de biogás a través de la DA ofrece ventajas significativas sobre otras formas de obtención de bioenergía. Las regulaciones en la emisión de CO₂, los impuestos al carbono y los subsidios por el uso de energías renovables hacen de la DA una tecnología más atractiva y competitiva para la gestión de residuos (Adekunle & Okolie, 2015).

Teniendo en cuenta los impactos ambientales negativos de los rellenos sanitarios, la incineración o compostaje de RA (Lin *et al.*, 2013; Posmanik *et al.*, 2017), la DA ha sido propuesta como una tecnología rentable para la producción de energía renovable y el tratamiento de residuos de este material rico en humedad y alta energía (Romero-Güiza *et al.*, 2016).

Sin embargo, este proceso resulta ser un ecosistema complejo y diverso que depende de microorganismos que interactúan entre sí y de reacciones interconectadas, donde los productores directos de H₂ no son los únicos que participan en dicho ecosistema. Con el desarrollo de herramientas moleculares se ha revelado una amplia diversidad filogenética que contribuye de diferentes maneras, en su mayoría poco claras, a la producción de H₂ durante la fermentación oscura de sustratos complejos. Siendo la cepa *Clostridium* sp. considerada como el productor de H₂ más eficiente debido a su alto rendimiento teórico, su uso resulta poco práctico debido a los requerimientos anaerobios, por consiguiente, otros microorganismos como los anaerobios facultativos pueden resultar útiles gracias a su tolerancia al O₂, altos rendimientos y versatilidad metabólica (Cabrol *et al.*, 2017).

Por lo anterior, el estudio de la bioaumentación como estrategia de mejora para la producción de H₂ resulta de gran importancia, ya que un mejor conocimiento de las interacciones microbianas podría permitir seleccionar y enriquecer microorganismos específicos y, por tanto, desarrollar una comunidad para lograr una función de interés (e.g. regulación de pH, hidrólisis de sustratos recalcitrantes, agregación celular, consumo de O₂) que contribuya positivamente al desempeño global del sistema.



5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo General*

Evaluar el efecto de la bioaumentación de cepas productoras de H₂ y cepas hidrolíticas sobre la producción de H₂ durante la fermentación oscura, en un sistema discontinuo empleando RA como sustrato.

5.2 *Objetivos Particulares*

- Comparar el efecto de la adición de microorganismos productores de H₂ (*Clostridium saccharobutylicum* y *C. beijerinckii*) y microorganismos hidrolíticos (*Paenibacillus polymyxa* y *Bacillus subtilis*) sobre la producción de H₂ en reactores en lote empleando RA.
- Determinar el efecto de la adición de una cepa hidrolítica (*Bacillus subtilis*) sobre la producción de H₂ en un ASBR a escala laboratorio.

6. ALCANCES

- Se utilizaron al menos cuatro cepas puras para conocer su efecto sobre la producción de H₂ en pruebas en lote en un equipo de medición automática de biogás (AMPTS-II).
- Se determinó la concentración de microorganismos que potencian la producción de H₂.
- Se llevó a cabo la bioaumentación de una cepa hidrolítica en la producción de H₂ en un ASBR escala laboratorio (1L) en condiciones mesofílicas.

7. METAS

- Se determinó un umbral de concentración de microorganismos en el medio que potencialice o disminuya la producción de H₂.
- Se evaluó la factibilidad de emplear la bioaumentación en un sistema de producción de H₂ operado a largo plazo.



8. METODOLOGÍA

El trabajo de investigación se realizó en dos etapas. La primera consistió en la evaluación del potencial bioquímico de H₂ durante la bioaumentación de cepas puras de microorganismos en la fermentación oscura, empleando un equipo de medición automática de biogás, AMPTS-II (Bioprocess Control, Suecia). La segunda etapa se enfocó en la caracterización de los consorcios microbianos durante la operación de un reactor ASBR, en el que se aplicó la mejor bioaumentación de acuerdo con los resultados de la etapa 1. En la Figura 6 se presenta el esquema metodológico implementado en el presente estudio y sus etapas.

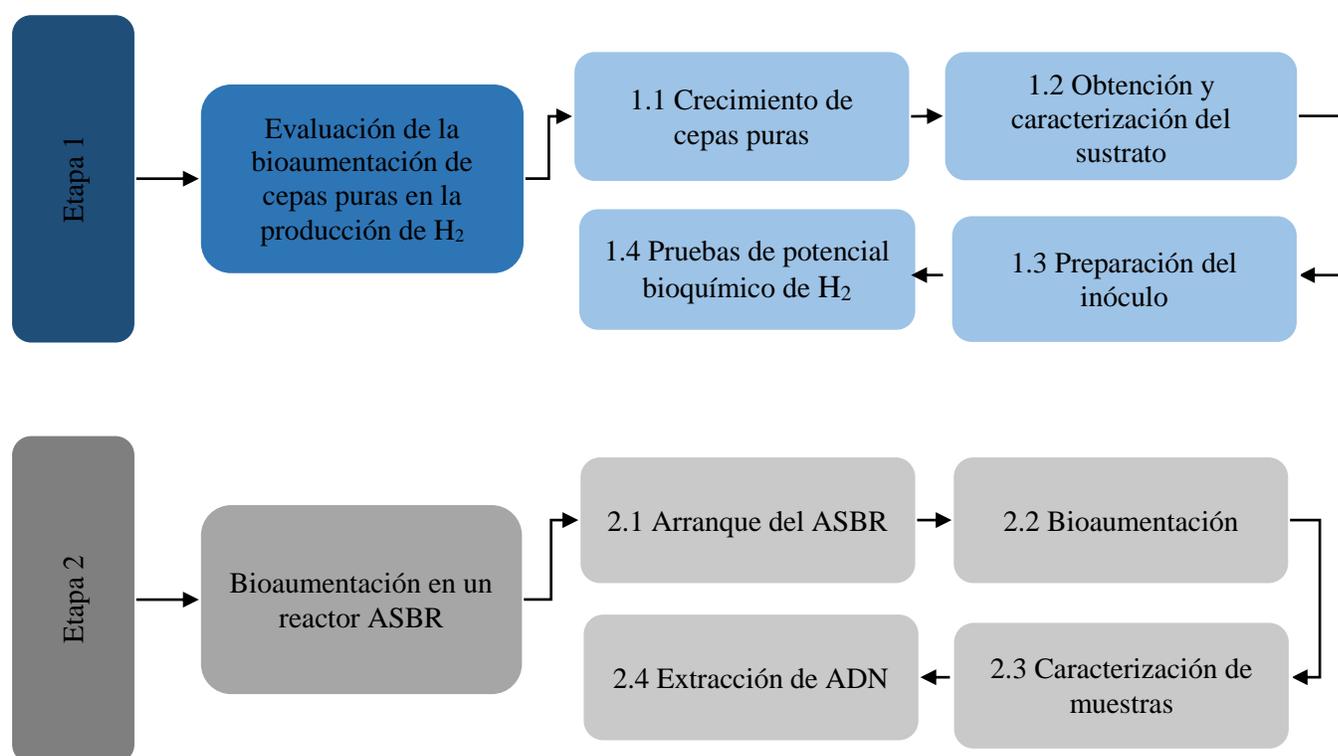


Figura 6. Esquema metodológico.



8.1 Etapa 1. Evaluación de la bioaumentación de cepas puras en la producción de H₂

Se llevó a cabo la evaluación de bioaumentación de cepas puras del género *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Clostridium* en la producción de H₂, utilizando como sustrato RA de un restaurante.

8.1.1 Crecimiento de cepas puras

Para la primera etapa de experimentación, se emplearon las cepas puras de *Bacillus subtilis* ATCC® 6051a™, *Paenibacillus polymyxa* ATCC® 842™, *Clostridium saccharobutylicum* ATCC® BAA-117™ y *Clostridium beijerinckii* ATCC® 10132™.

Para las primeras dos cepas se utilizaron medios de cultivos sólidos de agar nutritivo, las cuales después de inocularlas, se incubaron a 30 °C durante 3 días. Con las colonias obtenidas se inocularon medios de cultivo líquidos, los cuales consistieron en botellas serológicas de 100 mL de capacidad, con 50 mL de caldo nutritivo: N7519 Sigma-Aldrich (3 g/L de extracto de carne y 5 g/L de peptona) y 15 mg/L de glucosa, las cuales fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C y 1.5 atm durante 20 minutos antes de inocularlas. Se aplicaron las mismas condiciones de temperatura y tiempo de incubación mencionadas anteriormente.

Para el caso de las cepas *Clostridium* se utilizó únicamente medio de cultivo líquido: 10 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de carne, 3 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de glucosa, 5 g/L de cloruro de sodio, 3 g/L de acetato de sodio y 0.5 g/L de L-cisteína. De igual forma, se emplearon botellas serológicas, las cuales fueron llenadas con 50 mL de caldo de cultivo y posteriormente, gaseadas durante un minuto con nitrógeno para remover el O₂ y así proporcionar un ambiente anaerobio. Finalmente, se esterilizaron en autoclave a las condiciones previamente mencionadas. Dichas botellas fueron inoculadas con 10 mL de la cepa (obtenidas previamente en medio líquido) e incubadas a 37 °C durante 3 días.

Las condiciones y medios de cultivo empleados para el crecimiento de cada cepa se especifican en el American Type Culture Collection (ATCC), los cuales se resumen en la Tabla 19.

Con las cepas crecidas en medio líquido (500 mL), se inocularon 4 L de caldo de cultivo, el cual fue incubado utilizando un reactor Sartorius Stedim BIOSTAT® A a 30 °C durante 3 días para el caso de las cepas *Bacillus* y *Paenibacillus* y a 37 °C durante 3 días para el caso de las *Clostridium* (Figura 7). Para todos los casos se añadió 15 g/L de glucosa para favorecer su crecimiento y se utilizó una agitación de 75 rpm. Tanto el recipiente como el sistema de agitación fueron esterilizados previamente mediante luz ultravioleta en 3 ciclos de 15 minutos para evitar contaminación.



Tabla 19. Condiciones de cultivo para cepas puras de acuerdo al ATCC.

Cepa	Medio de cultivo	Temperatura	Atmósfera	pH
<i>Paenibacillus polymyxa</i> (ATCC® 842™)	ATCC® Medio 3: Agar / caldo Nutritivo	30 °C	Aerobia*	6.8
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC® 6051a™)	ATCC® Medio 3: Agar / caldo Nutritivo	30 °C	Aerobia*	6.8
<i>Clostridium</i> <i>saccharobutylicum</i> (ATCC® BAA-117™)	ATCC® Medio: 2107 agar / caldo clostridial reforzado	37 °C	Anaerobia **	6.8
<i>Clostridium beijerinckii</i> (ATCC® 10132™)	ATCC® Medio: 2107 agar / caldo clostridial reforzado	37 °C	Anaerobia **	6.8

Aerobia*: 78% de N₂, 21% O₂ y 1% de otros. **Anaerobia**:** mezcla de gas 80% de H₂ y 20% de CO₂.

8.1.2 Obtención y caracterización del sustrato

Para realizar el presente proyecto, se utilizaron residuos de alimentos provenientes de un restaurante, los cuales, se caracterizaron tomando en cuenta parámetros como sólidos totales (ST), SV, carbohidratos totales, DQO y pH.



Figura 7. Cultivo de cepas puras para su uso en los ensayos.



8.1.3 Preparación del inóculo

Como inóculo, se empleó lodo anaerobio granular proveniente de una cervecera, el cual, se sometió a un tratamiento térmico a 105 °C durante 24 horas para inhibir la actividad metanogénica y obtener esporas de microorganismos productores de H₂ (Buitrón & Carvajal, 2010). Después, se procedió a moler el lodo y tamizarlo con un tamiz del número 80 y abertura de 0.177 mm. Cabe mencionar, que dicho lodo resultó con una concentración de 0.67 g SV/g inóculo.

8.1.4 Pruebas de potencial bioquímico de H₂ (PBH)

Utilizando el equipo AMPTS-II para la medición automática de biogás (Figura 8), se evaluó el PBH para cada una de las cepas estudiadas, utilizando como sustrato RA, lodo anaerobio pretratado térmicamente como inóculo y diferentes concentraciones de las cepas estudiadas para la bioaumentación.

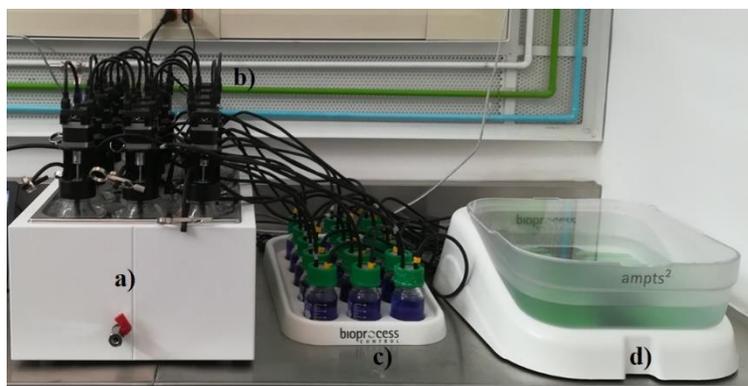


Figura 8. Montaje experimental de la Prueba de Potencial Bioquímico de H₂: a) Baño regulador de temperatura, b) Reactores con agitación, c) Trampa de CO₂ con solución alcalina y d) Sistema de medición de volumen de biogás.

El ensayo se basó en el protocolo de producción específica de H₂ de la Red Latinoamericana de BioH₂ (Carrillo-Reyes *et al.*, 2019) y se llevó a cabo por duplicado en el equipo de medición automática de biogás (ajustado para cuantificar un aproximado de 60% de H₂ en el biogás), que cuenta con una trampa de sosa (NaOH 3N) para capturar el CO₂ producido. Se emplearon botellas Schott con un volumen total de 600 mL y un volumen de trabajo de 460 mL, a las que se le agregó 22 mL de medio mineral con nutrientes y MES, 10 g SV/L de RA, 5 gSV/L de lodo tratado térmicamente y la bioaumentación de la cepa: 1x, 2x, 3x y 4x, que corresponden a la cantidad de microorganismos cuantificados por Densidad óptica (DO), los cuales se presentan en el Apartado de Métodos Analíticos. Para evaluar la producción de H₂ sin la bioaumentación, a las botellas se les agregó únicamente RA, lodo anaerobio como inóculo y medio mineral, empleando las mismas



concentraciones mencionadas, y se denominaron Control (lodo + RA). La configuración de los ensayos de bioaumentación se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20. Configuración de ensayos en lote.

Cepa	Bioaumentación	Residuo de Alimentos	Inóculo
Pp	1x	10 gSV/L	5 gSV/L
	2x		
	3x		
	4x		
Bs	1x	10 gSV/L	5 gSV/L
	2x		
	3x		
	4x		
Cs	1x	10 gSV/L	5 gSV/L
	2x		
	3x		
	4x		
Cb	1x	10 gSV/L	5 gSV/L
	2x		
	3x		
	4x		

Adicionalmente se llevaron a cabo controles con glucosa (10 g/L) y controles con medio de cultivo empleado en la bioaumentación (esterilizado previamente en autoclave y luz ultravioleta) para descartar una posible influencia de la composición de éste en la producción de H₂. Las configuraciones de todos los ensayos llevados a cabo se muestran en el apartado de Anexos.

El pH inicial se ajustó a 7.5 con una solución 10N de hidróxido de sodio. El espacio de cabeza fue purgado con nitrógeno durante un minuto para asegurar condiciones anaerobias. Se mantuvo una temperatura de 37 °C y una agitación de 120 rpm durante un minuto por cada tres minutos de descanso del motor en el transcurso del experimento, el cual finalizó hasta obtener una curva de producción de H₂ asintótica (30 horas).

La producción de H₂ se determinó de forma continua en el equipo; la DQO, carbohidratos totales y AGV se determinaron al final del experimento de acuerdo con los métodos descritos en el apartado de Métodos Analíticos.



8.1.4.1 Determinación de parámetros cinéticos

El modelo de Gompertz fue originalmente usado para describir la distribución de edad en poblaciones humanas, no obstante, fue modificado para modelar el crecimiento microbiano (Zwietering *et al.*, 1990) y actualmente es empleado en numerosos estudios de producción de H₂ para la determinación de parámetros cinéticos (Ginkel *et al.*, 2001; Mu *et al.*, 2006; Gadhamshetty *et al.*, 2010; Sangyoka *et al.*, 2016; Tapia-Rodríguez *et al.*, 2019). El modelo modificado describe el crecimiento de bacterias en cultivos en lote, mostrando una tasa de crecimiento específica que comienza en un valor de cero y posteriormente acelera hasta un valor máximo (μ), lo cual ocurre en un cierto periodo de tiempo denominado fase lag (λ), para finalmente llegar a la fase en la que la tasa de crecimiento disminuye y llega a cero, donde se alcanza la asíntota. Cuando esta curva de crecimiento se define como el logaritmo del número de microorganismos con respecto al tiempo, los cambios en la tasa de crecimiento dan como resultado una curva sigmoidea (Figura 9), con una fase lag justo después de tiempo igual a cero, seguida de una fase exponencial y finalmente una fase estacionaria (Zwietering *et al.*, 1990). Asumiendo que la producción de biogás es proporcional a la actividad microbiana, se emplea la ecuación modificada de Gompertz para analizar y describir la producción de biogás durante cada fase (Nielfa *et al.*, 2015).

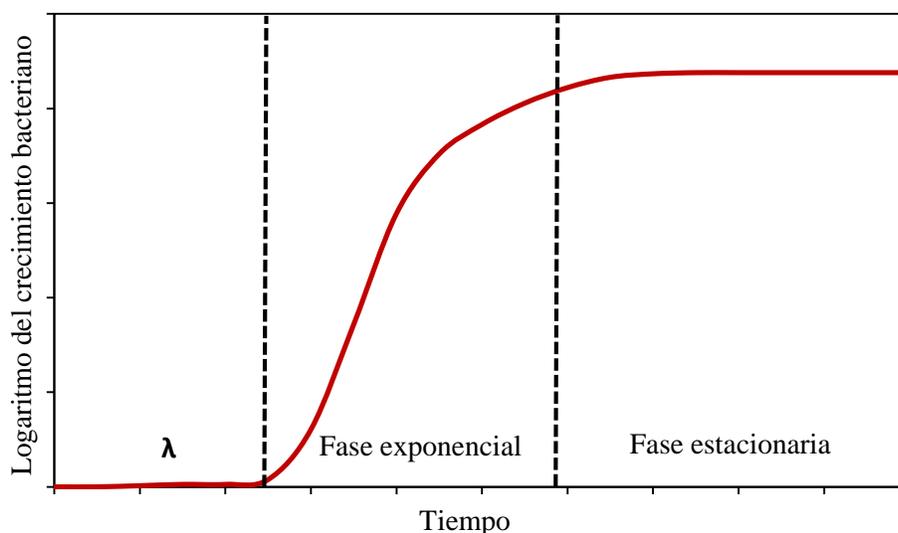


Figura 9. Curva de crecimiento bacteriano.

Fuente: Adaptado de Zwietering *et al.*, 1990.

Por lo tanto, los datos de volumen de H₂ acumulado se ajustaron a la ecuación modificada de Gompertz, la cual se expresa a continuación:



$$H(t) = H_{max} \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{max}}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Ecuación 4

Donde $H(t)$ (mL H_2 /L) es la cantidad total de H_2 producido durante el ensayo (h); H_{max} (mL) es la cantidad máxima de H_2 producido, R_{max} (mL H_2 /h) es la tasa de producción y λ (h) es la fase lag o el tiempo antes de la producción exponencial.

8.2 Etapa 2. Bioaugmentación en un reactor ASBR

8.2.1 Arranque del ASBR

En esta etapa se llevó a cabo el arranque de un reactor ASBR a escala laboratorio, con un volumen de trabajo de 1 L para la producción de H_2 (Figura 10). Dicho reactor consistió en un recipiente de acrílico, el cual se instrumentó con un sensor de pH y un termómetro. Para mantener el sistema completamente mezclado, se utilizó un agitador magnético en el fondo del reactor y una parrilla de agitación, con un ajuste de 150 rpm. La temperatura ($37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) fue controlada por medio de un recirculador de agua a través de una tubería colocada alrededor del reactor. Para la medición del volumen de biogás producido se empleó una probeta invertida con una solución saturada de sal y acidificada a un pH menor a dos. El sistema se operó bajo las siguientes condiciones: llenado: 5 minutos, reacción: 23 horas, sedimentación: 60 minutos y vaciado: 5 minutos.



Figura 10. Reactor ASBR para la producción de H_2 .



Como inóculo se emplearon 10 gSV/L de lodo anaerobio tratado térmicamente para inhibir la presencia de arqueas metanogénicas. El TRH fue de 48 horas y el tiempo de retención celular (TRC) de 9.5 días. Se operó con una CO de 5 gSV/L día de RA (4.2 g carbohidratos/L día) y un volumen de intercambio de 500 mL. El pH del sistema se mantuvo en un rango de 5.5-5.0, adicionando 1 g/L de bicarbonato de sodio junto con la alimentación.

8.2.2 Bioaumentación

De acuerdo con los resultados obtenidos en la etapa 1, se llevó a cabo la bioaumentación que obtuvo los mejores desempeños en la producción de H₂ según los análisis estadísticos realizados, la cual resultó ser el tratamiento Bs 4x, por tanto, se procedió a la obtención de la cepa correspondiente al volumen de trabajo.

8.2.3 Caracterización de muestras

Durante la operación del ASBR se realizó el seguimiento del pH, la DQO total, la concentración de ST y SV de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 2005) y la composición del biogás y AGV de acuerdo con lo descrito en el apartado Métodos Analíticos. Se evaluó la producción y Y_{H₂}, la remoción de ST y DQO y la producción de AGV.

8.3 Métodos Analíticos

En la Tabla 21 se presentan los métodos analíticos empleados durante el experimento para la determinación de diferentes parámetros de interés para el presente estudio.

Tabla 21. Métodos analíticos.

Determinación	Método
Sólidos Totales (ST)	Gravimetría. Sólidos secados a una temperatura de 103 a 105 °C (APHA, 2540- B).
Sólidos volátiles (SV)	Gravimetría. Sólidos previamente secados a 103 °C - 105 °C e incinerados a 550°C (APHA, 2540-E).
DQO	Colorimétrico. Digestión por reflujo cerrado a 150°C con reactivos preparados HACH, lectura a 600 nm (APHA, 5220-D)
Carbohidratos	Colorimétrico fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois <i>et al.</i> , (1956).



AGV	Cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (FID) marca Agilent Technologies 7890B, equipado con una columna DB-FFAP de 15 metros de largo y 1 μm de espesor. La temperatura del inyector fue mantenida a 190 °C y la del detector a 210 °C. Como gas portador se utilizó nitrógeno, empleando un flujo de 25 mL/min.
Composición de biogás	Cromatógrafo de gases SRI 8610C equipado con un detector de conductividad térmica y una columna Carboxen 1010 de 30 m de largo (ID: 0.53 mm). Las temperaturas del inyector, columna y detector fueron de 200, 100 y 230 °C, respectivamente. Se usó nitrógeno a un caudal de 4 mL/min como gas portador.
Cuantificación de microorganismos	Medición de la absorbancia de los volúmenes empleados en los ensayos en lote a una longitud de onda de 540 nm, para posteriormente, relacionarla con las unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL) de acuerdo con la curva de calibración realizada por Paramo (2018). Los microorganismos presentes en cada bioaumentación evaluada se encuentran en la Tabla 22.
Extracción de ADN	Kit Power Soil DNA Extraction kit® (Mo Bio Laboratories Inc., Carlsbad, C. A., USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis del ADN fue realizado por un servicio externo de secuenciación masiva en el Research and Testing Laboratory, RTL (Lubbock, Texas, USA) el cual lleva a cabo el protocolo de secuenciación usando la plataforma MiSeq.

Tabla 22. Determinación de microorganismos presentes en las bioaumentaciones empleadas.

Cepa*	UFC/mL/L _{reactor}			
	Bioaumentación 1x	Bioaumentación 2x	Bioaumentación 3x	Bioaumentación 4x
Pp	9.2 x 10 ⁸	1.8 x 10 ⁹	2.7 x 10 ⁹	3.7 x 10 ⁹
Bs	8.7 x 10 ⁸	1.7 x 10 ⁹	2.6 x 10 ⁹	3.5 x 10 ⁹
Cs	7.6 x 10 ⁸	1.5 x 10 ⁹	2.2 x 10 ⁹	3.0 x 10 ⁹
Cb	8.8 x 10 ⁸	1.7 x 10 ⁹	2.6 x 10 ⁹	3.5 x 10 ⁹

*Abreviaciones: Pp: *P. polymyxa*, Bs: *B. subtilis*, Cs: *C. saccharobutylicum*, Cb: *C. beijerinckii*.



8.3.1 Balance de masa

Con el objetivo de evaluar el efecto de la bioaumentación sobre la producción de H_2 durante la operación del ASBR, se realizó un balance de masa para la determinación de la cantidad de DQO destinada a la producción de este compuesto, así como de los AGV, empleando las siguientes ecuaciones:

$$DQO_e = DQO_s \quad \text{Ecuación 5}$$

$$DQO_s = DQO_{AGVs} + DQO_{H_2} + DQO_{ND} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

DQO_e : DQO de entrada o correspondiente a la alimentación del reactor por ciclo.

DQO_s : DQO de salida del reactor por ciclo.

DQO_{AGV} : Producción de AGV durante un ciclo en términos de DQO.

DQO_{H_2} : Producción de H_2 durante un ciclo en términos de DQO.

DQO_{ND} : Producción de otros metabolitos no determinados (por las técnicas de caracterización) durante un ciclo en términos de DQO.

Hay que notar, que para la determinación de la DQO_{ND} basta con despejar la Ecuación 6, ya que las demás variables se han calculado de forma experimental durante la operación del reactor.

Así mismo, se consideró como DQO_e la correspondiente a la concentración del sustrato en el reactor (10 gSV/L), es decir 8.5 gDQO/L.



9. RESULTADOS

9.1 Etapa 1. Evaluación de la bioaumentación de cepas puras en la producción de H_2 a partir de RA

Se llevó a cabo la medición de biogás producido en los ensayos en lote para cada una de las cepas evaluadas: Pp, Bs, Cs y Cb. Los resultados se presentan en las Figuras 11 a la 14, en donde se aprecia el promedio del volumen acumulado de H_2 por gSV de sustrato inicial durante el ensayo para cada una de las cepas mencionadas.

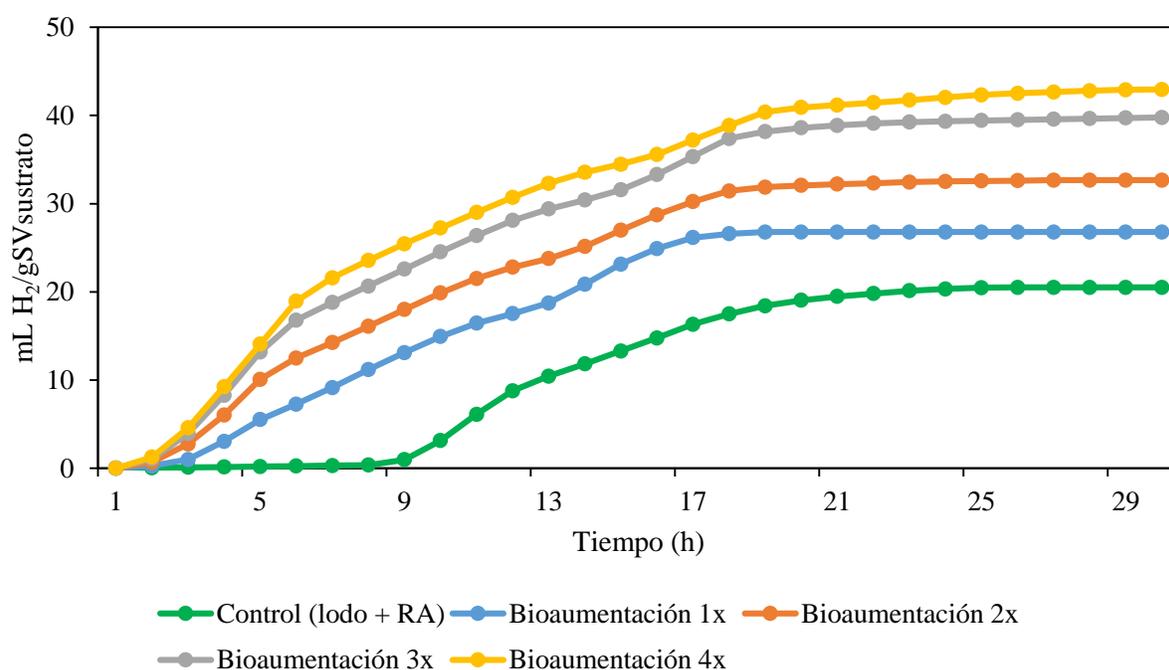


Figura 11. Volumen de H_2 producido por la cepa *Paenibacillus polymyxa*.

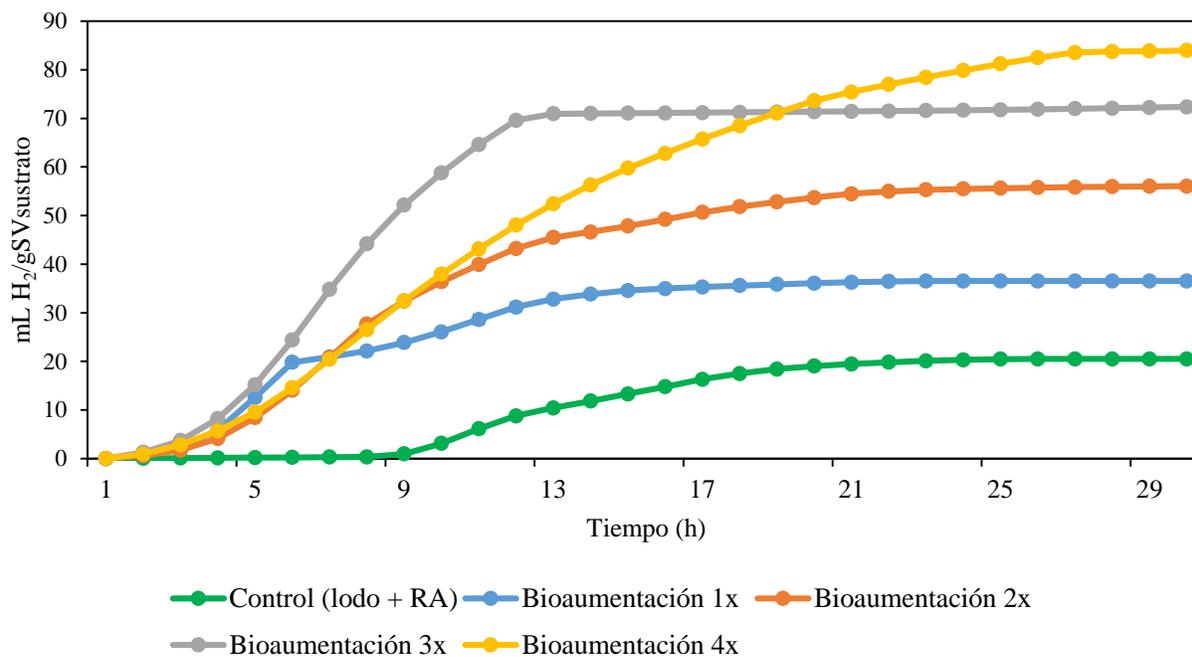


Figura 12. Volumen de H₂ producido por la cepa *Bacillus subtilis*.

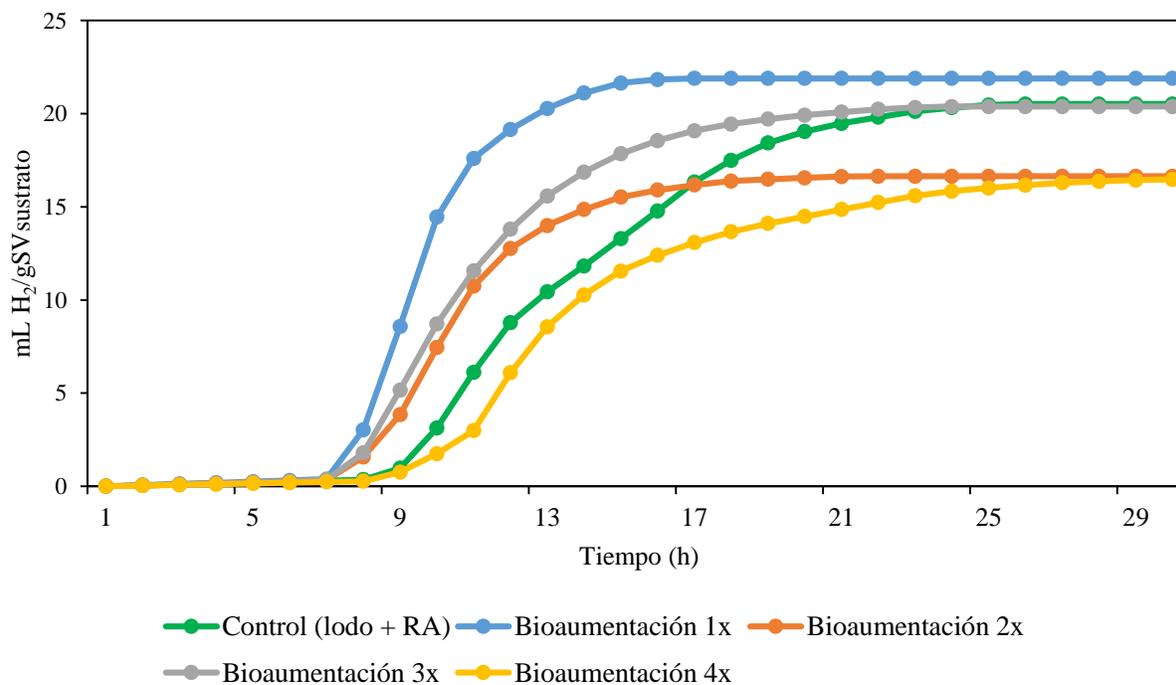


Figura 13. Volumen de H₂ producido por la cepa *Clostridium saccharobutylicum*.

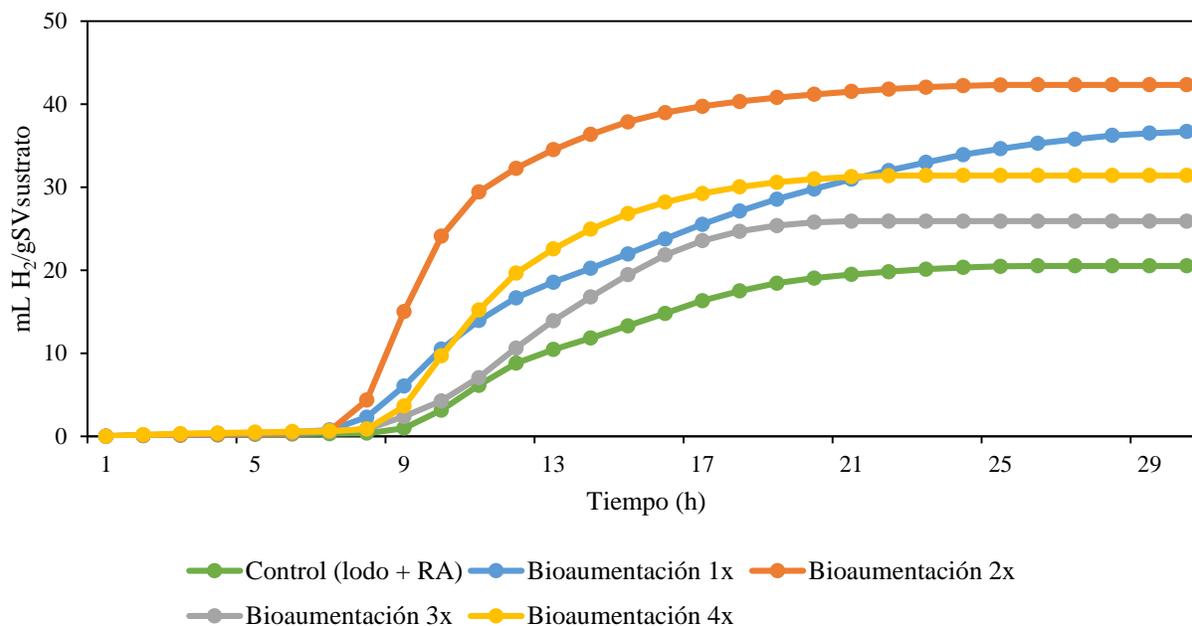


Figura 14. Volumen de H₂ producido por la cepa *Clostridium beijerinckii*.

Las bioaumentaciones con la cepa Pp mejoraron la producción de H₂ con respecto al control, obteniendo valores de hasta 42.95 mL H₂/gSV con el tratamiento 4x, en contraste con lo obtenido sin la adición de esta cepa (20.51 mL H₂/gSV).

De manera similar, la adición de Bs también mejoró la producción de H₂, siendo la bioaumentación 4x el que obtuvo el valor más alto (84.5 mL H₂/gSV), seguido de 3x (73.66 mL H₂/gSV) y 2x (56.43 mL H₂/gSV). Este aumento de la producción de H₂ ha sido reportado por Sharma & Melkania, (2018) con la adición de Bs en la FO de la FORSM, atribuyendo dicho incremento a una cooperación sinérgica entre los microorganismos añadidos y la comunidad nativa, lo cual contribuyó a una mejora de la tasa de hidrólisis por lo que los compuestos orgánicos se metabolizaron conduciendo al aumento de la producción de H₂.

Es importante señalar la disminución de la fase lag en la bioaumentación con las cepas hidrolíticas. Si bien el tratamiento térmico del inóculo permite seleccionar microorganismos productores de H₂ formadoras de esporas, es necesario proporcionar condiciones y nutrientes favorables para su rápida germinación (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009), por lo que este tiempo de latencia dependerá de factores como el pH inicial, temperatura, concentración de nutrientes, entre otros. (Valdez-Vazquez *et al.*, 2006). Como se observa en la Figura 11 y 12, con la adición de microorganismos hidrolíticos activos, es posible disminuir la fase lag, lo cual ha sido reportado también por Marone *et al.*, (2012) con la bioaumentación de *Raoultella* sp. 47 (microorganismo



anaerobio facultativo, capaz de emplear un amplio rango de fuentes de carbono) en la FO de residuos vegetales, logrando una reducción de la fase lag de 6 h a 1.2 h, con respecto a la FO sin la adición de la cepa.

A diferencia de las cepas hidrolíticas evaluadas, la adición de Cs mostró un efecto antagónico (Figura 13), ya que únicamente la bioaumentación 1x obtuvo una producción apenas mayor al control (6.7% más). Esta disminución en la producción de H₂ con las demás bioaumentaciones que corresponden a una mayor cantidad de microorganismos añadidos, ya ha sido reportada por otros autores como Sharma & Melkania, (2018) y Kotay & Das, (2010). Los anteriores autores argumentan que la bioaumentación en exceso puede disminuir la producción de H₂ lo cual es atribuido a un cambio en la comunidad microbiana que favorece al consumo de H₂ en lugar de su producción.

En contraste, la adición de Cb mejoró la producción de H₂ con todos los tratamientos empleados, obteniéndose la mayor producción con la bioaumentación 2x (42.34 mL H₂/gSV) y 1x (36.73 mL H₂/gSV), que corresponden a una menor cantidad de microorganismos añadidos, contrario a lo que se observó con la bioaumentación de *B. subtilis* y *P. polymyxa*. El mejor desempeño de cepas hidrolíticas con respecto a las cepas fermentativas en la producción de H₂ fue reportado también por Valdez-Vazquez *et al.*, (2019) quienes empleando como inóculo 36 mL de una o ambas cepas en diferentes proporciones de *Clostridium cellulovorans* y *Clostridium acetobutylicum* (conocidas por su alta capacidad hidrolítica y fermentativa, respectivamente); utilizando paja de trigo como sustrato en la FO, encontraron que las mayores proporciones de cepa hidrolítica versus cepa fermentativa incrementa la producción de H₂ al obtener 76 mL H₂/L_{reactor} con la proporción 4:1 de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum*, respectivamente, comparado con 28 mL H₂/L_{reactor} obtenido con la proporción 1:4. Lo anterior se argumenta a que la cepa hidrolítica jugó un papel relevante al inicio de la FO, hidrolizando parte del sustrato complejo, dando como resultado una mayor disponibilidad de compuestos más solubles para el establecimiento de microorganismos fermentativos, lo cual evidencia que los miembros hidrolíticos deben estar en mayor proporción que los fermentativos para incrementar la producción de H₂.

9.1.1 Análisis estadístico

El efecto de la bioaumentación en la producción de H₂, remoción de carbohidratos, producción de acetato y butirato fue evaluada empleando un análisis de varianza (ANOVA) de dos bloques (bioaumentación, cepa empleada y la interacción entre ambas) con un intervalo de confianza del 95% para determinar una diferencia significativa ($p < 0.05$). Los resultados pueden apreciarse en la Tabla 23.



Tabla 23. Análisis de varianza del efecto de la bioaumentación.

Variable	Bioaumentación	Cepa empleada	Interacción
Producción de H₂	2.53 x 10 ⁻⁵	1.21 x 10 ⁻¹²	5.13 x 10 ⁻⁷
Degradación de carbohidratos	0.0638	6.48 x 10 ⁻⁷	0.332
Producción de acetato	0.0049	1.7 x 10 ⁻⁶	0.690
Producción de butirato	0.0126	3.13 x 10 ⁻⁶	0.787

Como se observa, existe un efecto significativo en el tipo de cepa empleada y la cantidad bioaumentada sobre la producción de H₂, presentando ambos factores una interacción significativa. Por lo anterior, se realizó un análisis de diferencia mínima significativa (LSD, por sus siglas en inglés) con el objetivo de determinar el tratamiento (cepa empleada y su bioaumentación) que logró la mayor cantidad de H₂ producido (Tabla 24 y Figura 15). Referente a la degradación de carbohidratos y producción de AGV como acetato y butirato, también existió un efecto significativo por la cepa y la cantidad añadida, no obstante, no hubo interacción entre ambas.

Tabla 24. Análisis de diferencia mínima significativa de los diferentes tratamientos empleados sobre la producción de H₂.

Tratamiento	mL H₂
Bs 4x	844.95 ± 91.57 ^a
Bs 3x	738.00 ± 58.83 ^b
Bs 2x	564.35 ± 7.71 ^c
Pp 4x	429.50 ± 2.96 ^d
Cb 2x	423.40 ± 7.92 ^d
Pp 3x	397.80 ± 20.51 ^{de}
Cb 1x	367.30 ± 43.55 ^{def}
Bs 1x	365.50 ± 2.40 ^{def}
Pp 2x	326.60 ± 1.70 ^{efg}
Cb 4x	314.15 ± 65.41 ^{fg}
Pp 1x	267.80 ± 12.02 ^{gh}
Cb 3x	259.10 ± 46.39 ^{gh}
Cs 1x	218.95 ± 20.58 ^{gh}
Cs 3x	203.80 ± 29.13 ^{hi}
Cs 2x	166.41 ± 16.98 ⁱ
Cs 4x	164.70 ± 24.75 ⁱ

Nota: Medias acompañadas de la misma literal son estadísticamente similares utilizando la comparación múltiple LSD ($\alpha=0.05$).



De acuerdo con la Figura 15, la cepa Bs mejoró significativamente la producción de H_2 cuando se bioaumentó con las mayores cantidades de UFC/mL (4x y 3x) con respecto a las otras cepas evaluadas. Las menores producciones de H_2 se obtuvieron con Cs en todas las bioaumentaciones aplicadas.

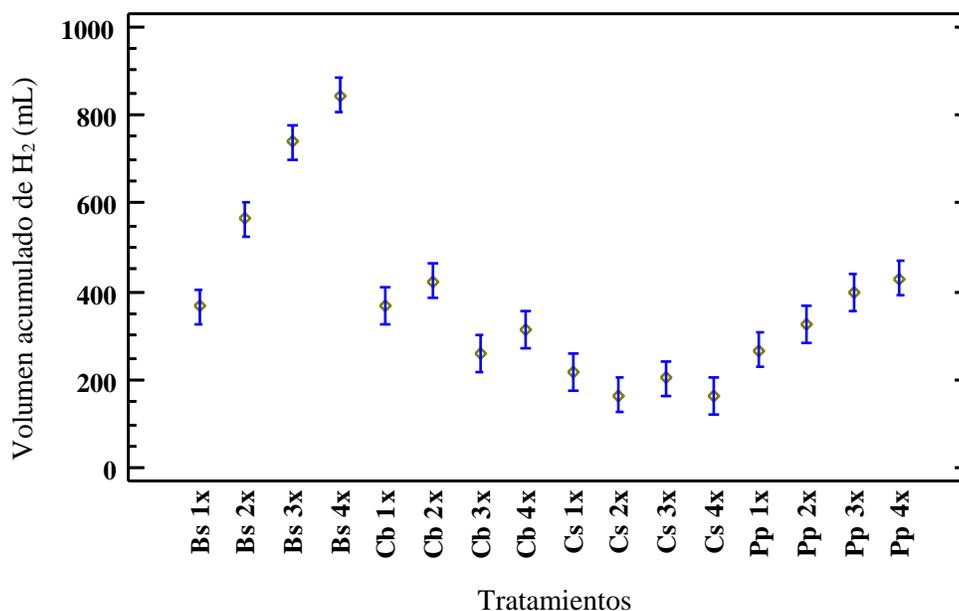


Figura 15. Gráfica de medias de la comparación múltiple correspondiente al volumen acumulado de H_2 de los ensayos en lote.

9.1.1 Determinación de parámetros cinéticos

Los resultados del volumen acumulado de H_2 para cada uno de los ensayos en lote se ajustaron al modelo modificado de Gompertz, cuyos parámetros cinéticos se muestran en la Tabla 25. Se puede apreciar que el valor más alto de H_{max} y R_{max} se obtuvo con la cepa Bs con la bioaumentación 4x (862 mL H_2) y 3x (246 mL H_2/h), respectivamente.



Tabla 25. Resultados del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Gompertz.

Cepa	Control (lodo + RA)	Bioaumentación 1x	Bioaumentación 2x	Bioaumentación 3x	Bioaumentación 4x
H_{max} (mL H₂)					
Pp	206 ± 19	272 ± 12	330 ± 1	400 ± 18	427 ± 3
Bs	206 ± 15	365 ± 3	559 ± 6	720 ± 20	845 ± 27
Cs	206 ± 18	219 ± 19	166 ± 16	202 ± 27	163 ± 24
Cb	205 ± 15	369 ± 30	421 ± 7	261 ± 26	314 ± 23
R_{max} (mL H₂/h)					
Pp	68 ± 4	57 ± 3	69 ± 6	87 ± 2	100 ± 1
Bs	67 ± 1	109 ± 4	157 ± 8	252 ± 4	154 ± 3
Cs	68 ± 3	161 ± 6	95 ± 4	93 ± 6	62 ± 12
Cb	67 ± 1	118 ± 8	206 ± 14	101 ± 6	144 ± 6
λ (h)					
Pp	7.9 ± 1.0	2.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.02
Bs	7.9 ± 1.1	2.1 ± 0.2	4.4 ± 2.3	3.4 ± 0.2	3.5 ± 1.6
Cs	7.9 ± 1.1	6.6 ± 0.4	6.9 ± 0.2	6.7 ± 0.7	8.4 ± 0.1
Cb	8.9 ± 1.2	8.8 ± 2.0	7.14 ± 0.1	9.1 ± 0.1	8.3 ± 0.4
R²					
Pp	0.996	0.997	0.994	0.993	0.994
Bs	0.996	0.989	0.998	0.999	0.998
Cs	0.999	0.999	0.999	0.998	0.998
Cb	0.996	0.997	0.996	0.998	0.999

Nota: Las cifras en negritas corresponden a los valores más altos registrados para cada parámetro.

Comparado con otros estudios de bioaumentación (Tabla 26), el tratamiento Bs 4x obtuvo un mayor H_{max} comparado con lo reportado por Sharma & Melkania, (2018) con la adición de *B. subtilis* (1612 mL H₂/L_{reactor}), *E. aerogenes* (1389 mL H₂/L_{reactor}) y *E. coli* (1209 mL H₂/L_{reactor}) en la FO de la FORSM.



Tabla 26. Valores de H_{max} obtenidos en ensayos en lote empleando la bioaumentación de diferentes cepas microbianas en ensayos en lote a 37 °C.

Cepa	Bioaumentación	Sustrato	pH	H_{max} (mL H_2 /L _{reactor})		Referencia
				Control	Bioaumentación	
<i>E. aerogenes</i>	Relación bacteria/sustrato: 0.20	FORSM _x	5.5	636.57	1389.42	(Sharma & Melkania, 2018)
<i>E. coli</i>	Relación bacteria/sustrato: 0.20	FORSM _x	5.5	628.00	1209.71	(Sharma & Melkania, 2018)
<i>B. subtilis</i>	Relación bacteria/sustrato: 0.25	FORSM _x	5.5	661.14	1612.57	(Sharma & Melkania, 2018)
<i>B. subtilis</i>	4x	RA	7.5	448.00	1836.00	Este estudio
<i>P. polymyxa</i>	4x	RA	7.5	448.00	928.30	Este estudio
<i>C. cellulovorans</i>	Proporción v/v 1:0	Paja de trigo	5.5	21.00	111.00	(Valdez-Vazquez <i>et al.</i> , 2019)
<i>C. acetobutylicum</i>	Proporción v/v 0:1	Paja de trigo	5.5	21.00	120.00	(Valdez-Vazquez <i>et al.</i> , 2019)
<i>C. saccharobutylicum</i>	1x	RA	7.5	448.00	476.10	Este estudio
<i>C. beijerinckii</i> ⁺	-	RA	7.0	-	1155.00	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. beijerinckii</i>	2x	RA	7.5	445.70	915.20	Este estudio

⁺ Ensayos llevados a cabo a 35 °C.

^x FORSM esterilizada a 121 °C y 15 psi durante 30 minutos.

La adición de Bs y el consiguiente aumento de H_2 indica que podría haber una cooperación sinérgica entre este microorganismo y los consorcios nativos (Nkemka *et al.*, 2015). Además, se sabe que dicha cepa produce enzimas extracelulares (como hidrolasas) que facilitan la solubilización de la materia orgánica (Madigan *et al.*, 2004). La cepa Pp también comparte esta característica, lo cual se corroboró con el análisis de varianza realizado, en el que existió un efecto significativo en la degradación de carbohidratos y la cepa empleada ($p < 0.05$), siendo Bs 4x, seguido de Pp 4x los que mostraron el mejor desempeño comparado con las cepas *Clostridium*.



Comparando otras especies de este mismo género, la bioaumentación con Cb 2x obtuvo el mejor desempeño en términos de H_{max} con respecto a lo obtenido con la adición de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum* en la FO reportado por Valdez-Vaquez *et al.*, (2019). Esta diferencia en la producción de H_2 puede deberse al tipo de sustrato empleado y al pH, siendo éste último un factor que influye de manera importante en el desempeño de esta especie, ya que de acuerdo con Kim *et al.*, (2008) quienes evaluaron la bioaumentación con Cb empleando RA de cafetería, se obtuvo una disminución de la producción de H_2 a un pH de 5.0 con respecto a un pH de 7.0 (250 mL $H_2/L_{reactor}$ y 1155.00 $H_2/L_{reactor}$, respectivamente). Lo anterior es atribuido por la inhibición de la actividad hidrogenasa (enzima que convierte los cationes de H^+ a H_2 molecular) debido a un pH de operación bajo causada por la producción concomitante de AGV. De manera adicional, el H_{max} obtenido con Cb reportado por dichos autores resulta ligeramente superior al obtenido en el presente estudio (20% más); si bien el pH de operación fue similar, la diferencia puede deberse a la aclimatación de la cepa con RA llevada a cabo antes de la realización del experimento.

Se realizó la cuantificación AGV de cada una de las muestras de los ensayos en lote. Es importante señalar que existe una diferencia en las proporciones de estos ácidos producidos en las bioaumentaciones evaluadas, siendo el tratamiento Pp 4x la que produjo la mayor cantidad de acetato (3504 ± 70 mg/L), Bs 4x destacó en la producción de butirato (2895 ± 180 mg/L). Las cepas *Clostridium* produjeron principalmente acetato y butirato, obteniendo 4179 ± 138 mg/L y 1831 ± 345 mg/L, respectivamente, con la bioaumentación Cs 3x; mientras que Cb 3x obtuvo 4002 ± 630 mg/L y 1918 ± 222 mg/L, respectivamente.

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos de la producción de AGV y solventes. Es importante mencionar que la diferencia en el desempeño de la producción de H_2 observado en las cuatro cepas evaluadas puede inferirse a la proporción molar de butirato/acetato (B/A), el cual ha sido reportado como un indicador cuantitativo del metabolismo y producción de H_2 , siendo este último eficiente cuando se obtienen proporciones de B/A a partir de 2.6 (Hussy *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Dicho valor fue alcanzado con el tratamiento Bs 4x, lo que puede explicar el mejor desempeño de esta cepa comparado con Pp 4x, Cb 3x y Cs 3x, las cuales obtuvieron valores inferiores, como resultado de una mayor producción de acetato, siendo las vías metabólicas de consumo de H_2 más propensas a ocurrir ya sea por homoacetogénesis (bajas proporciones de B/A) o por la vía de producción de propionato (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009; Motte *et al.*, 2013).

Se llevó a cabo la determinación de carbohidratos degradados (Figura 17), obteniendo degradaciones mayores en todas las bioaumentaciones comparadas con el control (excepto con Cb 3x), siendo el tratamiento Bs 4x la que presentó el mayor porcentaje de degradación, seguido de Pp 4x y Cs 2x.

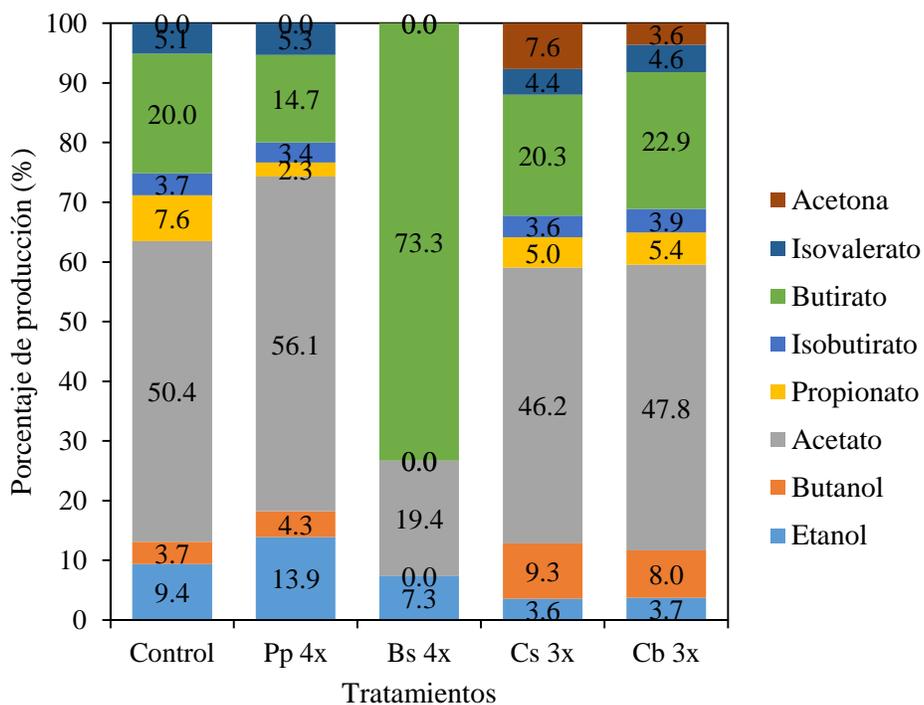


Figura 16. Porcentaje de producción de AGV (mg/L) en las bioaumentaciones evaluadas.

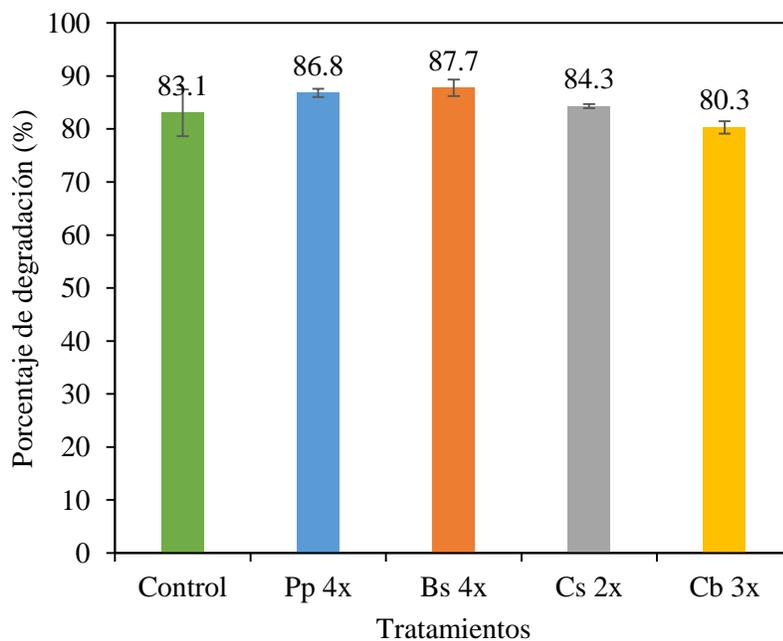


Figura 17. Degradación de carbohidratos en las bioaumentaciones evaluadas.



Finalmente, se determinó el PBH de cada uno de los tratamientos evaluados en los ensayos en lote, empleando RA como sustrato, los cuales se compararon con respecto al valor teórico ($4 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosa}}$). Como se observa en la Tabla 27, la bioaumentación con Bs 4x presenta un valor de PBH cercano al teórico, sin embargo, como se comentó anteriormente, en la práctica aún no ha sido posible alcanzar el máximo estequiométrico debido a que durante la FO no únicamente se produce H_2 , también se lleva a cabo un crecimiento celular que requiere del consumo de sustrato (Hallenbeck & Benemann, 2002; Saady, 2013).

Tabla 27. Comparación del PBH obtenido en los tratamientos evaluados en los ensayos en lote con respecto al valor teórico.

Tratamiento	PBH ($\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosa}}$)
Teórico	4
Bs 4x	3.4
Bs 3x	3.1
Bs 2x	2.4
Pp 4x	1.8
Cb 2x	1.7
Pp 3x	1.6
Cb 1x	1.5
Bs 1x	1.5
Pp 2x	1.4
Cb 4x	1.3
Pp 1x	1.1
Cb 3x	1.0
Cs 1x	0.9
Control	0.8
Cs 3x	0.8
Cs 2x	0.7
Cs 4x	0.7

Considerando que los carbohidratos más comunes en los RA son polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa, almidón y pectina (Sanders, 2001), los cuales deben ser hidrolizados a compuestos más sencillos como la glucosa para su posterior empleo en las vías metabólicas involucradas en la producción de H_2 , podemos señalar que los valores superiores de PBH con la bioaumentación de Bs en los ensayos con RA, comparado con los otros microorganismos evaluados, se debe a su capacidad de hidrolizar residuos lignocelulósicos (Patel *et al.*, 2012) y almidón (Bao, 2012). Así mismo, resulta interesante mencionar, de acuerdo con da Silva Mazareli *et al.*, (2019) la especie *Bacillus* ha obtenido altas eficiencias en la producción de H_2 empleando carbohidratos complejos, para el caso del almidón, se ha reportado un Y_{H_2} de 2.2 veces más que la obtenida por la especie *C. beijerinckii*. Por el contrario, para el caso de monosacáridos como fructosa y glucosa, esta última



especie registró un Y_{H_2} de 3 y 2 veces más, respectivamente, comparado con *Bacillus*. En este sentido, las capacidades hidrolíticas para degradar carbohidratos complejos presentes en los RA influyó en el mejor desempeño de *B. subtilis* sobre las cepas *Clostridium* durante la producción de H_2 .

Por otra parte, es importante notar que actualmente se aplican diferentes estrategias para la mejora de la producción de H_2 como la acidificación, tratamiento térmico y ultrasónico del sustrato, entre otros, por lo que en la Tabla 28 se comparan dichas estrategias con la empleada en este estudio.

Como puede observarse, la bioaumentación con Bs 4x obtuvo valores superiores de Y_{H_2} comparado con el tratamiento ácido (pH 4), básico y térmico del sustrato. Por tanto, es posible señalar a la bioaumentación como una buena alternativa para mejorar la producción de H_2 con respecto a tratamientos enfocados al sustrato.

Tabla 28. Comparación de diferentes estrategias aplicadas en ensayos en lote para la mejora de la producción de H_2

Estrategia	Temperatura °C	pH	Y_{H_2} (mL H_2 /gSV)	Incremento en la producción de H_2 (%) ^e	Referencia
Acidificación de RA (pH 4) ^a	35	6	27.0	-50%	(Kim <i>et al.</i> , 2014)
Acidificación de RA (pH 2) ^a	35	6	158.0	192%	(Kim <i>et al.</i> , 2014)
Tratamiento básico de RA (pH 11) ^b	37	5.5	46.0	9%	(Elbeshbishy <i>et al.</i> , 2011)
Tratamiento térmico de RA (140 °C, 20 min)	35	*	43.0	24%	(Ding <i>et al.</i> , 2017)
Tratamiento térmico de RA (100 °C, 30 min)	37	*	75.3	155%	(Pu <i>et al.</i> , 2019)
Tratamiento ultrasónico de RA ^c	37	5.5	97.0	130%	(Elbeshbishy <i>et al.</i> , 2011)
Tratamiento ultrasónico y térmico de RA ^d	37	5.5	78.0	85%	(Elbeshbishy <i>et al.</i> , 2011)
Bioaumentación Bs 4x	37	7.5	84.0	311%	Este estudio

^a Ajuste de pH con HCl durante 12 h. ^b Ajuste de pH 11 con NaOH durante 24 h a 4 °C. ^c Sonicación de RA a 79 kJ/gST. ^d Sonicación de RA a 79 kJ/gST y posteriormente sometido a 70 °C durante 30 min. * Sin ajuste inicial de pH. ^e En función de mL H_2 /gSV producidos.



9.2 Etapa 2. Bioaumentación en un reactor ASBR

9.2.1 Desempeño del reactor ASBR

Un reactor ASBR fue puesto en operación durante 56 ciclos, tiempo en el cual se realizó la cuantificación del volumen y composición de biogás, así como también se determinó el Y_{H_2} , la remoción de carbohidratos, DQO, ST y SV, y producción de AGV. La bioaumentación en el ASBR se llevó a cabo en el ciclo 25 y 32. Cabe mencionar, que no se detectó la producción de CH_4 durante la operación del reactor.

Como se muestra en la Figura 18, la bioaumentación de *Bacillus subtilis* realizada en el ciclo 25, produciendo un aumento de hasta 294% en la productividad volumétrica (Q_{H_2}) con respecto a los ciclos sin bioaumentar (de 22.2 $mLH_2/L_{reactor}/d$ a 87.4 $mLH_2/L_{reactor}/d$). Posteriormente, al observarse una disminución de la Q_{H_2} , se añadieron nuevamente microorganismos en el ciclo 32, obteniendo un incremento importante en dicho parámetro (de 12 $mLH_2/L_{reactor}/d$ a 98.6 $mLH_2/L_{reactor}/d$). No obstante, dicha mejora se mantiene durante los 4 ciclos siguientes a la bioaumentación.

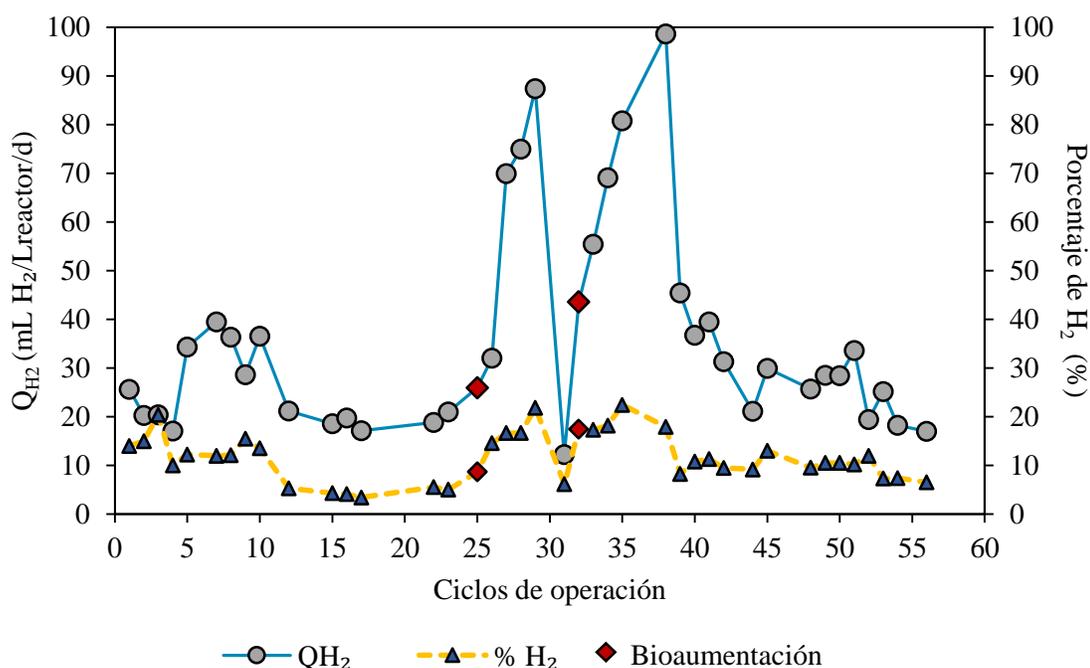


Figura 18. Volumen y composición de biogás producido durante la operación del reactor ASBR.

De manera similar, el Y_{H_2} presenta una mejora significativa, al aumentar de 4.3 mLH_2/gSV a 15 mLH_2/gSV en la primera bioaumentación y después del ciclo 32 (segunda bioaumentación), alcanzando un valor máximo de 21.2 mLH_2/gSV (Figura 19).

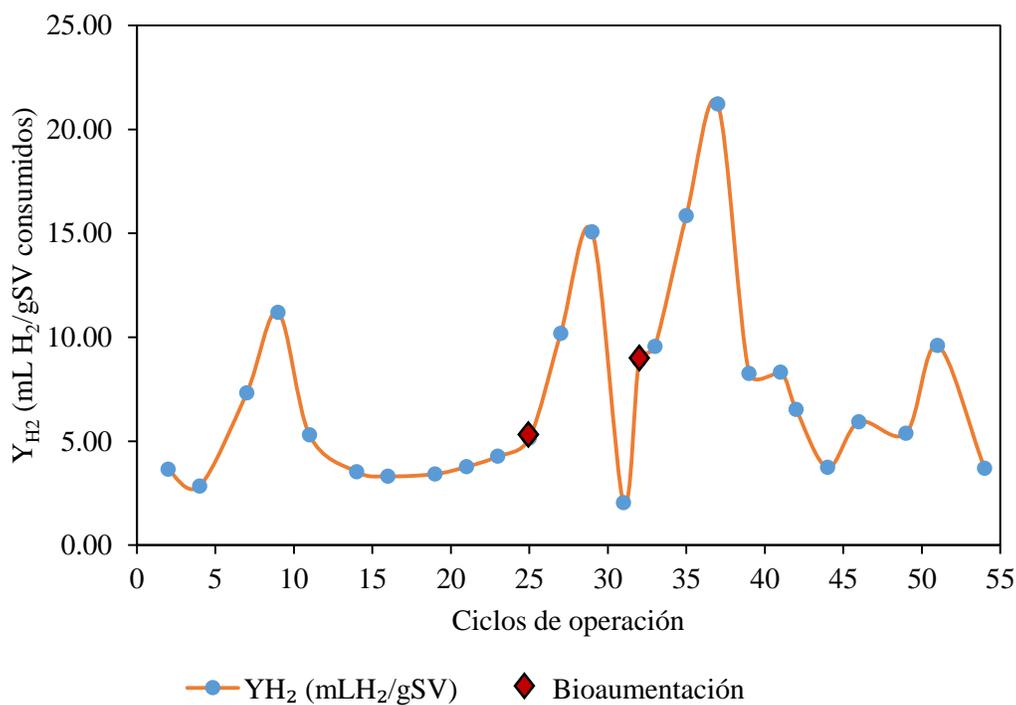


Figura 19. Rendimiento de H_2 durante la operación del reactor ASBR.

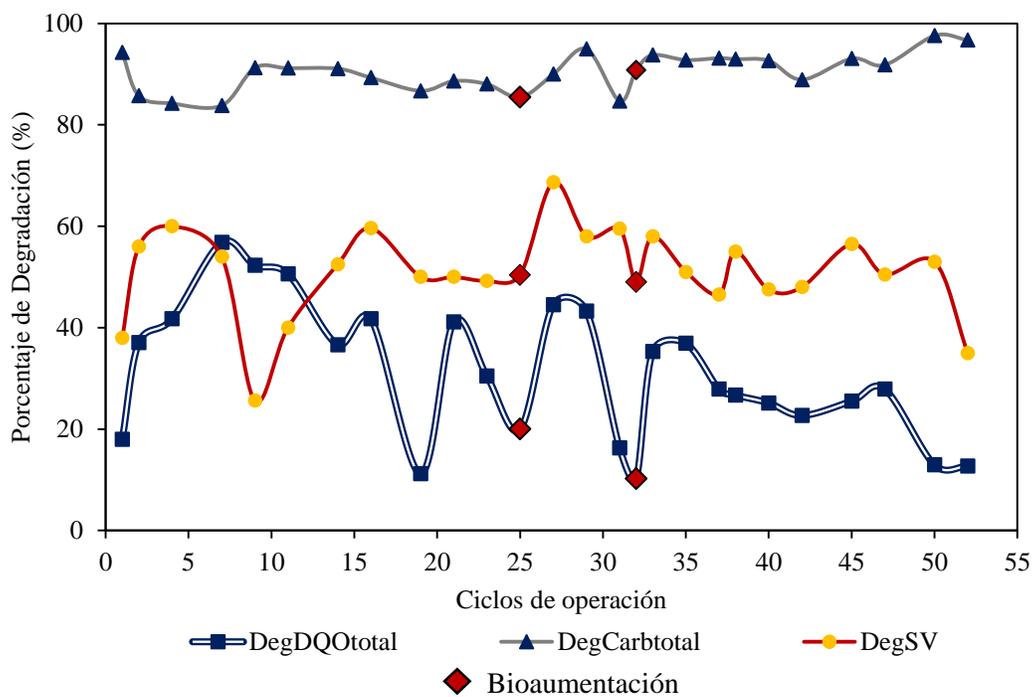


Figura 20. Porcentajes de remoción durante la operación del reactor ASBR.



En cuanto a la degradación de carbohidratos (Figura 20) se observan valores promedio de 88% sin la adición de microorganismos y de 91% con la bioaumentación, por lo que el efecto no fue significativo de acuerdo con el análisis de varianza. Similarmente, en la degradación de DQO no se observó una diferencia importante (10%) al aplicar esta estrategia. Lo anterior puede inferirse a la proporción de cepa añadida, si bien se obtuvo un efecto en la degradación de carbohidratos en los ensayos en lote, la comunidad nativa presente en el reactor, junto con los microorganismos inherentes del sustrato, pudieron limitar la capacidad hidrolítica de *B. subtilis*, lo cual también fue observado por Kuo *et al.*, (2012) quienes evaluaron la bioaumentación de *Clostridium* sp TCW1 en un sistema CSTR productor de H₂, obteniendo un aumento del Y_{H2} de 133% con respecto a su operación sin la adición de la cepa y sin incrementos significativos en la degradación de DQO.

9.2.2 Análisis estadístico del desempeño del reactor

Se llevó a cabo un análisis de varianza de un bloque (tratamiento) empleando el software R, con un intervalo de confianza del 95% para determinar una diferencia significativa ($p < 0.05$) de los resultados de los ciclos sin la adición de la cepa (control) y con la bioaumentación con Bs. Los resultados se pueden observar en las Tablas 29 y 30.

Tabla 29. Comparación de los resultados obtenidos en el reactor durante su desempeño.

Tratamiento	Q _{H2} mLH ₂ /L _{reactor} /d	Y _{H2} (mLH ₂ /gSV)	Degradación de carbohidratos (%)
Control	22.2 ± 6.9	4.4 ± 2.6	88 ± 2.8*
Bioaumentación	59.3 ± 26.2	11.8 ± 5.1	91 ± 3.8*

*Son estadísticamente similares utilizando la comparación múltiple LSD ($\alpha=0.05$).

Tabla 30. Producción de AGV obtenidos durante la operación del reactor.

Tratamiento	AGV Totales (mg/L)	Acetato (mg/L)	Butirato (mg/L)	Propionato (mg/L)	Etanol (mg/L)	Valerato (mg/L)	Caproato (mg/L)
Control	2632 ± 1228*	1250 ± 523*	669 ± 295	315 ± 338*	43.5 ± 98*	205 ± 152*	192 ± 116*
Bioaumentación	3005 ± 803*	1232 ± 332*	912 ± 254	386 ± 208*	8.8 ± 26*	248 ± 73*	226 ± 71*

*Son estadísticamente similares utilizando la comparación múltiple LSD ($\alpha=0.05$).

Es evidente que la bioaumentación con Bs tuvo un efecto significativo sobre la Q_{H2} (167% más), comparado con la operación sin bioaumentar. De igual forma, el Y_{H2} fue superior (168% con



respecto al control). No obstante, en cuanto a la degradación de carbohidratos y la producción total de AGV, no tuvo un efecto significativo, sin embargo, hay que señalar que si hubo un efecto con la adición de la cepa Bs en la producción de butirato (36% más), por lo que la proporción molar de B/A también se vio favorecida (38% más), conduciendo al aumento de la producción de H₂ al evitar su consumo por vía homoacetogénica, como se explicó anteriormente.

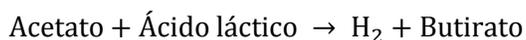
9.2.3 Balance de masa del reactor

Considerando una DQO_e de 8.5 gDQO/L para cada ciclo de operación, se realizaron los cálculos necesarios para el balance de masa del ciclo 16 (que corresponde a la etapa de estado estable, es decir, con una variación en la producción de H₂ menor al 10%) y ciclo 38 (donde se obtuvo la máxima producción de H₂ durante la bioaumentación). Los resultados se encuentran en la Tabla 31, donde se muestran los valores obtenidos de los productos metabólicos en función de la DQO (g DQO/L) y el porcentaje de la DQO que corresponde a su producción con respecto a la DQO_e.

Tabla 31. Balance de masa de la operación del reactor.

Producto obtenido	Sin Bioaumentación (Ciclo 16)		Bioaumentación (Ciclo 38)	
	g DQO/L	% DQO	g DQO/L	% DQO
Acetato	1.3	15.1	1.3	15.0
Propionato	0.2	2.1	0.6	7.0
Butirato	1.2	13.7	2.2	26.0
Valerato	0.3	3.4	0.7	8.0
Caproato	0.5	6.3	0.9	11.0
AGV _{TOTAL}	3.5	40.6	5.6	66.0
H ₂	0.03	0.3	0.1	2.0
Metabolitos _{ND}	5.0	59.1	2.7	32.0
TOTAL	8.5	100	8.5	100.0

Como puede observarse, el porcentaje de la DQO_e destinada a la producción de H₂ para el ciclo 16 (0.3%), que corresponde a una operación en estado estable del reactor, resultó inferior a la obtenida en el ciclo 38 (2.0%), durante la cual se logró la mayor producción de H₂ por efecto de la bioaumentación, es decir 1.7% más de la DQO_e se empleó en la generación de este producto cuando se añadieron microorganismos en el sistema. Dicho aumento puede deberse al empleo de otras fuentes de carbono, además de los carbohidratos, como el ácido láctico, cuya disponibilidad ha sido reportada por otros autores en sistemas productores de H₂, aludiendo un papel metabólico determinante en su producción (Kim *et al.*, 2012; Fuess *et al.*, 2018; Santiago *et al.*, 2019b), como se expone en la siguiente ecuación:



Ecuación 7

Por lo anterior, se infiere el consumo de ácido láctico, reflejado en la disminución de los metabolitos_{ND}, para la producción de H₂, obteniéndose un aumento significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de este compuesto en el biogás (de 9% a 16%).

9.2.4 Análisis de la comunidad microbiana

Durante la operación del reactor ASBR se tomaron muestras con el objetivo de analizar la comunidad microbiana presente en el sistema antes y después de la bioaumentación con Bs (Figura 21).

Es posible apreciar un dominio importante del género *Bacteroides* proveniente del sustrato, que si bien su abundancia era menor al 1%, esta se vio enriquecida durante los primeros ciclos de operación del reactor. La gran abundancia de *Bacteroides*, una bacteria productora de H₂ asociada a la degradación de hemicelulosa (Bergey & Holt, 2000), permite inferir la abundancia de dichos polisacáridos en el sustrato, lo cual contribuyó al predominio de este género, que también ha sido observado en reactores productores de H₂ a partir de RA en abundancias mayores al 40% (Santiago *et al.*, 2019a; Moreno-Andrade *et al.*, 2015).

Sin embargo, después de la primera bioaumentación (ciclo 25), se produjo un cambio en la comunidad bacteriana del sistema, en donde se puede notar una predominancia del género *Bifidobacterium* y *Prevotella*, ambas anaerobias no formadoras de esporas. Es posible inferir que debido a la ausencia de *Bacteroides*, la actividad hemicelulasa pudo ser retomada por *Prevotella* (Bergey & Holt, 2000), permitiendo la disponibilidad de compuestos solubles, propiciando la presencia de LAB como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, cuya producción de ácido láctico fue aprovechada por el género *Megasphaera*, microorganismo capaz de producir H₂ a partir de dicho compuesto (Marounek *et al.*, 1989; Ohnishi *et al.*, 2010, 2012). Además, la adición de *B. subtilis* favoreció la producción de butirato (de 669 mg/L a 912 mg/L) y junto a su capacidad para producir H₂ (Sharma & Melkania, 2018), permitieron el aumento de la Q_{H2} después de la bioaumentación. No obstante, la disminución de éste parámetro a partir del ciclo 39 (de 98.6 mLH₂/L_{reactor} d a 45.4 mLH₂/L_{reactor} d) se infiere a que la presencia de *B. subtilis* se vio limitada por la comunidad microbiana nativa del sistema en los ciclos posteriores a su adición, siendo *Megasphaera* superada por las LAB, debido al aumento de su abundancia relativa, lo cual permite inferir la acumulación de ácido láctico (reflejado en el aumento del porcentaje de DQO_e en la producción de metabolitos_{ND} de 32% a 41%) y por consiguiente, una disminución de la producción de H₂. Por lo anterior, no se descarta una cooperación sinérgica entre *Prevotella*, *Megasphaera*, las LAB y la bioaumentación de *B. subtilis*.

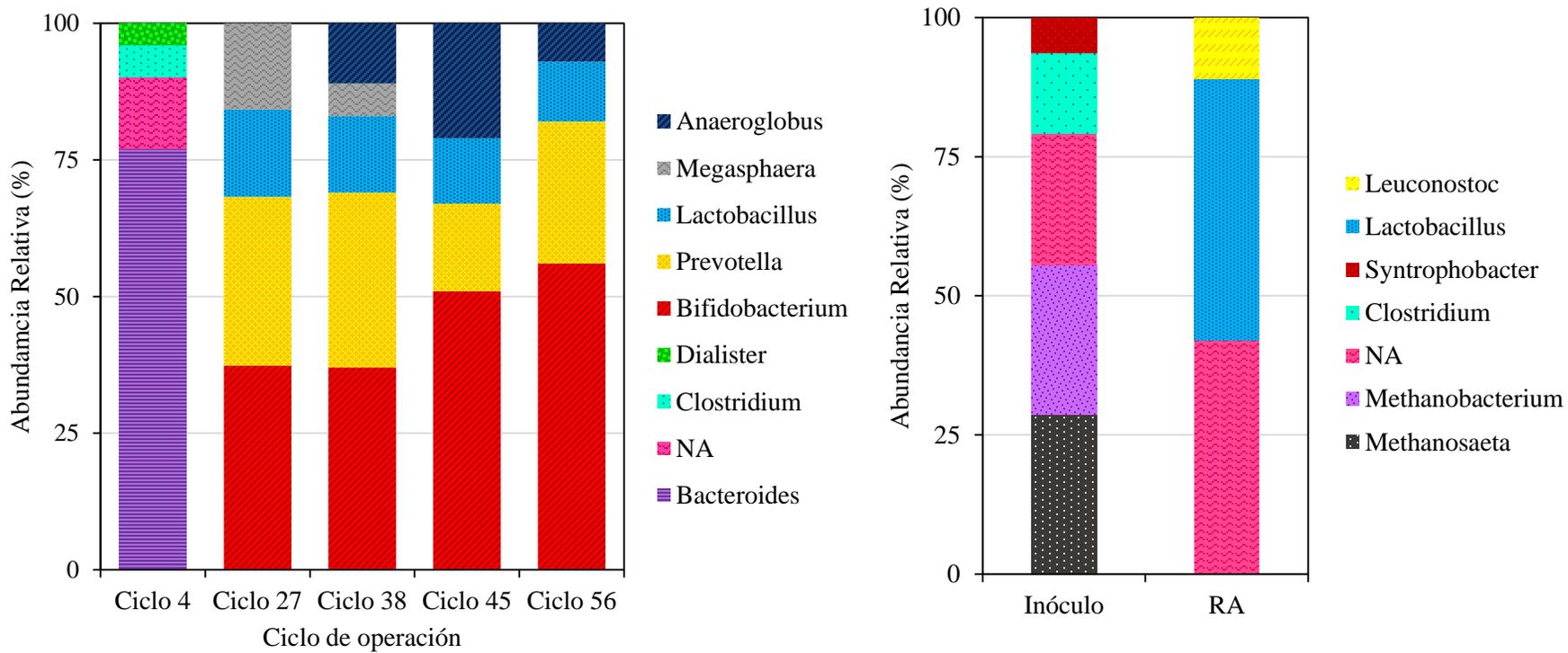


Figura 21. Clasificación taxonómica a nivel de género de los microorganismos presentes en la operación del reactor ASBR, inóculo y sustrato empleados.



Finalmente, hay que notar que *B. subtilis* no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas, situación similar observada por Kuo *et al.*, (2012), Čáter *et al.*, (2015) y Valdez-Vazquez *et al.*, (2019) quienes reportaron que el microorganismo empleado en la bioaumentación no fue encontrado al final del experimento. Los autores atribuyeron que aunque la actividad de la cepa bioaumentada se llevó a cabo durante los primeros días de incubación, posteriormente éstos fueron superados por la comunidad nativa. Lo anterior se vió reflejado en la disminución de la Q_{H_2} después de cinco ciclos posteriores a la adición de *B. subtilis*, por lo que la concentración del microorganismo resulta ser un parámetro importante en los estudios de bioaumentación.

10. CONCLUSIONES

- La bioaumentación con todas las cepas empleadas tuvo un efecto significativo en la producción de H_2 , siendo Bs 4x el tratamiento que logró el mayor volumen acumulado en los ensayos en lote (311% más comparado con el control), seguido de Pp 4x (109%), Cb 2x (106%) y Cs 1x (6.7%).
- La cepa hidrolítica *B. subtilis* mostró el mejor desempeño en los ensayos en lote al obtener 2.9 veces más de Y_{H_2} (mL H_2 /gSV) con respecto al control, una reducción significativa de la fase lag (de 7.9 h a 3.5 h) y un aumento en la producción de butirato (485% más).
- Con la cepa fermentativa Cs 4x se observó un efecto antagónico al alcanzar un Y_{H_2} inferior al control (-19.7%) y una mínima reducción de la fase lag (de 7.9 h a 6.7 h). No obstante, hubo una mejora en la producción de AGV totales (231% más con respecto al control).
- El mejor desempeño en la producción de H_2 obtenido con el tratamiento Bs 4x con respecto a las cepas *Clostridium* puede atribuirse a la mejor capacidad de degradación de carbohidratos ($p < 0.05$) y al aumento en la proporción B/A (5.5 y 6 veces más con respecto a Cb 3x y Cs 3x), un indicador cuantitativo asociado al metabolismo de la producción de H_2 .
- La bioaumentación con *B. subtilis* durante la operación del reactor mejoró significativamente su desempeño ($p < 0.05$), ya que se obtuvo un aumento en la Q_{H_2} (167% más) y en el Y_{H_2} (168% más) con respecto a su operación sin bioaumentación, lo cual es atribuído a una relación sinérgica con la cepa añadida y los microorganismos nativos (*Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Megasphaera*).
- La cantidad de *B. subtilis* añadida en el reactor se vio superada por la comunidad nativa en los ciclos posteriores a su adición, observándose una acumulación de productos metabólicos intermediarios (de acuerdo con el balance de masa) y por consiguiente, una disminución de la Q_{H_2} (de 98.6 mL H_2 /L $_{reactor}$ d a 45.4 mL H_2 /L $_{reactor}$ d).
- Esta condición de mejora en la producción de H_2 no es a largo plazo, por tanto, es necesario seguir aplicando la bioaumentación, teniendo especial atención en la cantidad añadida de microorganismos, lo cual resulta ser clave en el metabolismo de la comunidad nativa y por ende, en el desempeño del sistema.



11. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar ensayos en lote empleando de forma conjunta cepas hidrolíticas y fermentativas en diferentes proporciones con el objetivo de determinar si las interacciones entre dichas cepas resultan benéficas en la producción de H₂.

12. PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

- Participación en el XIX International Congress of the Mexican Hydrogen Society, realizado en Morelia, Michoacán, del 1 al 4 de octubre de 2019.
- Estancia de investigación en la Universidad Autónoma de Madrid.



13. BIBLIOGRAFÍA

- Arreola-Vargas, J., Celis, L., Buitrón, G., Razo-Flores, E., & Alatríste-Mondragón, F. (2013). Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: Performance and microbial population analysis. *International Journal of Hydrogen energy* 38, 13884-13894.
- Adekunle, K. F., & Okolie, J. A. (2015). A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 06, 205-2012.
- Agyeman, F. O., & Wendong, T. (2004). Anaerobic co-digestion of food waste and dairy manure: Effects of food waste particle size and organic loading rate. *Journal of Environmental Management* 133, 268-274.
- Alibardi, L., & Cossu, R. (2016). Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Management* 47, 69-77.
- André, L., Ndiaye, M., Pernier, M., Lespinard, O., Pauss, A., Lamy, E., & Ribeiro, T. (2016). Methane production improvement by modulation of solid phase immersion in dry batch anaerobic digestion process: dynamic of methanogen populations. *Bioresource Technology* 207, 353-360.
- Antonopoulou, G., Gavala, H., Skiadas, I., & Lyberatos, G. (2011). Effect of substrate concentration on fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(8), 4843-4851.
- Anzwar, M. Y., Hussain, M. A., & Abdul-Wahab, A. K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 31, 158-173.
- APHA. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (21th edn.)*. Washington, DC: American Public Health Association.
- Argun, H., & Kargi, F. (2011). Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy* 36, 7443-7459.
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato, L. (2000). *Tratamiento biológico de aguas residuales*. Sevilla, España.: Grupo de Tratamiento de Aguas Residuales. Escuela Universitaria Politécnica.
- Aslanzadeh, S. (2014). *Pretreatment of cellulosic waste and high-rate biogas production*. Borås, Suecia: University of Borås.
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Madrid, España: Pearson.
- Bakonyi, P., Nemésthóty, N., Simon, V., & Bélafi-Bakó, K. (2014). Review on the start-up experiences of continuous fermentative. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 40, 806-813.
- Balachandar, G., Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen production from organic wastes by dark fermentation. *Biohydrogen*, 103-144.
- Bao, M., Su, H., & Tan, T. (2012). Biohydrogen Production by Dark Fermentation of Starch Using Mixed Bacterial Cultures of *Bacillus* sp and *Brevundimonas* sp. *Energy & fuels* 26(9), 5872-5878.
- Batstone, D. J., & Jensen, P. D. (2011). *Anaerobic Processes*. Amsterdam: Wilderer, P. (ed) Treatise on water science.
- Bergey, D., & Holt, J. (2000). *Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Berrocal-Bravo, M. (2017). *Producción de hidrógeno y metano mediante codigestión de residuos alimenticios y lodos de purga*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Boon, N., Goris, J., De Vos, P., Verstraete, W., & Top, E. (2000). Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Applied Environmental Microbiology* 66(7), 2906-2913.



- Buitrón, G., & Carvajal, C. (2010). Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time. *Bioresource Technology* 23, 9071-9077.
- Bundhoo, M. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 41, 6713-6733.
- Burke, D. A. (2001). *Dairy Waste Anaerobic Digestion Handbook*. Washington, Estados Unidos: Environmental Energy Company.
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J., Ruiz-Filippi, G., & Trably, E. (2017). Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function. *FEMS microbiology reviews* 41, 158-181.
- Carrillo-Reyes, J., Tapia-Rodríguez, A., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., . . . Zaiat, M. (2019). A standardized biohydrogen potential protocol: An international round robin test approach. *International Journal of Hydrogen* 44, 26237-26247.
- Castillo-Hernández, A., Mar-Alvarez, i., & Moreno-Andrade, I. (2015). Start-up and operation of continuous stirred-tank reactor for biohydrogen production from restaurant organic solid waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 40, 17239-17245.
- Čater, M., Fanel, L., Malorvh, Š., & Logar, R. (2015). Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. *Bioresource technology* 186, 261-269.
- CCA. (2017). *Caracterización y gestión de la pérdida y el desperdicio de alimentos en América del Norte*. Montreal.
- Chaganti, S., Lalman, J., & Heath, D. (2012). 16S rRNA gene based analysis of the microbial diversity and hydrogen production in three mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(11), 9002-9017.
- Chandrasekhar, K., Lee, Y., & Lee, D. (2015). 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.
- Chen, W., Sung, S., & Chen, S. (2009). Biological hydrogen production in an anaerobic sequencing batch reactor: pH and cyclic duration effects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 227-234.
- Cheng, C., Hsu, S., Wu, C., Chang, P., Lin, C., & Hung, C. (2011). Quantitative analysis of microorganism composition in a pilot-scale fermentative biohydrogen production system. *International journal of hydrogen energy*, 36(21), , 14153-14161.
- Cheng, C., Hung, C., Lee, K., Liao, P., Liang, C., Yang, L., . . . Lin, C. (2008). Microbial community structure of a starch-feeding fermentative hydrogen production reactor operated under different incubation conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(19), 5242-5249.
- Chojnacka, A., Błaszczuk, M., Szczęsny, P., Nowak, K., Sumińska, M., Tomczyk-Żak, K., . . . Sikora, A. (2011). Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. *Bioresource technology* 102(21), 10057-10064.
- Chong, N. M., Pai, S. L., & Chen, C. H. (1997). Bioaugmentation of an activated sludge receiving pH shock loadings. *Bioresource Technology* 59, 235-240.
- Chou, C., Han, C., Chang, J., & Lay, J. (2011). Co-culture of *Clostridium beijerinckii* L9, *Clostridium butyricum* M1 and *Bacillus thermoamylovorans* B5 for converting yeast waste into hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 13972-13983.
- Costa, J., Barbosa, S., & Sousa, D. (2012). Effects of pre-treatment and bioaugmentation strategies on the anaerobic digestion of chicken feathers. *Bioresource technology* 120, 114-119.
- da Silva Mazareli, R. C., Sakamoto, I. K., Silva, E. L., & Amâncio Varesche, M. B. (2019). *Bacillus* sp. isolated from banana waste and analysis of metabolic pathways in acidogenic systems in hydrogen production. *Journal of Environmental Management* 47, 178-186.



- Dai, X., Hu, C., Zhang, D., & Chen, Y. (2017). A new method for the simultaneous enhancement of methane yield and reduction of hydrogen sulfide production in the anaerobic digestion of waste activated sludge. *Bioresource Technology* 243, 914-921.
- Das, D., & Veziroğlu, T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy* 28, 13-21.
- Deublein, D., & Steinhauser, A. (2010). *Biogas from Waste and Renewable Resources: An introduction*. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- Díaz-Baez, M. C., Espitia, S. E., & Molina, F. (2002). *Digestión Anaerobia: una aproximación a la tecnología*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Ding, L., Cheng, J., Qiao, D., Yue, L., Li, Y. Y., Zhou, J., & Cen, K. (2017). Investigating hydrothermal pretreatment of food waste for two-stage fermentative hydrogen and methane co-production. *Bioresource technology* 241, 491-499.
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S., Xiaoying, K., & Yu, Z. (2009). Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(2), 812-820.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Durán, A., Casas Gutiérrez, D. N., Rojas Zamora, U., Vázquez Cuevas, G. M., Roa Luna, M., & Alcántara Hernández, R. J. (2014). *Fundamentos de digestión anaerobia de residuos sólidos orgánicos urbanos*. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México.
- Ebner, J. H., Labatut, R. A., Rankin, M. J., Pronto, J. L., Gooch, C. A., Williamson, A. A., & Trabold, T. A. (2015). Lifecycle Greenhouse Gas Analysis of an Anaerobic Codigestion Facility Processing Dairy Manure and Industrial Food Waste. *Environmental Science & Technology* 49, 11199-11208.
- El Fantroussi, S., & Agathos, S. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current opinion in microbiology* 8(3), 268-275.
- Elbeshbishy, E., Hafez, H., Dhar, B., & Nakhla, G. (2011). Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(17), 11379-11387.
- Endar, N. S. (2009). *Anaerobic Digestion of Organic Solid Waste for Energy Production*. Karlsruhe, Alemania: Karlsruher Institut für Technology (KIT) Scientific Publishing.
- Fuess, L., Júnior, A., Machado, C., & Zaiat, M. (2018). Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: the key role of lactate. *Bioresource technology* 247, 426-433.
- Gadhamshetty, V., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., & Johnson, D. (2010). Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(2), 479-490.
- Gerardi, H. (2003). *The Microbiology of Anaerobic Digester*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P., & 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.
- Ginkel, S., Sung, S., & Lay, J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental science & technology* 35(24), 4726-4730.
- Goldstein, R. M., Mallory, L. M., & Alexander, M. (1985). Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 977-983.
- Goud, R. K., Raghvalulu, S. V., Mohanakrishna, G., Naresh, K., & Mohan, S. V. (2012). Predominance of Bacilli and Clostridia in microbial community of biohydrogen producing biofilm sustained under diverse acidogenic operating conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 4068-4076.



- Goud, R. K., Sarkar, O., Chiranjeevi, P., & Venkatan Mohan, S. (2014). Bioaugmentation of potent acidogenic isolates: a strategy for enhancing biohydrogen production at elevated organic load. *Bioresource Technology* 165, 223-232.
- Grosser, A. (2017). The influence of decreased hydraulic retention time on the performance and stability of co-digestion of sewage sludge with grease trap sludge and organic fraction of municipal waste. *Journal of Environmental Management* 203, 1143-1157.
- Gujer, W., & Zehnder, J. B. (1983). Conversion Processes in Anaerobic Digestion. *Water Science and Technology* 15, 127-167.
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., & Emanuelsson, A. (2013). *The methodology of the FAO study: "Global food losses and food waste-Extent, causes and prevention"*. Sweden: Swedish Institute for Food and Biotechnology.
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in biotechnology* 27(5), 287-297.
- Hallenbeck, P., & Benemann, J. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1185-1193.
- Hallenbeck, P., Abo-Hashesh, M., & Ghosh, D. (2012). Strategies for improving biological hydrogen production. *Bioresource technology* 110, 1-9.
- Han, S., Kim, S., & Shin, H. (2005). UASB treatment of wastewater with VFA and alcohol generated during hydrogen fermentation of food waste. *Process Biochemistry* 40(8), 2897-2905.
- Huang, Y., Zong, W., Yan, X., Wang, R., Hemme, C., Zhou, J., & Zhou, Z. (2010). Succession of the bacterial community and dynamics of hydrogen producers in a hydrogen-producing bioreactor. *Applied Environmental Microbiology* 76(10), 3387-3390.
- Hung, C., Cheng, C., Guan, D., Wang, S., Hsu, S., Liang, C., & Lin, C. (2011). Interactions between *Clostridium* sp. and other facultative anaerobes in a self-formed granular sludge hydrogen-producing bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(14), 8704-8711.
- Hussy, I., Hawkes, F., Dinsdale, R., & Hawkes, D. (2003). Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. *Biotechnology and bioengineering* 84(6), 619-626.
- Jo, J., Jeon, C., Lee, D., & Park, J. (2007). Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *Journal of Biotechnology* 131(3), 300-308.
- Jones, D., & Woods, D. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological reviews* 50(4), 484-524.
- Jung, K., Kim, D., Kim, S., & Shin, H. (2011). *Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production*. *Bioresource technology* 102(18): 8612-8620.
- Kandyliis, P., Bekatorou, A., Pissaridi, K., Lappa, K., Dima, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Acidogenesis of cellulosic hydrolysates for new generation biofuels. *Biomass and Bioenergy* 91, 210-216.
- Karadag, D., & Puhakka, J. (2010). Enhancement of anaerobic hydrogen production by iron and nickel. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(16), 8554-8560.
- Karthikeyan, O., Trably, E., Mehariya, S., Bernet, N., Wong, J., & Carrere, H. (2018). Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: a review. *Bioresource technology* 249, 1025-1039.
- Khan, M. A., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y. W., Zhuo, J. L., Zhang, J., . . . Wang, J. (2016). Comparing the value of bioproducts from different stages of anaerobic membrane bioreactors. *Bioresource Technology* 214, 816-825.
- Kim, D. H., Jang, S., Yun, Y. M., Lee, M. K., Moon, C., Kang, W. S., . . . Kim, M. S. (2014). Effect of acid-pretreatment on hydrogen fermentation of food waste: Microbial community analysis by next generation sequencing. *International Journal of Hydrogen Energy* 39, 16302-16309.



- Kim, J., Nhat, L., Chun, Y., & Kim, S. (2008). Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13(4), 499-504.
- Kim, S., Han, S., & Shin, H. (2006). Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochemistry* 41(1), 199-207.
- Kim, T., Lee, Y., Chang, K., & Hwang, S. (2012). Effects of initial lactic acid concentration, HRTs, and OLRs on bio-hydrogen production from lactate-type fermentation. *Bioresource technology* 103(1), 136-141.
- Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. (2007). Mixed culture biotechnology for bioenergy production. *Current opinion in biotechnology* 18, 207-212.
- Kotay, S., & Das, D. (2010). Microbial hydrogen production from sewage sludge bioaugmented with a constructed microbial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(19), 10653-10659.
- Kulkarni, G., Kridelbaugh, D., Guss, A., & Metcalf, W. (2009). Hydrogen is a preferred intermediate in the energy-conserving electron transport chain of *Methanosarcina barkeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(37), 15915-15920.
- Kumaran, P., Hephzibah, D., Sivasankari, R., Saifuddin, N., & Shamsuddin, A. H. (2016). A review on industrial scale anaerobic digestion systems deployment in Malaysia: Opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 56, 929-940.
- Kuo, W., Chao, Y., Wang, Y., & Cheng, S. (2012). Bioaugmentation strategies to improve cellulolytic and hydrogen producing characteristics in CSTR intermittent fed with vegetable kitchen waste and napiergrass. *Energy Procedia* 29, 82-91.
- Lal, S., & Tabacchioni, S. (2009). Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian Journal of Microbiology* 49(1), 2-10.
- Laathanachareon, T., Kanchanasuta, S., Mhuanthong, W., Phalakornkule, C., Pisutpaisal, N., & Champreda, V. (2014). Analysis of microbial community adaptation in mesophilic hydrogen fermentation from food waste by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Journal of environmental management* 144, 143-151.
- Lee, H., Vermaas, W., & Rittmann, B. (2010). Biological hydrogen production: prospects and challenges. *Trends in Biotechnology* 28, 262-271.
- Li, D., Liu, S., Mi, L., Li, Z., Yuan, Y., Yan, Z., & Liu, X. (2015). Effects of feedstock ratio and organic loading rate on the anaerobic mesophilic co-digestion of rice straw and cow manure. *Bioresource Technology* 189, 319-326.
- Li, S., Lin, J., Wang, Y., Lee, Z., Kuo, S., Tseng, I., & Cheng, S. (2011). Strategy of controlling the volumetric loading rate to promote hydrogen-production performance in a mesophilic-kitchen-waste fermentor and the microbial ecology analyses. *Bioresource technology* 102(18), 8682-8687.
- Li, S., Whang, L., Chao, Y., Wang, Y., Wang, Y., Hsiao, C., . . . Cheng, S. (2010). Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(1), 61-70.
- Liang, D., Shayegan, S., Ng, W., & He, J. (2010). Development and characteristics of rapidly formed hydrogen-producing granules in an acidic anaerobic sequencing batch reactor (AnSBR). *Biochemical engineering journal* 49(1), 119-125.
- Lin, C., Pfaltzgraff, L., Herrero-Davila, L., Mubofu, E., Abderrahim, S., Clark, J., . . . Lague, R. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science* 6, 426-464.
- Logan, B., Oh, S., Kim, I., & Van Ginkel, S. (2002). Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environmental science & technology* 36(11), 2530-2535.



- Luo, Y., Zhang, H., Salerno, M., Logan, B., & Bruns, M. (2008). Organic loading rates affect composition of soil-derived bacterial communities during continuous, fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(22), 6566-6576.
- Lütke-Eversloh, T., & Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current opinion in biotechnology* 22(5), 634-647.
- Ma, F., Guo, J. B., Zhao, L. J., Chang, C. C., & Cui, D. (2009). Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater. *Bioresource Technology* 100, 597-602.
- Mace, S., & Mata-Alvarez, J. (2002). Utilization of SBR Technology for Wastewater Treatment: An Overview. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 41, 5539-5553.
- Madigan, T., Martinko, J. M., Stahl, D., & Clark, D. P. (2004). *Brock Biology of microorganisms*. UK: Prentice Hall-Pearson Education.
- Marone, A., Massini, G., Patriarca, C., Signorini, A., Varrone, C., & Izzo, G. (2012). Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities. *International Journal of Hydrogen Energy* 37, 5612-5622.
- Marounek, M., Filegrova, K., & Bartos, S. (1989). Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(6), 1570-1573.
- Mathews, J., & Wang, G. (2009). Mathews, J., & Wang, G. (2009). Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International journal of hydrogen energy* 34(17), 7404-7416.
- Mohan, S., Babu, V., & Sarma, P. (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource technology* 99(1), 59-67.
- Monlau, F., Aemig, Q., Trably, E., Hamelin, J., Steyer, J., & Carrere, H. (2013). Monlau, F., Aemig, Q., Trably, E., Hamelin, J., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2013). Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(28), 12273-12282.
- Moreno-Andrade, I., & Buitron, G. (2015). Evaluation of particle size and Initial concentration of total solids on Biohydrogen production from food waste. *Fresenius Environmental Bulletin* 24(7), 2289-2295.
- Moreno-Andrade, I., Carrillo-Reyes, J., Santiago, S., & Bujanos-Adame, M. (2015). Biohydrogen from food waste in a discontinuous process: Effect of HRT and microbial community analysis. *International Journal of Hydrogen Energy* 40, 17246-17252.
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., & Bernet, N. (2016). Electro-fermentation: how to drive fermentation using electrochemical systems. *Trends in biotechnology* 34(11), 856-865.
- Motte, J., Trably, E., Escudié, R., Hamelin, J., Steyer, J., Bernet, N., . . . Dumas, C. (2013). Total solids content: a key parameter of metabolic pathways in dry anaerobic digestion. *Biotechnology for biofuels* 6(1), 164.
- Motte, J., Trably, E., Hamelin, J., Escudié, R., Bonnafous, A., Steyer, J., . . . Dumas, C. (2014). Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation. *Bioresource technology* 166, 610-615.
- Mu, Y., Wang, G., & Yu, H. (2006). Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresource Technology* 97(11), 1302-1307.
- Neshat, S. A., Mohammadi, M., Najafpour, G. D., & Lahijani, P. (2017). Anaerobic co-digestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79, 308-322.
- Nielfa, A., Cano, R., & Fdz-Polanco, M. (2015). Nielfa, A., Cano, R., & Fdz-Polanco, M. (2015). Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnology Reports* 5, 14-21.



- Nkemka, V. N., Gilroyed, B., Yanke, J., Gruninger, R., Vedres, D., McAllister, T., & Hao, X. (2015). Bioaugmentation with an anaerobic fungus in a two-stage process for biohydrogen and biogas production using corn silage and cattail. *Bioresource Technology* 185, 79-88.
- Oh, S., Van Ginkel, S., & Logan, B. (2003). The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environmental science & technology* 37(22), 5186-5190.
- Ohnishi, A., Abe, S., Bando, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2012). Rapid detection and quantification methodology for genus *Megasphaera* as a hydrogen producer in a hydrogen fermentation system. *International journal of hydrogen energy* 37(3), 2239-2247.
- 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.
- Ostrem, K. (2004). *Greening Waste: Anaerobic Digestion for Treating the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*. Nueva York: Department of Earth and Environmental Engineering, Columbia University, EUA.
- Pakarinen, O., Lehtomäki, A., & Rintala, J. (2008). Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: the effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(2), 594-601.
- Paramo, L. (2018). *Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural*. Tamaulipas: Instituto Politécnico Nacional.
- Patel, S., Kumar, P., Mehariya, S., Purohit, H., Lee, J., & Kalia, V. (2014). Enhancement in hydrogen production by co-cultures of *Bacillus* and *Enterobacter*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(27), 14663-14668.
- Patel, S., Singh, M., Kumar, P., Purohit, H., & Kalia, V. (2012). Exploitation of defined bacterial cultures for production of hydrogen and polyhydroxybutyrate from pea-shells. *Biomass and Bioenergy* 36, 218-225.
- Patra, S., Lay, C., Lin, C., Sompong, O., & Reungsang, A. (2011). Performance and population analysis of hydrogen production from sugarcane juice by non-sterile continuous stirred tank reactor augmented with *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy* 36(14), 8697-8703.
- Posmanik, R., Labatut, R., Kim, A., Usack, J., Tester, J., & Angenent, L. (2017). Coupling hydrothermal liquefaction and anaerobic digestion for energy valorization from model biomass feedstocks. *Bioresource Technology* 233, 134-143.
- Pu, Y., Tang, J., Wang, X. C., Hu, Y., Huang, J., Zeng, Y., . . . Li, Y. (2019). Hydrogen production from acidogenic food waste fermentation using untreated inoculum: Effect of substrate concentrations. *International Journal of Hydrogen* 44, 27272-27284.
- Rafrafi, Y., Trably, E., Hamelin, J., Latrille, E., Meynial-Salles, I., Benomar, S., . . . Steyer, J. (2013). Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(12), 4975-4985.
- Ramírez-Morales, J., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Science and Technology* 71(9), 1271-1285.
- Ren, N., Guo, W., Wang, X., Xiang, W., Liu, B., Wang, X., . . . Chen, Z. (2008). Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(16), 4318-4324.
- Ren, N., Xing, D., Rittmann, B., Zhao, L., Xie, T., & Zhao, X. (2007). Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology* 9(5), 1112-1125.
- Rico, C., Muñoz, N., Fernández, J., & Rico, J. L. (2015). High-load anaerobic co-digestion of cheese whey and liquid fraction of dairy manure in a one-stage UASB process: Limits in co-substrates ratio and organic loading rate. *Chemical Engineering Journal* 262, 794-802.



- Romero-Güiza, M., Vila, J., Mata-Alvarez, J., Chimenos, J., & Astals, S. (2016). The role of additives on anaerobic digestion: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58, 1486-1499.
- Rosińska, A., & Karwowska, B. (2017). Dynamics of changes in coplanar and indicator PCB in sewage sludge during mesophilic methane digestion. *Journal of Hazardous Materials* 323, 341-349.
- Saady, N. M. (2013). Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: unresolved challenge. *International Journal of Hydrogen Energy* 38(30), 13172-13191.
- Saady, N., Chaganti, S., Lalman, J., Veeravalli, S., Shanmugam, S., & Heath, D. (2012). Effects of linoleic acid and its degradation by-products on mesophilic hydrogen production using flocculated and granular mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 37(24), 18747-18760.
- Sanders, W. (2001). *Anaerobic hydrolysis during digestion of complex substrates*. Universidad de Wageningen, Holanda.
- Sangyoka, S., Reungsang, A., & Lin, C. (2016). Optimization of biohydrogen production from sugarcane bagasse by mixed cultures using a statistical method. *Sustainable Environment Research* 26(5), 235-242.
- Santiago, S. G., Morgan-Sagatusme, J. M., Monroy, O., & Moreno-Andrade, I. (2019a). Biohydrogen production from organic solid waste in a sequencing batch reactor: An optimization of the hydraulic and solids retention time. *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Santiago, S. G., Trably, E., Latrielle, E., Buitrón, G., & Moreno-Andrade, I. (2019b). The hydraulic retention time influences the abundance of Enterobacter, Clostridium and Lactobacillus during the hydrogen production from food waste. *Letters in applied microbiology* 69, 138-147.
- Schnürer, A., & Jarvis, Å. (2010). *Microbiological Handbook for Biogas Plants*. Sweden: Swedish Gas Centre Report.
- Secretaría de Energía. (2015). *Prospectiva del Sector Eléctrico*. México.
- Secretaría de Energía y Comisión Federal de Electricidad. (2012). *Atlas del Almacenamiento Geológico de CO₂, México*. Ciudad de México.
- Seon, J., Lee, T., Lee, S. C., Pham, H. D., Woo, H. C., & Song, M. (2014). Bacterial community structure in maximum volatile fatty acids production from alginate in acidogenesis. *Bioresource Technology*, 22-27.
- Sharma, P., & Melkania, U. (2018). Effect of bioaugmentation on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 43, 7290-7298.
- Shiyan, S., & Krishnaveni, M. (2013). Hydrogen production by *Pseudomonas stutzeri* JX442762 isolated from thermal soil at Mettur power station, Salem district, Tamil Nadu, India. *Journal of Pharmacy Research*, 6(1), 112-116.
- Siddique, M. N., & Wahid, Z. A. (2018). Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. *Journal of Cleaner Production* 194, 359-371.
- Sivagurunathan, P., Sen, B., & Lin, C. (2014). Overcoming propionic acid inhibition of hydrogen fermentation by temperature shift strategy. *International Journal of Hydrogen Energy* 39(33), 19232-19241.
- Songzhe, F., Hongxia, F., Shuangjiang, L., Ying, L., & Zhipei, L. (2009). A bioaugmentation failure caused by phage infection and weak biofilm formation ability. *Journal of Environmental Sciences* 21(8), 1153-1161.
- Tapia-Rodríguez, A., Ibarra-Faz, E., & Razo-Flores, E. (2019). Hydrogen and methane production potential of agave bagasse enzymatic hydrolysates and comparative techno-economic feasibility implications. *International Journal of Hydrogen Energy* 44(33), 17792-17801.
- Tapia-Venegas, E., Ramirez-Morales, J., Silva-Illanes, F., Toledo-Alarcón, J., Paillet, F., Escudie, R., . . . Ruiz-Filippi, G. (2015). Biohydrogen production by dark fermentation: scaling-up and technologies integration for a sustainable system. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 14(4), 761-785.



- Thauer, R., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews* 41(1), 100-180.
- Tovar, J. E. (2002). *Anotaciones sobre ecología*. Cali, Colombia.: Editorial UN.
- Valdez-Vazquez, I., & Poggi-Varaldo, H. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and sustainable energy reviews* 13(5), 1000-1013.
- Valdez-Vazquez, I., Castillo-Rubio, L., Pérez-Rangel, M., Sepúlveda-Gálvez, A., & Vargas, A. (2019). Enhanced hydrogen production from lignocellulosic substrates via bioaugmentation with Clostridium strains. *Industrial Crops and Products* 137, 105-111.
- Valdez-Vazquez, I., Pérez-Rangel, M., Tapia, A., Buitrón, G., Molina, C., Hernández, G., & Amaya-Delgado, L. (2015). Hydrogen and butanol production from native wheat straw by synthetic microbial consortia integrated by species of Enterococcus and Clostridium. *Fuel* 159, 214-222.
- Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Esparza-García, F., Cecchi, F., & Poggi-Varaldo, H. (2005). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime. *International Journal of Hydrogen Energy* 30, 1383-1391.
- Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Muñoz-Páez, K., Carmona-Martínez, A., & Poggi-Varaldo, H. (2006). Effect of inhibition treatment, type of inocula, and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste. *Biotechnology and bioengineering* 95(3), 342-349.
- Van Ginkel, S., Sung, S., & Lay, J. J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science and Technology* 35, 4726-4730.
- Varnero, M. M. (2011). *Manual de Biogás*. Santiago de Chile: Proyecto CHI/00/G32 Remoción de Barreras para la Electrificación Rural con Energías Renovables.
- Varrone, C., Rosa, S., Fiocchetti, F., Giussani, B., Izzo, G., Massini, G., . . . Wang, A. (2013). Enrichment of activated sludge for enhanced hydrogen production from crude glycerol. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(3), 1319-1331.
- Venkata, M. S., Rao, N. C., & Sarma, P. N. (2005). Bioaugmentation of anaerobic sequencing batch biofilm reactor (ASBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for treating sulfate bearing chemical wastewater. *Process Biochemistry* 40(8), 2849-2857.
- Wang, A., Ren, N., Shi, Y., & Lee, D. (2008). Bioaugmented hydrogen production from microcrystalline cellulose using co-culture—Clostridium acetobutylicum X9 and Ethanoigenens harbinense B49. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(2), 912-917.
- Wen, Z., Wu, M., Lin, Y., Yang, L., Lin, J., & Cen, P. (2014). Artificial symbiosis for acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation from alkali extracted deshelled corn cobs by co-culture of Clostridium beijerinckii and Clostridium cellulovorans. *Microbial Cell Factories* 13, 1-11.
- Whitman, B. W., Bowe, T. L., & Boone, D. R. (2006). *The Methanogenic Bacteria*. Nueva York, Estados Unidos: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) .
- Wong, Y. M., Wu, T. Y., & Juan, J. C. (2014). A review of sustainable hydrogen production using seed sludge via dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 34, 471-482.
- Xing, D., Ren, N., & Rittmann, B. (2008a). Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H₂-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Applied Environmental Microbiology* 74(4), 1232-1239.
- Xing, D., Ren, N., Wang, A., Li, Q., Feng, Y., & Ma, F. (2008b). Continuous hydrogen production of auto-aggregative Ethanoligenens harbinense YUAN-3 under non-sterile condition. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(5), 1489-1495.
- Yang, Z., Guo, R., Shi, X., He, S., Wang, L., Dai, M., . . . Dang, X. (2016). Bioaugmentation of Hydrogenispora ethanolica LX-B affects hydrogen production through altering indigenous bacterial community structure. *Bioresource technology* 211, 319-326.
- Yang, Z., Wang, W., He, Y., Zhang, R., & Liu, G. (2018). Effect of ammonia on methane production, methanogenesis pathway, microbial community and reactor performance under mesophilic and thermophilic conditions. *Renewable Energy* 125, 915-925.



-
- Yu, F., Ali, S., Guan, L., Li, S., & Zhou, S. (2010). Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *Journal of Hazardous Materials* 176(1-3), 20-26.
- Yuan, T., Bian, S., Ko, J., Wu, H., & Xu, Q. (2019). Enhancement of hydrogen production using untreated inoculum in two-stage food waste digestion. *Bioresource technology* 282, 189-196.
- Zhou, Z., Zheng, Y., Huang, J., Jiang, L., Qiang, J., Wang, K., & Jiang, J. (2020). Sludge reduction and microbial structures in MBRs: Features influencing the sustainable adoption of MBRs. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 75-94.
- Ziara, R., Miller, D., Subbiah, J., & Dvorak, B. (2019). Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperature and initial pH on biohydrogen production and microbial community. *International Journal of Hydrogen Energy* 44 , 661-673.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology* 56(6), 1875-1881.



14. ANEXOS

Tabla 32. Caracterización del sustrato.

Caracterización del sustrato (RA)	
pH	4.47
Densidad (kg/m³)	1090
ST (g/g)	0.41
SV (g/g)	0.37
Humedad (%)	60.6
Carbohidratos_{totales} (g/kg)	155.4
Carbohidratos_{solubles} (g/kg)	81.5
DQO_{total} (g/kg)	316.2
DQO_{soluble} (g/kg)	118.6



Tabla 33. Configuración de ensayos en lote de la bioaumentación con la cepa *Paenibacillus polymyxa*.

Nº	Ensayo	Lodo (g)	Glucosa (mL)	RA (g)	Cultivo (mL)	Solución mineral (mL)	Agua destilada (mL)
1	Control glucosa (10g/L)	3.43	46	0	0	22	392
2	Control glucosa (10g/L)	3.43	46	0	0	22	392
3	RA+ Inóculo	3.43	0	12.43	0	22	423
4	RA + Inóculo	3.43	0	12.43	0	22	423
5	Bioaumentación 1x	3.43	0	12.43	100	22	323
6	Bioaumentación 1x	3.43	0	12.43	100	22	323
7	Bioaumentación 2x	3.43	0	12.43	200	22	223
8	Bioaumentación 2x	3.43	0	12.43	200	22	223
9	Bioaumentación 3x	3.43	0	12.43	300	22	123
10	Bioaumentación 3x	3.43	0	12.43	300	22	123
11	Bioaumentación 4x	3.43	0	12.43	400	22	23
12	Bioaumentación 4x	3.43	0	12.43	400	22	23
13	Control Inóculo endógeno	3.43	0	0	0	22	438
14	Control RA endógeno	3.43	0	12.43	0	22	423
15	Control RA endógeno	3.43	0	12.43	0	22	423



Tabla 34. Configuración de ensayos en lote de la bioaumentación con la cepa *Bacillus subtilis*.

Nº	Ensayo	Lodo (g)	RA (g)	Cultivo (mL)	Solución mineral (mL)	Agua destilada (mL)
1	Control <i>P. polymyxa</i> (100mL)	0	0	100	22	338
2	Control <i>P. polymyxa</i> (100mL)	0	0	100	22	338
3	Control <i>B. subtilis</i> (100mL)	0	0	100	22	338
4	Control <i>B. subtilis</i> (100mL)	0	0	100	22	338
5	Bioaumentación 1x	3.43	12.43	100	22	323
6	Bioaumentación 1x	3.43	12.43	100	22	323
7	Bioaumentación 2x	3.43	12.43	200	22	223
8	Bioaumentación 2x	3.43	12.43	200	22	223
9	Bioaumentación 3x	3.43	12.43	300	22	123
10	Bioaumentación 3x	3.43	12.43	300	22	123
11	Bioaumentación 4x	3.43	12.43	400	22	23
12	Bioaumentación 4x	3.43	12.43	400	22	23
13	Control Inóculo endógeno	3.43	0	0	22	438
14	Control RA endógeno	0	12.43	0	22	423
15	Control RA endógeno	0	12.43	0	22	423



Tabla 35. Configuración de ensayos en lote de la bioaumentación con la cepa *C. saccharobutylicum*.

Nº	Ensayo	Lodo (g)	RA (g)	Cultivo (mL)	Solución mineral (mL)	Agua destilada (mL)
1	Control <i>C. saccharobutylicum</i> (100mL)	0	0	100	22	338
2	Control <i>C. saccarobutylicum</i> (100mL)	0	0	100	22	338
3	RA+ Inóculo	3.43	12.43	0	22	423
4	RA + Inóculo	3.43	12.43	0	22	423
5	Bioaumentación 1x	3.43	12.43	100	22	323
6	Bioaumentación 1x	3.43	12.43	100	22	323
7	Bioaumentación 2x	3.43	12.43	200	22	223
8	Bioaumentación 2x	3.43	12.43	200	22	223
9	Bioaumentación 3x	3.43	12.43	300	22	123
10	Bioaumentación 3x	3.43	12.43	300	22	123
11	Bioaumentación 4x	3.43	12.43	400	22	23
12	Bioaumentación 4x	3.43	12.43	400	22	23
13	Control Inóculo endógeno	3.43	0	0	22	438
14	Control RA endógeno	0	12.43	0	22	423
15	Control RA endógeno	0	12.43	0	22	423



Tabla 36. Configuración de ensayos en lote de la bioaumentación con la cepa *C. beijerinckii*.

Nº	Ensayo	Lodo (g)	RA (g)	Cultivo (mL)	Solución mineral (mL)	Agua destilada (mL)
1	Control <i>C. beijerinckii</i> (100mL)	0	0	100	22	338
2	Control <i>C. beijerinckii</i> (100mL)	0	0	100	22	338
3	RA+ Inóculo	3.43	12.43	0	22	423
4	RA + Inóculo	3.43	12.43	0	22	423
5	Bioaumentación 1x	3.43	12.43	100	22	323
6	Bioaumentación 1x	3.43	12.43	100	22	323
7	Bioaumentación 2x	3.43	12.43	200	22	223
8	Bioaumentación 2x	3.43	12.43	200	22	223
9	Bioaumentación 3x	3.43	12.43	300	22	123
10	Bioaumentación 3x	3.43	12.43	300	22	123
11	Bioaumentación 4x	3.43	12.43	400	22	23
12	Bioaumentación 4x	3.43	12.43	400	22	23
13	Control Inóculo endógeno	3.43	0	0	22	438
14	Control RA endógeno	0	12.43	0	22	423
15	Control RA endógeno	0	12.43	0	22	423



Tabla 37. Configuración de ensayos en lote.

Nº	Ensayo	Lodo (g)	RA (g)	Cultivo (mL)	Solución mineral (mL)	Agua destilada (mL)
1	Control <i>P. polymyxa</i> (100mL)	3.43	12.43	100	22	323
2	Control <i>P. polymyxa</i> (200mL)	3.43	12.43	100	22	323
3	Control <i>P. polymyxa</i> (300mL)	3.43	12.43	200	22	223
4	Control <i>B. subtilis</i> (100mL)	3.43	12.43	200	22	223
5	Control <i>B. subtilis</i> (200mL)	3.43	12.43	100	22	323
6	Control <i>B. subtilis</i> (300mL)	3.43	12.43	100	22	323
7	Control <i>C. saccharobutylicum</i> (100mL)	3.43	12.43	200	22	223
8	Control <i>C. saccharobutylicum</i> (200mL)	3.43	12.43	200	22	223
9	Control <i>C. saccharobutylicum</i> (300mL)	3.43	12.43	300	22	123
10	Control <i>C. beijerinckii</i> (100mL)	3.43	12.43	300	22	123
11	Control <i>C. beijerinckii</i> (200mL)	3.43	12.43	400	22	23
12	Control <i>C. beijerinckii</i> (300mL)	3.43	12.43	400	22	23