



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
AMBIENTAL – RESIDUOS SÓLIDOS

EFFECTO DE LA BIOAUMENTACIÓN CON ESPECIES CLOSTRIDIUM SOBRE  
LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE RESIDUOS AGRÍCOLAS

PRESENTA:  
LORENA GUADALUPE CASTILLO RUBIO

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. IDANIA VALDEZ VAZQUEZ  
INSITUTO DE INGENIERÍA, UNIDAD ACADÉMICA JURQUILLA  
COMITÉ TUTORAL  
DR. ALFONSO DURÁN MORENO, FQ UNAM  
DR. OSCAR MONROY HERMOSILLO, UAM IZTAPALAPA

JURQUILLA QUERÉTARO, DICIEMBRE DE 2018



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.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Dr. Oscar Armando Monroy Hermosillo

Secretario: Dr. Alfonso Durán Moreno

Vocal 1 Dr. Julián Carrillo Reyes

Vocal 2 M. en I. Mercedes Esperanza Ramírez Camperos

Vocal 3 Dra. Idania Valdez Vazquez

Lugar donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas  
(LIPATA), UNAM – Campus Juriquilla, Querétaro.

### **TUTOR DE TESIS:**



---

Dra. Idania Valdez Vazquez

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

Al apoyo brindado por el Fondo Sectorial CONACYT-Secretaría de Energía-Sustentabilidad Energética a través del proyecto no. 249564 Clúster Biocombustibles Lignocelulósicos para el Sector Transporte del Centro Mexicano de Innovación en Bioenergía (CEMIE BIO).

A la Dra. Idania Valdez Vazquez por la dirección de esta tesis, su paciencia y conocimientos. Su asesoría fue fundamental en mi formación académica. La iniciativa y constancia con la que emprende cada proyecto son un ejemplo para todos.

Al Dr. Alfonso Durán Moreno y Al Dr. Oscar A. Monroy Hermosillo, por sus oportunos comentarios y las aportaciones que realizaron a esta tesis con sus correcciones.

A la M. en C. Marisol Pérez Rangel por compartir sus conocimientos y experiencia trabajando con cepas anaerobias. A la M. en I. Diana González Tenorio por su colaboración en la operación de los reactores y sus oportunos comentarios.

A la Dra. Ivonne Figueroa González y al Dr. Martín Barragán Trinidad por su asesoría técnica y recomendaciones. A la M. en C. Gloria Moreno Rodríguez con quien fue muy grato compartir el laboratorio de microbiología y al M. en B. Jaime Pérez Trevilla, quien mantiene en marcha los laboratorios en LIPATA.

A la Dra. Lorena Amaya Delgado y al compañero Ing. Eduardo Reyes, gracias a ellos la estancia en CIATEJ fue provechosa en conocimientos y experiencia.

Al grupo de investigación de bioalcoholes bajo la dirección de la Dra. Idania Valdez. Por el trabajo en equipo, sus aportaciones en el laboratorio y sus valiosas observaciones. GRACIAS compañeros: Marisol, Diana, Carolina, Ana, Adán, Alejandra, Karla y Christian.

## **DEDICATORIAS**

A ti, porque mereces lo mejor de mí.

A Lorena, Enrique y Servando, por siempre y por todo GRACIAS.

A Lety, por su incansable alegría

A Payo, por su invaluable amistad.

A los profanos en la materia, gracias por leer este documento.

**POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.**

## RESUMEN

El término bioaumentación se refiere a la adición de microorganismos con metabolismos específicos y complementarios a bioprocesos con la pre-existencia de cultivos mixtos. En este trabajo, se evaluó el efecto de la bioaumentación con *Clostridium cellulovorans* y *Clostridium acetobutylicum* sobre reactores productores de hidrógeno alimentados con residuos agrícolas. Primero, se caracterizaron las capacidades fermentativas e hidrolíticas de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum* en ensayos en monocultivo en glucosa y carboximetilcelulosa como sustratos. Se encontró que *C. acetobutylicum* tiene mayores capacidades fermentativas (velocidad de crecimiento en glucosa 1.8 veces mayor) que *C. cellulovorans*, pero no capacidad de hidrólisis. Después, se comprobó que, bajo condiciones estériles, los cocultivos integrados por estas dos especies de *Clostridium*, producen hasta dos veces más hidrógeno a partir de un sustrato lignocelulósico, que cuando se crecen por separado (monocultivos). Sin embargo, la bioaumentación sólo tuvo un efecto significativo sobre la producción de hidrógeno cuando la bioaumentación se realizó con los monocultivos. Asimismo, la bioaumentación con *C. cellulovorans* incrementó la producción de hidrógeno sólo en paja de trigo (3 veces) y rastrojo de maíz (1.5 veces) respecto de los tratamientos sin bioaumentación. La bioaumentación en bagazos de agave y caña no presentó aumento sobre la producción de hidrógeno. Este trabajo prueba que el efecto de la bioaumentación en bioprocesos consolidados es positivo en algunos sustratos incrementando la producción de hidrógeno.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
2.1 IMPACTOS AMBIENTALES DE LOS COMBUSTIBLES FÓSILES .....	11
2.2 BIOENERGÍA A PARTIR DE RESIDUOS AGRÍCOLAS.....	12
2.3 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA .....	13
2.4 PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO.....	15
2.4.1PRETRATAMIENTO .....	16
2.4.2 HIDRÓLISIS.....	19
2.4.3 FERMENTACIÓN OSCURA .....	20
2.4.4 <i>CLOSTRIDIUM</i> .....	22
2.5 NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.....	23
2.5.1 FERMENTACIÓN EN FASE SÓLIDA (FFS) .....	23
2.5.2 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SFS) .....	24
2.5.3 BIOPROCESO CONSOLIDADO.....	25
2.6 USO DE CULTIVOS MIXTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO .....	26
<b>3. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>28</b>
3.1 HIPÓTESIS.....	28
3.2 OBJETIVO .....	28
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
3.4 ALCANCES.....	28
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>29</b>
4.1 CEPAS DE TRABAJO .....	29
4.2 CARACTERIZACIÓN DE MONOCULTIVOS EN SUSTRATOS SOLUBLES .....	30
4.2.1 INÓCULO .....	30
4.2.2 PROCEDIMIENTO .....	30
4.3 EFECTO DE LA RELACIÓN INÓCULO HIDROLÍTICO (IH): INÓCULO FERMENTATIVO (IF) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO .....	31
4.3.1 INÓCULO .....	31
4.3.2 SUSTRATO .....	31
4.3.3 PROCEDIMIENTO .....	31
4.4 BIOAUMENTACIÓN DE REACTORES PRODUCTORES DE HIDRÓGENO.....	32
4.4.1 ETAPA DE FERMENTACIÓN NATURAL.....	32
4.4.2 ETAPA DE BIOAUMENTACIÓN .....	33
4.4.3 ENSAYO CONFIRMATIVO .....	34
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
4.5.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES ESTRUCTURALES .....	36
4.5.2 CRECIMIENTO MICROBIANO .....	37
4.5.3 PH.....	37

4.5.4 CONTENIDO DE AZÚCARES (GLUCOSA Y XILOSA) .....	37
4.5.5 ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SOLVENTES .....	37
4.5.6 VOLUMEN Y COMPOSICIÓN DE BIOGÁS .....	38
4.5.7 SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS VOLÁTILES Y CENIZAS .....	38
4.6 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS .....	38
4.6.1 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO .....	38
4.6.2 PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO .....	39
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	39
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
5.1 CARACTERIZACIÓN DE MONOCULTIVOS EN SUSTRATOS SOLUBLES .....	40
5.2 EFECTO DE LA PROPORCIÓN ENTRE EL INÓCULO HIDROLÍTICO (IH) Y EL INÓCULO FERMENTATIVO (IF) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO .....	47
5.3 BIOAUMENTACIONES DE REACTORES PRODUCTORES DE HIDRÓGENO .....	52
5.4 ENSAYO DE BIOAUMENTACIÓN CONFIRMATORIO .....	58
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>65</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>66</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 2- 1</b> RESIDUOS AGRÍCOLAS EN 2017 PARA LOS PRINCIPALES CULTIVOS EN MÉXICO .....	13
<b>TABLA 2- 2</b> COMPOSICIÓN QUÍMICA DE RESIDUOS AGRÍCOLAS. ....	14
<b>TABLA 2- 3</b> DESVENTAJAS DE LOS PRETRATAMIENTOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES 2G.....	18
<b>TABLA 2- 4</b> PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR ESPECIES CLOSTRIDIUM.....	23
<b>TABLA 4- 1</b> DISEÑO EXPERIMENTAL, PROPORCIONES INÓCULO HIDROLÍTICO-INÓCULO FERMENTATIVO (IH:IF) .....	32
<b>TABLA 4- 2</b> DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA BIOAUMENTACIÓN DE REACTORES PRODUCTORES DE HIDRÓGENO, INÓCULO HIDROLÍTICO- INÓCULO FERMENTATIVO (IH:IF). ....	33
<b>TABLA 4- 3</b> COMPOSICIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS SIN PRETRATAMIENTO Y DESPUÉS DE PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO. ....	34
<b>TABLA 5- 1</b> PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN OBTENIDOS EN LOS MONOCULTIVOS DE <i>C. CELLULOVORANS</i> Y <i>C.</i> <i>ACETOBUTYLICUM</i> .....	43
<b>TABLA 5- 2</b> COMPARACIÓN DE PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN POR <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> EN GLUCOSA.....	44
<b>TABLA 5- 3</b> PARÁMETROS CINÉTICOS DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO PARA <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> Y <i>C.</i> <i>CELLULOVORANS</i> EN SUSTRATOS SOLUBLES.....	45
<b>TABLA 5- 4</b> RENDIMIENTO DE HIDRÓGENO PARA ESPECIES CLOSTRIDIUM A PARTIR DE SUSTRATOS SOLUBLES.	46
<b>TABLA 5- 5</b> PARÁMETROS CINÉTICOS CON AJUSTE DE GOMPERTZ DE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO CON COCULTIVOS DE <i>C. CELLULOVORANS</i> (Cc) Y <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> (Ca) EN DIFERENTES PROPORCIONES... ..	49
<b>TABLA 5- 6</b> ACUMULACIÓN DE PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN OBTENIDOS EN LOS MONO Y COCULTIVOS DE <i>C.</i> <i>CELLULOVORANS</i> Y <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> .....	50
<b>TABLA 5- 7</b> PARÁMETROS CINÉTICOS PARA EL CICLO DE FERMENTACIÓN CON BIOAUMENTACIÓN A REACTORES DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO ALIMENTADOS CON PAJA DE TRIGO.....	54
<b>TABLA 5- 8</b> PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES PARA EL CICLO DE FERMENTACIÓN CON BIOAUMENTACIÓN A REACTORES DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO ALIMENTADOS CON PAJA DE TRIGO. ..	55
<b>TABLA 5- 9</b> PORCENTAJE DE CONSUMO DE SUSTRATO PARA EL CICLO DE FERMENTACIÓN CON BIOAUMENTACIÓN A REACTORES DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO ALIMENTADOS CON PAJA DE TRIGO. ..	57
<b>TABLA 5- 10</b> PARÁMETROS CINÉTICOS OBTENIDOS CON EL AJUSTE DE GOMPERTZ PARA EL CICLO DE FERMENTACIÓN NATURAL Y EL CICLO DE BIOAUMENTACIÓN CON <i>C. CELLULOVORANS</i> . ....	59
<b>TABLA 5- 11</b> COMPARACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE DIFERENTES RESIDUOS AGRÍCOLAS SIN PRETRATAMIENTO. ....	60
<b>TABLA 5- 12</b> COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA DE LA BIOAUMENTACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN REACTORES ALIMENTADOS CON SUSTRATOS ORGÁNICOS E INÓCULOS FERMENTATIVOS .....	62
<b>TABLA 5- 13</b> PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES PARA EL CICLO DE FERMENTACIÓN NATURAL Y EL CICLO DE BIOAUMENTACIÓN CON <i>C. CELLULOVORANS</i> . ....	63
<b>TABLA 5- 14</b> CONSUMO DE MATERIA LIGNOCELULÓSICA DESPUÉS DEL CICLO DE BIOAUMENTACIÓN.....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 2- 1</b> TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO A PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA .....	15
<b>FIGURA 2- 2</b> ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA Y EL EFECTO DEL PRETRATAMIENTO.....	17
<b>FIGURA 2- 3</b> ESTRUCTURA DEL POLÍMERO DE CELULOSA. LA CELULOSA CRISTALINA (ROJO) ES SEPARADA DE LA CELULOSA AMORFA (NEGRO) POR ACCIÓN ENZIMÁTICA. ....	20
<b>FIGURA 2- 4</b> RUTA METABÓLICA DE LA FERMENTACIÓN OSCURA.....	21
<b>FIGURA 2- 5</b> CONFIGURACIÓN DE UN PROCESO DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN EN FASE SÓLIDA PARA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.....	25
<b>FIGURA 2- 6</b> CONFIGURACIONES DE BIOPROCESOS PARA LA CONVERSIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA EN BIOCOMBUSTIBLES. ....	26
<b>FIGURA 4- 1</b> FASES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	29
<b>FIGURA 5- 1</b> CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN MONOCULTIVO DE <i>C. CELLULOVORANS</i> EN (A) GLUCOSA Y (B) CARBOXIMETILCELULOSA. ....	40
<b>FIGURA 5- 2</b> CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN MONOCULTIVO DE <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> EN (A) GLUCOSA Y (B) CARBOXIMETILCELULOSA. ....	41
<b>FIGURA 5- 3</b> PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN LOS MONOCULTIVOS DE <i>C. CELLULOVORANS</i> Y <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> EN (A) GLUCOSA Y (B) CARBOXIMETILCELULOSA. ....	45
<b>FIGURA 5- 4</b> (A) PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO DE MONOCULTIVOS DE <i>C. CELLULOVORANS</i> (Cc) Y <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> (Ca) USANDO PAJA DE TRIGO COMO SUSTRATO. (B) PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO CON EL COCULTIVO Cc-Ca EN DIFERENTES PROPORCIONES.....	48
<b>FIGURA 5- 5</b> (A) PERFILES DE pH EN LAS CINÉTICAS DE MONOCULTIVO EN PAJA DE TRIGO TRATADA BIOLÓGICAMENTE. (B) PERFILES DE pH EN LAS CINÉTICAS PARA DIFERENTES COMBINACIONES DE <i>C. CELLULOVORANS</i> ; <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> .....	50
<b>FIGURA 5- 6</b> PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN: CICLO DE FERMENTACIÓN NATURAL (ROSA) CON MN DE LA PAJA DE TRIGO Y CICLO DE BIOAUMENTACIÓN (VERDE) CON MONO Y COCULTIVOS DE <i>C. CELLULOVORANS</i> Y <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> . ....	53
<b>FIGURA 5- 7</b> PERFILES DE PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN EL CICLO DE FERMENTACIÓN NATURAL (ROSA) Y EL CICLO DE BIOAUMENTACIÓN (VERDE) CON EL MONOCULTIVO DE <i>C. CELLULOVORANS</i> . ....	58

## 1. INTRODUCCIÓN

Los combustibles fósiles abastecen más del 80% de la energía requerida por los principales sectores de consumo energético: transporte e industria. Sin embargo, la combustión de combustibles fósiles contribuye a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). La sobreexplotación de los combustibles fósiles, aunada a la tasa de crecimiento de la demanda energética, permite estimar que el pico máximo de consumo de petróleo y sus derivados será en 2025. Después de ese año, disminuirá debido al agotamiento del recurso (Mohr *et al.*, 2015).

El uso de biocombustibles para reemplazar a los derivados del petróleo se ha planteado como una realidad, para reducir las emisiones de GEI. Situaciones de tipo económico y social, como el alza en los precios del petróleo y el escenario político de los países dueños de las principales reservas de hidrocarburos motivan el desarrollo de energías alternativas. Por su abundancia en la naturaleza, la biomasa y sus derivados son una alternativa promisorio como fuente de energía (Quintero *et al.*, 2011).

Los polímeros de cadena larga que componen la biomasa lignocelulósica (BL) son complejos y requieren varios procesos para solubilizarlos y convertirlos en monómeros. Una vez obtenidos, estos monómeros podrán fermentarse en compuestos de alto contenido energético como etanol, butanol, metano o hidrógeno (Saxena *et al.*, 2009). El proceso de obtención de hidrógeno a partir de biomasa lignocelulósica involucra: pretratamiento, hidrólisis y fermentación (Argun *et al.*, 2009; Rezanian *et al.*, 2017).

El pretratamiento biológico con microorganismos nativos del sustrato ha probado ser eficiente para degradar la hemicelulosa y dejar disponible para hidrolizar la celulosa. El pretratamiento biológico no es agresivo con el medio ambiente, es económico y no genera efluentes tóxicos que requieren tratamiento para su disposición final (Sindhu *et al.*, 2016; Brémond *et al.*, 2018).

El bioproceso consolidado plantea realizar de manera simultánea la hidrólisis y fermentación para la conversión de biomasa lignocelulósica en biocombustibles en una sola etapa. En esta estrategia se hace uso de microorganismos con metabolismos hidrolíticos y fermentativos (Parisutham *et al.*, 2014; Talluri *et al.*, 2013). La hidrólisis es el paso limitante en el proceso de conversión y a través de la bioaugmentación puede mejorarse este proceso (Čater *et al.*,

2015). La bioaumentación es una estrategia para enriquecer la comunidad microbiana de un reactor y acelerar la degradación de los compuestos lignocelulósicos (Nzila, 2017).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la bioaumentación de reactores productores de hidrógeno con un cocultivo compuesto por una especie hidrolítica y una fermentativa. Los reactores productores de hidrógeno estuvieron alimentados con residuos agrícolas de trigo, maíz, agave y caña de azúcar sin pretratamiento. Los sustratos fueron sometidos a fermentación con los microorganismos nativos (MN) presentes de manera natural en cada tipo de residuo agrícola. Las bacterias utilizadas para la bioaumentación pertenecen al género *Clostridium*, se trata de *Clostridium cellulovorans* y *Clostridium acetobutylicum*. Este modo de operación reduciría en una unidad de proceso las etapas de pretratamiento, hidrólisis y fermentación de celulosa y aumentaría la producción de hidrógeno.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 IMPACTOS AMBIENTALES DE LOS COMBUSTIBLES FÓSILES

La energía representa un papel fundamental en el desarrollo de las sociedades para mejorar la calidad de vida. Debido al crecimiento exponencial de la población, la demanda de energía es cada vez mayor. Se estima que el 85% del consumo mundial energético es abastecido de fuentes no renovables: derivados del petróleo, carbón mineral y gas natural (Abdalla *et al.*, 2018).

Los combustibles derivados del petróleo tienen la característica de no ser renovables, y su uso está limitado a la capacidad de las reservas naturales (Mohr *et al.*, 2015). Los problemas ambientales por el uso de energía fósil son en su mayoría las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) que se generan. En las últimas dos décadas las emisiones mundiales de CO<sub>2</sub> por combustión de combustibles fósiles aumentaron en un 58%, en 2016, estas emisiones fueron 32.3 Gt (IEA, 2016).

El incremento en la concentración de GEI en la atmósfera, altera el efecto invernadero que permite regular la temperatura del planeta y mantener condiciones óptimas para la vida. En promedio la temperatura superficial del planeta es de 24.8 °C. Wuebbles y Jain (2001) reportan que con la tasa actual de emisiones, la temperatura podría verse afectada, incrementando entre 1 y 5 °C durante el siglo XXI. El cambio climático altera fenómenos naturales, y provoca la incidencia de fuertes huracanes, sequías y periodos largos de precipitaciones intensas.

Otras complicaciones ambientales se generan por las deficientes prácticas de disposición de residuos de la industria petrolera. Las descargas accidentales o intencionales de hidrocarburos al medio ambiente, representan una importante fuente de contaminación en suelos y aguas (Zamora *et al.*, 2012). Los contaminantes liberados son sustancias hidrofóbicas y resistentes a la biodegradación, que perturban los procesos biogeoquímicos de las especies que habitan las áreas afectadas (Vasudevan & Rajaram, 2001).

La preocupación mundial por disminuir las emisiones de GEI ha motivado la firma de acuerdos internacionales que fomentan el desarrollo de energías alternativas. Las naciones pertenecientes a organizaciones como la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) han comenzado a plantear dentro de sus agendas políticas, un plan

de desarrollo en sectores estratégicos que incentive la producción y el uso de biocombustibles a partir de biomasa (Razo *et al.*, 2007).

## **2.2 BIOENERGÍA A PARTIR DE RESIDUOS AGRÍCOLAS**

La bioenergía es la energía obtenida a partir del tratamiento, directo o indirecto de materia orgánica llamada biomasa. A partir de este tratamiento se pueden obtener biocombustibles de tipo líquidos (biodiesel y bioalcoholes), gaseosos (biogás, hidrógeno y metano) y sólidos (pellets, carbón vegetal y briquetas). Por su naturaleza renovable los biocombustibles son considerados una buena opción para sustituir a los combustibles fósiles (Liew *et al.*, 2014).

Derivado de los compromisos internacionales, se han creado fondos y legislaciones que impulsan la investigación y desarrollo de tecnologías bioenergéticas. En México la Ley de promoción y desarrollo de bioenergéticos publicada en 2008 tiene por objetivo coadyuvar a la diversificación energética a través de apoyos al campo para promover la producción de bioenergía a partir de actividades agropecuarias, forestales y procesos biotecnológicos que no comprometan la seguridad alimentaria. Con ello se busca un desarrollo integral que genere empleos, reactive el sector rural y mejore la calidad de vida, procurando reducir la emisión de contaminantes y GEI (Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, 2008).

México cuenta con una posición geográfica ideal que le permite albergar diversos climas y ecosistemas en su territorio. Esta diversidad tiene como resultado el desarrollo de una agricultura basta en variedad y cantidad en las diferentes zonas agrícolas del país. Los principales productos agrícolas cultivados en México son: caña de azúcar (57.4 Mton), maíz en grano (27.8 Mton), trigo en grano (3.5 Mton) y agave tequilero (1.7 Mton) (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SAGARPA, 2017). Con base en el índice de residuos de grano determinado por Valdez-Vazquez *et al.* en 2010 se estima el potencial de residuos agrícolas para los cultivos de mayor producción en México (ver Tabla 2-1).

**Tabla 2- 1** Residuos agrícolas en 2017 para los principales cultivos en México

<b>Cultivo</b>	<b>Índice de residuos (kg materia seca/kg cultivo producido)</b>	<b>Producción Anual 2017 (Mton)</b>	<b>Residuos generados 2017 (Mton)</b>
Caña de azúcar	0.15	57.4	8.6
Maíz	1.5	27.8	41.7
Trigo	1.5	3.5	5.3
Agave	0.12	1.7	0.2

Los residuos agrícolas generados en 2017 ascienden a 55.8 Mton. Por el tonelaje de producción, disponibilidad y bajo costo, los este tipo de residuos representan una ventaja económica para el proceso de producción de biocombustibles (O'Connor, 2013). Las prácticas agrícolas actuales utilizan parte de estos residuos como forraje, fertilizante, compostaje o combustible (Razo *et al.*, 2007). El uso de residuos agrícolas para producir energía, resuelve el problema de manejo de residuos y abastecimiento energético. La valorización de estos residuos promueve la economía en zonas rurales.

### **2.3 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA**

Entre los principales productos del proceso de fotosíntesis se encuentra la glucosa. Este monosacárido puede transformarse en compuestos de mayor contenido energético, como los lípidos. También puede convertirse en polímeros como celulosa, hemicelulosa y lignina para formar parte de la estructura de las plantas. Fundamentalmente la biomasa se compone de: 1) carbohidratos (azúcares, celulosa y hemicelulosa), 2) lignina, 3) proteínas y 4) lípidos (aceites y ácidos grasos) (O'Connor, 2013).

La biomasa compuesta principalmente por carbohidratos y lignina es conocida como biomasa lignocelulósica (BL), de manera general, puede clasificarse en: 1) residuos agrícolas, 2) madera dura, 3) madera blanda, 4) residuos de celulosa, 5) biomasa herbácea y 6) residuos sólidos municipales (Quintero *et al.*, 2011).

La composición química de los residuos agrícolas es variable. Depende de la variedad de cada especie de cultivo y de las características edafológicas y climáticas del lugar de siembra. En la Tabla 2-2 se muestran las composiciones de celulosa, hemicelulosa y lignina reportadas en literatura.

**Tabla 2- 2** Composición química de residuos agrícolas.

<b>Residuo</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Referencia</b>
Bagazo de caña	32 - 44	26- 32	19 - 24	Sánchez, 2009; Liu et al., 2018.
Paja de trigo	34-49	19-28	8-17	Valdez-Vazquez et al., 2015; Bellido et al 2014; Qureshi et al., 2009.
Rastrojo de maíz	31-39	21-32	13-22	Zhang et al., 2007; Ou et al., 2017
Bagazo de Agave	43-47	19-23	11-17	Arreola-Vargas et al., 2015; Rigal et al., 2017.

Los componentes de la biomasa (celulosa, hemicelulosa y lignina) son biopolímeros que están fuertemente unidos entre sí con enlaces covalentes. La celulosa (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>) está formada por cadenas lineales de la molécula β-D-glucosa mediante enlaces β-1,4-O-glucosídico. La hemicelulosa es una mezcla de polisacáridos tales como glucosa, manosa, xilosa, galactosa y arabinosa, así como ácidos glucurónicos, galacturónico y metilglucorónico. Ambas están asociadas en la pared de las células vegetales, de manera que la hemicelulosa se encuentra recubriendo las fibras de celulosa (Hendriks & Zeeman, 2009; Sánchez, 2009; Arantes & Saddler, 2010)

La lignina se construye de ácidos y alcoholes fenil propílicos, estos compuestos de alto peso molecular están formados por carbonos ligados a anillos bencénicos con grupos metóxilos e hidróxilo. La lignina se encuentra en las paredes celulares que forman la corteza, gracias a las complejas uniones de su estructura las plantas vasculares presentan resistencia y rigidez (Saxena *et al.*, 2009).



## 2.4 PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO

El hidrógeno es considerado como el combustible “más limpio” debido a que su combustión genera vapor de agua y no emite GEI (Zhang *et al.*, 2006). El potencial energético del hidrógeno es 122 MJ/kg y es superior al de otros combustibles como el metano (50.7 MJ/kg), el etanol (29.7 MJ/kg) o las gasolinas convencionales (43.7 MJ/kg). Además, la eficiencia en la conversión de hidrógeno a electricidad es superior al 80% (Auria *et al.*, 2016).

El hidrógeno también es ampliamente usado en la industria química para la síntesis de diferentes productos de valor, como amoníaco, metanol y algunos polímeros. El 96% de la demanda de hidrógeno en el mundo se abastece de fuentes fósiles: 48% de gas natural, 18% de carbón mineral y 30% de otras fuentes. El hidrógeno procedente de fuentes fósiles se obtiene a través del reformado con vapor de hidrocarburos. Otras tecnologías de producción de hidrógeno incluyen la electrólisis y termólisis (Voloshin *et al.*, 2016; Abdalla *et al.*, 2018).

El uso de biomasa para la producción de hidrógeno es una opción atractiva, debido a la disponibilidad del sustrato y las características ambientales del hidrógeno como fuente de energía. Las tecnologías de conversión de biomasa lignocelulósica en hidrógeno divididas de acuerdo con Kalinci *et al.*, (2009) se clasifican en dos corrientes mostradas en la Figura 2-1.



**Figura 2- 1** Tecnologías de producción de hidrógeno a partir de biomasa lignocelulósica (Kalinci *et al.*, 2009).

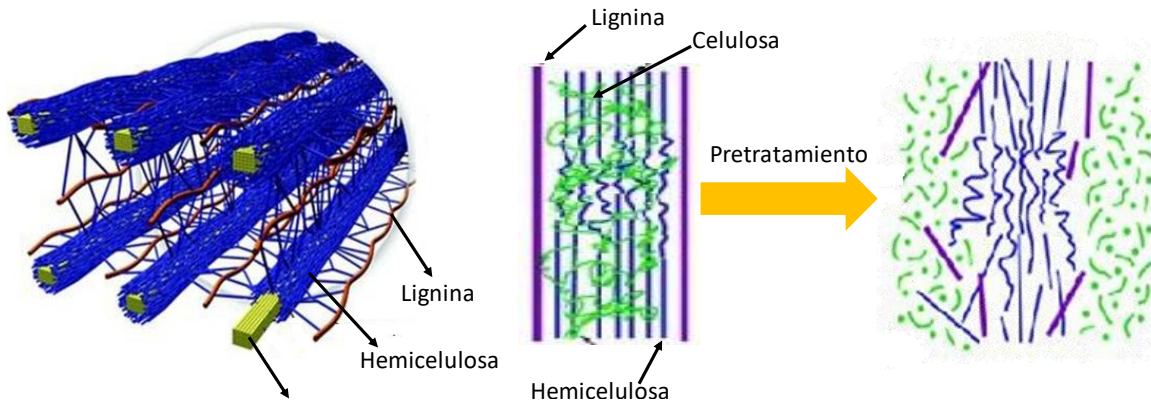
Las rutas de conversión se dividen en termoquímicas y bioquímicas. Las termoquímicas incluyen pirólisis, gasificación y gasificación de agua supercrítica (SCWG, por sus siglas en inglés). Estas técnicas requieren suministrar altas temperaturas a la biomasa y uso de agua en el caso de la SCWG (Kalinci *et al.*, 2009).

La fermentación para producción de hidrógeno puede subdividirse en fermentación oscura y fotofermentación. La fermentación oscura se lleva a cabo por bacterias acidogénicas, destacan las del género *Clostridium*. La fotofermentación es otra alternativa de conversión y es un proceso característico de las bacterias fotoheterotróficas del género *Rhodobacter* (Rezania *et al.*, 2017). Otros procesos novedosos como BWGS (Biological Water Gas Shift Reaction) requieren bacterias anaerobias como *Rubrivivax gelatinosus*; a partir de monóxido de carbono y en presencia de agua, estos microorganismos, producen hidrógeno y dióxido de carbono (Kalinci *et al.*, 2009).

El proceso para la transformación de biomasa lignocelulósica a biocombustibles requiere de varias etapas que transformen los polímeros de la estructura lignocelulósica a monómeros fermentables. El proceso inicia con la etapa de 1) Pretratamiento, para fraccionar la hemicelulosa y lignina con el fin de acceder a la celulosa. Posteriormente en la 2) Hidrólisis, la celulosa expuesta debe sintetizarse para obtener azúcares fermentables como la glucosa. Los azúcares recuperados se someten a 3) Fermentación oscura, cuyos productos finales son ácido acético, ácido butírico, hidrógeno y dióxido de carbono. El efluente de fermentación con ácidos grasos volátiles puede ser tratado en etapas de fotofermentación para producción de hidrógeno (Nigam & Singh, 2011; Kalinci *et al.*, 2009).

#### **2.4.1PRETRATAMIENTO**

Los procesos de pretratamiento son necesarios para fragmentar la hemicelulosa y lignina y dejar expuesta la celulosa para su posterior hidrólisis (Figura 2-2). Los pretratamientos pueden ser mecánicos, térmicos, químicos, biológicos o una combinación de ellos (Quintero *et al.*, 2011).



**Figura 2- 2** Estructura de la biomasa lignocelulósica y el efecto del pretratamiento (Mosier *et al.*, 2005).

1) Pretratamiento mecánico; es la reducción del tamaño de partícula y tiene como objetivo aumentar el área superficial para posteriores reacciones bioquímicas. La molienda del material lignocelulósico, reduce entre 25 y 59% el tiempo de fermentación, ya que la disminución del tamaño está relacionada con el incremento en el grado de hidrólisis (Chang & Holtzapple, 2000).

2) Pretratamiento térmico, consiste en someter la BL a temperaturas entre 150°C y 230°C, de manera directa o con agua caliente o vapor (Garrote *et al.*, 1999).

3) Pretratamiento químico, es la adición de ácidos, bases o compuestos oxidantes para solubilizar la hemicelulosa y lignina. La adición de ácidos fuertes promueve la hidrólisis de la hemicelulosa, sobre todo el xilano como glucomanano (Pereira Ramos, 2003).

El tratamiento alcalino promueve reacciones de solvatación y saponificación que hinchan la biomasa dejando la celulosa libre (Gossett *et al.*, 1982). El tratamiento oxidativo consiste en la adición de compuestos como peróxido de hidrógeno o ácido paracético, que llevan a cabo reacciones de sustitución electrofílica, desplazamiento de cadenas laterales, escisión de enlaces alquilaril-éter o la escisión oxidativa de aromáticos nucleicos (Hendriks & Zeeman, 2009b).

4) Pretratamiento biológico, se hace uso de microorganismos capaces de producir enzimas que pueden degradar la pared celular de la biomasa lignocelulósica. Los hongos blancos cuentan con características metabólicas que les permiten producir enzimas que actúan sobre la lignina y la hemicelulosa, a diferencia de los hongos cafés que suelen degradar la celulosa.

Cuando existe un déficit de carbón y nitrógeno los hongos blancos como: *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sordida* 37, *Pycnoporus cinnabarinus* 115, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ceriporiopsis subvermispora* y *Cyathus stercoreus* presentan producción de enzimas como: lignina peroxidasas, manganeso-peroxidasas dependientes, polifenol oxidasas, lacasas y enzimas reductoras de quinonas que degradan la hemicelulosa. A diferencia de otros pre-tratamientos, el biológico cuenta con menores requerimientos de energía y no representa un riesgo ambiental (Sun & Cheng, 2002).

Los pretratamientos tienen ciertas desventajas (Tabla 2-3) ya que suelen ser costosos por la energía que requieren, y tienden a formar sustancias inhibitorias para los procesos posteriores de hidrólisis y fermentación (Pereira Ramos, 2003; Quintero *et al.*, 2011).

**Tabla 2- 3** Desventajas de los Pretratamientos en la producción de biocombustibles 2G.

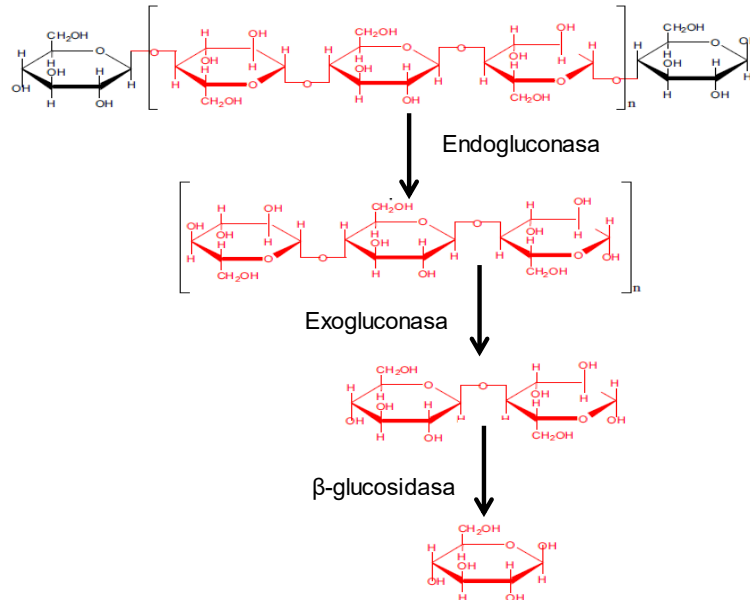
Tipo de Pretratamiento	Desventajas
Mecánico	Costo de la energía empleada por la maquinaria de molienda (Lara-Vázquez <i>et al.</i> , 2014)
Térmico	Formación de productos no deseables, la lignina a temperaturas mayores a 160°C, tiende a formar compuestos fenólicos tóxicos (Gossett <i>et al.</i> , 1982). Gasto energético para elevar la temperatura del proceso.
Químico	<p><u>Ácido:</u> Parte de la hemicelulosa que se solubiliza es susceptible a hidrolizarse produciendo monómeros, furfural, y otros productos volátiles (Pereira Ramos, 2003).</p> <p><u>Alcalino:</u> Pérdida de polisacáridos y carbón mediante la formación de CO<sub>2</sub>, además la biomasa consume una cierta alcalinidad, y la concentración que resulta es el residuo que la materia no absorbe (Gossett <i>et al.</i>, 1982).</p> <p><u>Oxidativo:</u> Formación de inhibidores, como la descomposición de lignina en compuestos aromáticos (Quintero <i>et al.</i>, 2011).</p>

## 2.4.2 HIDRÓLISIS

La etapa de hidrólisis tiene el propósito de fraccionar la celulosa en azúcares para que puedan ser asimilados por microorganismos fermentativos. La hidrólisis puede realizarse añadiendo agentes ácidos o alcalinos, así como empleando enzimas específicas que actúan sobre la celulosa y tienen como producto azúcares reductores. Las desventajas de la hidrólisis química son los compuestos inhibitorios que se forman, los riesgos de seguridad al trabajar con sustancias corrosivas y el costo de las condiciones de operación. La hidrólisis alcalina llega a ser menos eficiente que la ácida (Sun & Cheng, 2002).

La hidrólisis enzimática es un área de oportunidad para reducir los costos de producción de biocombustibles. A diferencia de otro tipo de hidrólisis, la enzimática opera a temperaturas más bajas (45-50°C, pH 4.8) y se evitan problemas de corrosión en equipos. Sin embargo, las mezclas de enzimas que comercialmente están disponibles añaden un costo significativo en el proceso. Para resolver este gasto varias investigaciones están dirigidas al uso y optimización de microorganismos productores de enzimas celulolíticas (Sun & Cheng, 2002).

Las enzimas que se encargan de degradar la celulosa se dividen en tres tipos: 1) Endogluconasa, encargada de romper las cadenas internas de la molécula de celulosa y producir oligosacáridos. 2) Exogluconasa, ataca los extremos desplegados por las endogluconasas dando origen a algunas moléculas de glucosa y principalmente celobiosa; y 3)  $\beta$ -glucosidasa, rompe los últimos enlaces que forman la celobiosa, para descomponerla finalmente en glucosa disponible (Figura 2.3)(Quintero *et al.*, 2011).

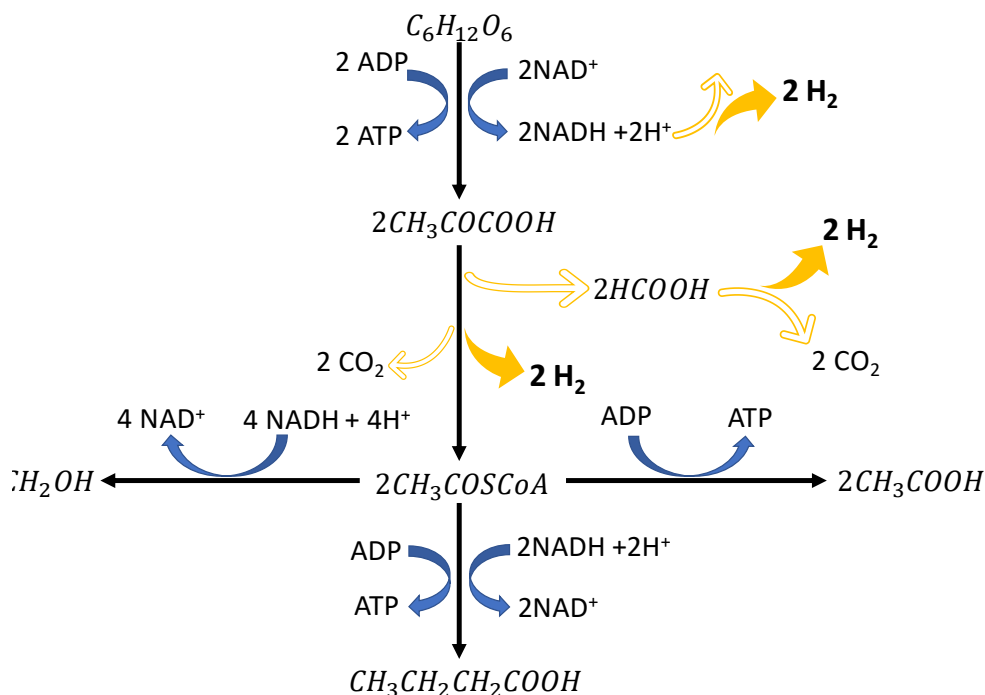


**Figura 2- 3** Estructura del polímero de celulosa. La celulosa cristalina (rojo) es separada de la celulosa amorfa (negro) por acción enzimática (Juturu *et. al* 2014).

Existen bacterias que presentan metabolismos celulolíticos capaces de hidrolizar celulosa y hemicelulosa por acción enzimática. Se caracterizan por desarrollar un celulosoma, que es un complejo multi-enzimático extracelular. En organismos anaerobios este complejo está unido a la pared celular evitando pérdidas por difusión del sustrato hidrolizado (Lopez-Contreras *et al.*, 2003). Otros microorganismos que intervienen en la degradación de la biomasa lignocelulósica son los hongos. Por ejemplo, hongos de podredumbre blanca son capaces de convertir lignina en CO<sub>2</sub>; los hongos de podredumbre café producen enzimas que cortan las cadenas de polímeros que forman la celulosa. Los hongos son importantes en el ciclo del carbón como principales degradadores de material lignocelulósico (Sánchez, 2009).

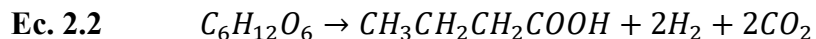
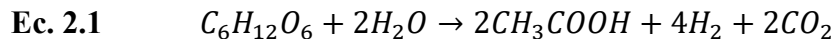
### 2.4.3 FERMENTACIÓN OSCURA

La fermentación oscura la realizan bacterias anaerobias que aprovechan una amplia variedad de sustratos para convertirlos a hidrógeno, dióxido de carbono y ácidos grasos volátiles (Argun *et al.*, 2009). En la Figura 2-4 se muestra la ruta bioquímica que siguen los microorganismos durante la fermentación oscura utilizando glucosa como sustrato (Li & Fang, 2007).



**Figura 2- 4** Ruta metabólica de la fermentación oscura (Li *et. al*;2007).

El proceso fermentativo comienza con la descomposición de glucosa a piruvato por la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) generando adenosín trifosfato (ATP) y nicotín adenín dinucleótido (NADH). El piruvato es catalizado por piruvato ferredoxina oxidorreductasa e hidrogenasa para formar acetyl-CoA, éste compuesto seguirá tres vías de conversión dependiendo de cada microorganismo. El NADH generado previamente interviene en la formación de butirato y etanol. En la síntesis de acetato y butirato se genera ATP. Los principales productos de fermentación son hidrógeno, dióxido de carbono, ácido acético y ácido butírico, de acuerdo a las ecuaciones 2.1 y 2.2 (Hassan & Morsy, 2015).



#### 2.4.4 *Clostridium*

Las bacterias *Clostridium* son el género dominante en los cultivos mixtos utilizados como inóculo para la producción de hidrógeno (Fan *et al.*, 2006; Hassan & Morsy, 2015; Wu *et al.*, 2017). El género *Clostridium* se conforma por más de cien especies, y se caracterizan por ser anaerobias estrictas, contar con una pared celular Gram positiva, formar endoesporas resistentes al calor y ser incapaces de reducir compuestos con sulfato (Sauer *et al.*, 2016). Su desarrollo es óptimo en rangos de temperatura de 30°C a 37 °C, en medios con pH de 6.0 a 7.5 (Janssen *et al.*, 2014; Rezania *et al.*, 2017; Argun *et al.*, 2009).

Algunas especies dentro de este género cuentan con celulosoma y las enzimas necesarias para degradar biomasa lignocelulósica. *Clostridium cellulovorans* (Wen *et al.*, 2014) y *Clostridium thermocellum* (Sun & Cheng, 2002) son algunos ejemplos. Se ha observado que *Clostridium acetobutylicum* secreta las enzimas endogluconasas y  $\beta$ -glucosidasa pero no produce exo-gluconasa necesaria para hidrolizar celulosa (Lopez-Contreras *et al.*, 2003).

No todas las especies de *Clostridium* tienen características hidrolíticas, por lo tanto, no pueden crecer en celulosa cristalina. Sin embargo, la mayoría de las especies no hidrolíticas presentan producción de solventes cuando tienen glucosa como sustrato. Este tipo de fermentación se denomina fermentación ABE (Ponthein & Cheirsilp, 2011; Ni & Sun, 2009). Entre las especies fermentativas se encuentran: *Clostridium pasteurianum*, (Kolek *et al.*, 2016), *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, *Clostridium saccharobutylicum*, (Janssen *et al.*, 2014), *Clostridium acetobutylicum*(Wen *et al.*, 2014).

La fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol), es un proceso de dos etapas: acidogénica y solventogénica (Qureshi *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2012). La producción de acetona, butanol y etanol, guarda una proporción de 3:6:1 respectivamente, donde el butanol es el producto principal (Anitescu & Bruno, 2012). En la etapa acidogénica, *C. acetobutylicum* presenta una relación  $H_2/CO_2$  de 1.25, la producción de hidrógeno disminuye durante la etapa solventogénica y esta relación se modifica (Jones & Woods, 1986).

La conversión teórica de glucosa a hidrógeno por parte de estas bacterias es 4 mol  $H_2$ /mol glucosa (Rezania *et al.*, 2017). En la tabla 2-4 se muestran los rendimientos para la producción de hidrógeno por parte de algunas especies del género *Clostridium*. Las especies



fermentativas como *C. acetobutylicum* y *C. acetobutylicum* presentan mayor producción de hidrógeno respecto de las especies hidrolíticas como *C. cellulovorans*.

**Tabla 2- 4** Producción de hidrógeno por especies Clostridium.

Microorganismo	Sustrato	Rendimiento de hidrógeno (mol H <sub>2</sub> /mol sustrato)	Referencia
<i>Clostridium acetobutylicum</i> RZ F-1108	Glucosa	1.97	Zhao et al., 2011
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glucosa	1.73 - 1.69	Mohanraj et al., 2016
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	Glucosa	2.93	Hassan and Morsy, 2015
<i>Clostridium cellulovorans</i> 743B ATCC 35296	Celobiosa	1.5	Sleat et al., 1984

## 2.5 NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

### 2.5.1 FERMENTACIÓN EN FASE SÓLIDA (FFS)

La fermentación en fase sólida (FFS) asemeja las condiciones naturales en las que los microorganismos crecen y degradan sustratos sólidos como la biomasa lignocelulósica. Este proceso se lleva a cabo con un contenido de sólidos superior al 20% (Patinvoh *et al.*, 2016). La humedad presente debe ser la suficiente para asegurar que el inóculo crezca.

Los aspectos básicos de la fermentación sólida son el tipo de sustrato, tipo de microorganismo y las opciones de purificación del producto obtenido. Con base en estas consideraciones se pueden establecer parámetros de operación como temperatura, pH, tamaño de partícula, humedad y presión parcial de vapor. Teóricamente se relaciona la presión parcial de vapor con la eficiencia del microorganismo en una FFS. Las levaduras y los hongos tienen una presión parcial de vapor entre 0.5–6  $a_w$ , que es menor a la de las bacterias (0.8–9  $a_w$ ). El tipo de inóculo depende del sustrato utilizado y de los productos que se desean obtener (Thomas *et al.*, 2013).

La FFS ha tenido crecientes aplicaciones en los últimos años para la producción de enzimas celulolíticas y su aplicación en el proceso de producción de biocombustibles. En 2010 la

producción de enzimas técnicas a nivel mundial se valuó en un billón de dólares (Thomas *et al.*, 2013).

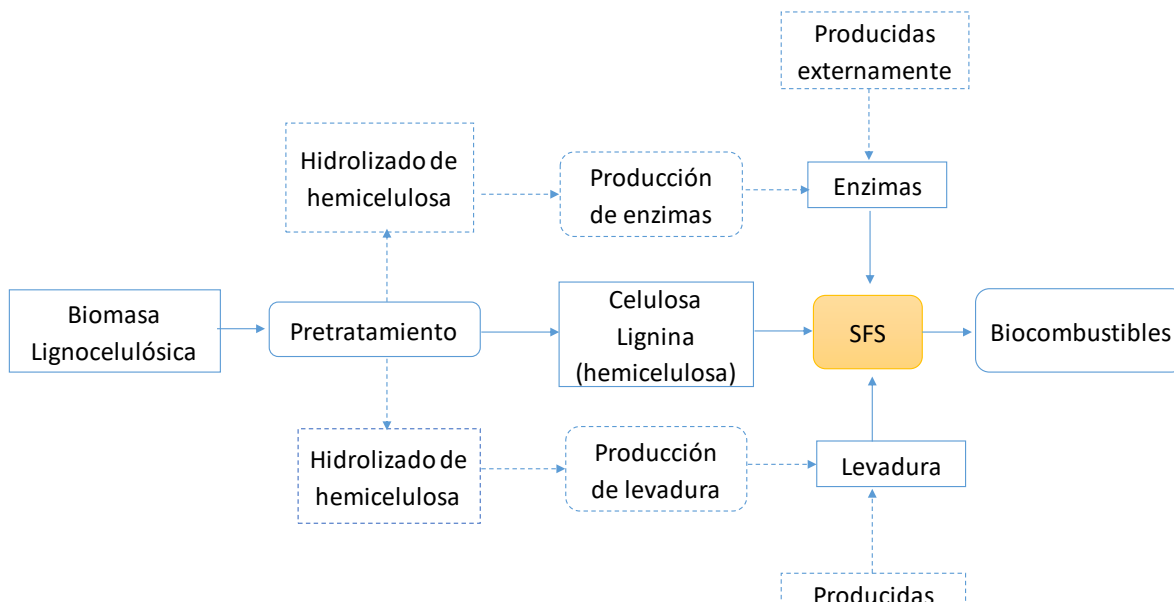
Para producir enzimas celulolíticas se utilizan principalmente algunas especies de hongos como *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*. Sin embargo, el costo que añaden las enzimas comerciales al proceso es una desventaja económica, por esta razón se busca acoplar microorganismos productores de enzimas en procesos de hidrólisis de biomasa lignocelulósica.

### **2.5.2 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SFS)**

La sacarificación y fermentación simultánea (SFS) llevan a cabo ambas operaciones en la misma unidad de operación o reactor. La SFS incrementa el rendimiento de glucosa. Esto debido a que la hidrólisis es inhibida a ciertas concentraciones de glucosa y celobiosa. Cuando ambos procesos (hidrólisis y fermentación) son simultáneos, los microorganismos fermentativos consumen glucosa y evitan la inhibición de las enzimas (Gauss *et al.*, 1976).

Con esta estrategia de configuración se reduce el tamaño de la planta y los costos de inversión hasta en un 20% (Olofsson *et al.*, 2008). Sin embargo, existen desventajas principalmente por la diferencia de las temperaturas óptimas para ambos procesos. La temperatura óptima para la hidrólisis (45–60°C) es mayor que la temperatura de fermentación para la mayoría de los microorganismos. También se debe considerar la dificultad de reutilizar las células en ciclos posteriores, y que el inóculo debe ser renovado.

En la Figura 2-5 se muestra la configuración del proceso de SFS, la producción de enzimas puede acoplarse al proceso aprovechando los residuos de otras etapas, sin embargo, en la mayoría de los casos es más común adquirir enzimas comerciales.



**Figura 2- 5** Configuración de un proceso de sacarificación y fermentación en fase sólida para producción de biocombustibles (Olofsson *et al.*, 2008).

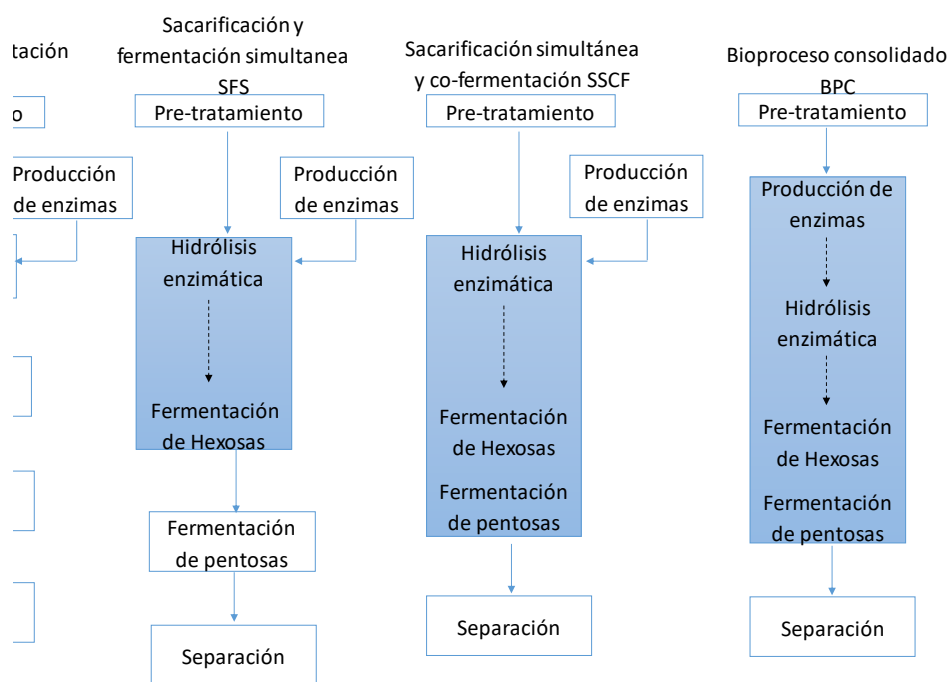
Una variante de la SFS es la sacarificación simultánea y co-fermentación (SSCF), en esta configuración se pretende la degradación simultánea de hexosas y pentosas. Se utilizan diferentes tipos de microorganismos que metabolizan ambos monómeros. Con esta estrategia de operación se pretende aprovechar por completo el sustrato (Parisutham *et al.*, 2014).

### 2.5.3 BIOPROCESO CONSOLIDADO

El concepto bioproceso consolidado (BPC) abarca la producción de enzimas, la hidrólisis de celulosa y fermentación de azúcares en una misma unidad de operación (Kumagai *et al.*, 2014). El ahorro en inversiones de capital y costos de operación mejora la competitividad en el mercado de los biocombustibles frente a los combustibles convencionales (Roberto & Gonçalves, 2017). De acuerdo con Qureshi *et al.* (2013) las enzimas utilizadas en el proceso de producción de biocombustibles para hidrolizar la celulosa representan el 23% del costo operacional.

Análisis económicos comparativos entre la SFS y el BPC muestran que en la SFS los costos aumentan si se requieren reducir los tiempos de proceso, debido a la cantidad de enzimas requeridas. A pesar de que el costo del reactor disminuye al disminuir el tiempo, el costo de

producción de enzimas sobrepasa el ahorro en el reactor. Como se muestra en la Figura 2-6 el BPC integra en una sola etapa, cuatro segmentos del proceso convencional.



**Figura 2- 6** Configuraciones de bioprocesos para la conversión de biomasa lignocelulósica en biocombustibles. (Parisutham *et al.* 2014).

Para eliminar la dependencia de las enzimas, el bioproceso consolidado hace uso de microorganismos que presentan actividad hidrolítica y se complementan con otros que fermentan los productos de hidrólisis (azúcares). Los cultivos mixtos (CM) están formados por aquellos microorganismos que se encuentran naturalmente en los sustratos lignocelulósicos y promueven la degradación natural. Los cultivos mixtos también pueden ser combinados de manera sintética, es decir, tomar dos especies de las que se conozcan sus características metabólicas y estudiar su comportamiento en conjunto en un sustrato lignocelulósico (Minty *et al.*, 2013).

## 2.6 USO DE CULTIVOS MIXTOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Los cultivos mixtos son comunidades de microorganismos de diferentes especies que forman relaciones ecológicas unos con otros, beneficiándose de los productos y rutas metabólicas de las especies con las que conviven. Estas asociaciones están presentes en diversos ambientes naturales. El uso de estos cultivos tiene por objetivo realizar diferentes tareas dentro de un sistema de manera que las funciones de unos elementos complementen las de otros. El perfil

de los microorganismos utilizados debe contar con características hidrolíticas y/o con capacidades fermentativas (Kalyani *et al.*, 2013)

Los CM pueden estar formados por microorganismos tomados de cepas puras y combinarse para un fin, o aislarse de un sistema natural donde la comunidad microbiana se encuentre realizando varias tareas de degradación (Wen *et al.*, 2014).

La producción de hidrógeno por CM ha sido ampliamente estudiada y aplicada a diferentes sustratos, entre ellos biomasa lignocelulósica. Los CM estudiados se han formado a partir de cepas puras con metabolismos definidos que pueden ser hidrolíticos o fermentativos (Ponthein *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2014). En la naturaleza también se encuentran CM que de manera natural degradan sustratos complejos; los fluidos ruminales, estiércol y muestras de suelo son algunos ejemplos. Los CM encontrados en estas muestras cuentan con microorganismos que en conjunto pueden producir hidrógeno a partir de sustratos complejos (Kalyani *et al.*, 2013; Pérez-Rangel *et al.*, 2015; Saripana *et al.*, 2015).

Los microorganismos que intervienen en esta producción típicamente son el género *Clostridium* gracias a la resistencia que presentan a los tratamientos térmicos. Este género cuenta tanto con especies hidrolíticas como productoras de hidrógeno. Otros microorganismos importantes en estos CM son los *Enterobacter* debido a que mantienen las condiciones anaerobias necesarias para que los otros proliferen (Navarro-Díaz *et al.*, 2016)

La bioaugmentación es una técnica para formar un CM. Esto ocurre cuando se adicionan nuevas especies a un sistema donde previamente se ha establecido una CM (Nzila, 2017). Esta adición habrá de provocar el establecimiento de nuevas relaciones simbióticas entre la CM previa y los microorganismos nuevos (Minty *et al.*, 2013).

El uso de técnicas para incrementar la producción de hidrógeno dentro del proceso de una biorefinería 2G incrementa la eficiencia energética y reduce los costos de producción. De esta forma el proceso productivo de una biorrefinería se vuelve más rentable (Olofsson *et al.*, 2008; Roberto & Gonçalves, 2017).

### **3. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 HIPÓTESIS**

La eficiencia de la fermentación de residuos agrícolas para producir hidrógeno utilizando consorcios microbianos aumenta cuando la proporción de microorganismos hidrolíticos es mayor respecto a la proporción de microorganismos fermentativos.

#### **3.2 OBJETIVO**

Evaluar el efecto de la bioaumentación con especies de *Clostridium* sobre la producción de hidrógeno a partir de residuos agrícolas.

#### **3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

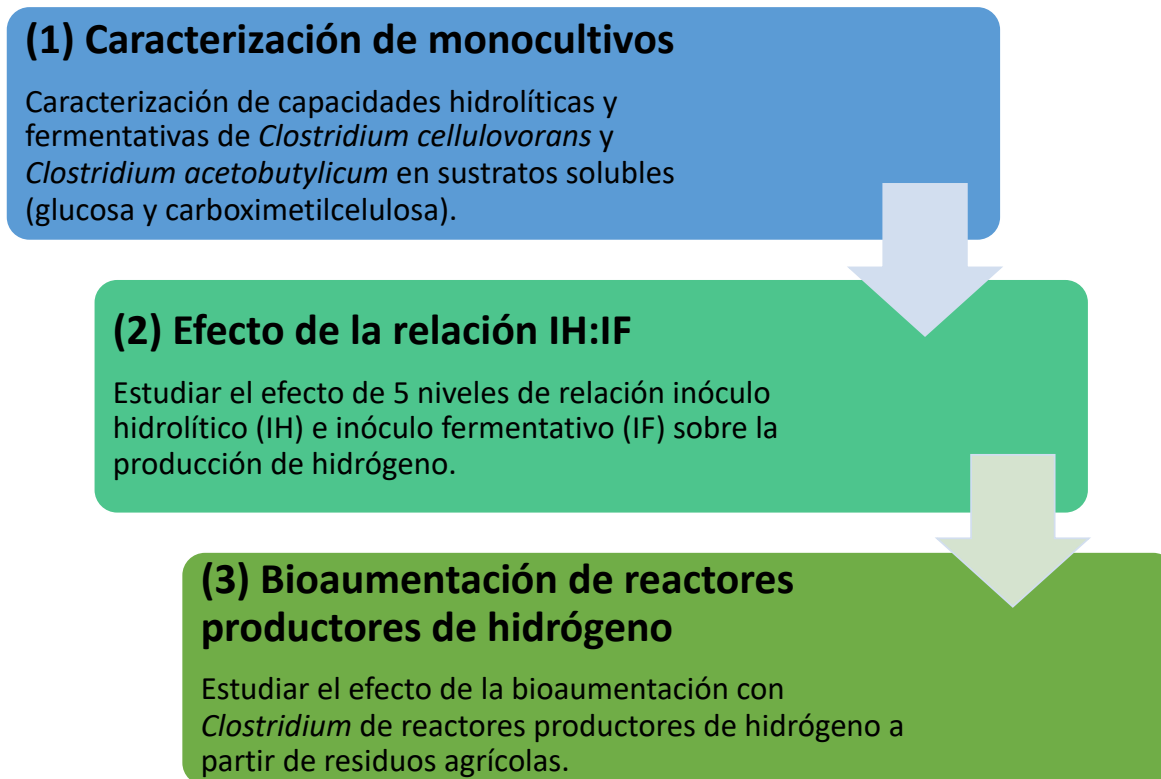
- I. Caracterizar las capacidades hidrolíticas y fermentativas de las especies *Clostridium cellulovorans* y *Clostridium acetobutylicum* en glucosa y carboximetilcelulosa.
- II. Determinar la relación del inóculo hidrolítico / inóculo fermentativo que incremente la producción de hidrógeno a partir de residuos agrícolas en ensayos en lote.
- III. Bioaumentar con especies de *Clostridium* reactores productores de hidrógeno alimentados con residuos agrícolas en condiciones sin esterilidad.

#### **3.4 ALCANCES**

- El presente trabajo se enfocó en evaluar la producción de hidrógeno a partir de residuos agrícolas como modelo de biomasa lignocelulósica en ensayos en lote a nivel laboratorio.
- El sustrato estudiado consistió de residuos agrícolas: paja de trigo, rastrojos de maíz, y bagazos de caña y agave.
- La bioaumentación se llevó a cabo en biorreactores productores de hidrógeno donde la comunidad nativa del sustrato estuvo presente.
- Se estudió el efecto de la bioaumentación con dos cepas distintas de *Clostridium* obtenidas de colecciones microbianas.

## 4. METODOLOGÍA

Este trabajo experimental se dividió en tres fases: 1) caracterización de monocultivos de *Clostridium cellulovorans* y *Clostridium acetobutylicum* en sustratos solubles; 2) efecto de la relación entre las proporciones de inóculo hidrolítico e inóculo fermentativo (IH:IF) sobre la producción de hidrógeno; y 3) efecto de la bioaumentación sobre la producción de hidrógeno a partir de residuos agrícolas (ver Figura 4-1).



**Figura 4- 1** Fases del proyecto de investigación

### 4.1 CEPAS DE TRABAJO

Las cepas de trabajo consistieron en dos especies de *Clostridium*. *Clostridium cellulovorans* ATCC<sup>®</sup> 35296<sup>™</sup> la cual se adquirió de la Colección Americana de Microorganismos ATCC y fue seleccionada por su capacidad de hidrólisis de celulosa (Giallo *et al.*, 1983; Sleat *et al.*, 1984). *Clostridium acetobutylicum* CDBB-B-1496 se adquirió de la Colección de Microorganismos del CINVESTAV y fue seleccionada por su capacidad fermentativa (Bellido *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2014).

Ambas cepas se recibieron como células liofilizadas, las cuales fueron reactivadas en un medio PYG modificado (Peptone-Yeast-Glucose, *por sus siglas en inglés*). La composición del medio de cultivo PYG (en g/L) fue: peptona 5, extracto de levadura 10, triptona 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.4,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.1, NaCl 2,  $\text{CaCl}_2$  0.5, KCl 0.1,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0011, L-cisteína 1.0 y rezarsurina 0.01. Se utilizó dextrosa anhidra (Golden Bell, 27745) a 10 g/L como única fuente de carbono. El procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones anaerobias dentro de una cabina LABCONCO 5220100 (Kansas, USA). Para los diferentes ensayos, las cepas se crecieron en caldos de cultivo mínimo a 37 °C hasta lograr una densidad óptica entre 1.8 a 2.0. Las condiciones se detallan en cada ensayo (Valdez-Vazquez *et al.*, 2015).

## **4.2 CARACTERIZACIÓN DE MONOCULTIVOS EN SUSTRATOS SOLUBLES**

### **4.2.1 INÓCULO**

Para este ensayo, los inóculos de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum* se prepararon por separado en botellas serológicas de 150 mL con un volumen efectivo de 120 mL de caldo PYG esterilizado por calor húmedo a 121 °C y 15 lb/in<sup>2</sup> por 15 min con dextrosa anhidra (Golden Bell, 27745) a 10 g/L como fuente de carbono. Antes de esterilizar, se cambió el espacio de cabeza de las botellas con una atmósfera de N<sub>2</sub> para asegurar condiciones anaerobias. Las botellas se inocularon y se incubaron a 37 °C ± 1 por 48 horas sin agitación hasta alcanzar una densidad óptica (D.O. 600 nm) en el rango de 0.8 a 1.0.

### **4.2.2 PROCEDIMIENTO**

Se realizaron cinéticas de crecimiento por separado para *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum* en dos sustratos solubles: glucosa y carboximetilcelulosa. Los ensayos se realizaron en botellas serológicas de 150 mL con un volumen de trabajo de 130 mL. En el caldo de cultivo se sustituyeron todas las fuentes de nitrógeno por 0.5 g/L de urea. La concentración de la fuente de carbono fue de 5 g/L para cada sustrato. Para el ensayo, se utilizó dextrosa anhidra (Golden Bell, 27745) y carboximetilcelulosa sódica (SIGMA-ALDRICH, 419273). Previo a la esterilización, se cambió el espacio de cabeza de las botellas con una atmósfera de N<sub>2</sub> para asegurar condiciones anaerobias.



Los ensayos se realizaron por triplicado, además se incluyeron controles endógenos utilizando caldo de cultivo PYG sin la fuente de carbono. Se tomó muestra cada 24 h para analizar consumo de sustrato, pH, biogás acumulado y densidad óptica.

### **4.3 EFECTO DE LA RELACIÓN INÓCULO HIDROLÍTICO (IH): INÓCULO FERMENTATIVO (IF) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

#### **4.3.1 INÓCULO**

Se utilizó *C. cellulovorans* como especie hidrolítica y *C. acetobutylicum* como especie fermentativa. Los inóculos se prepararon por separado siguiendo la metodología descrita en 4.2.1. Ambas especies fueron cultivadas hasta alcanzar una D.O.<sub>600 nm</sub> cercana a 2.0.

#### **4.3.2 SUSTRATO**

Para este ensayo se utilizó como sustrato paja de trigo pretratada biológicamente por una comunidad nativa (Pérez-Rangel *et al.*, 2015; Valdez-Vazquez *et al.*, 2015). La composición del sustrato fue determinada de acuerdo con el protocolo de Van Soest (1963). El contenido de sólidos totales fue de 0.20 g-ST/g, sólidos volátiles 0.87 g/g-ST, celulosa 0.47 g/g-ST, hemicelulosa 0.31 g/g-ST y lignina 0.05 g/g-ST.

#### **4.3.3 PROCEDIMIENTO**

El ensayo se realizó en botellas serológicas de 150 mL con un volumen de trabajo de 130 mL. Las botellas se cargaron con 32.5 g de sólidos totales del sustrato (que corresponde al 5 % p/v de sólidos totales) y 104 mL de medio. La composición del medio fue (en g/L): urea 0.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1, NaCl 2, CaCl<sub>2</sub> 0.5, KCl 0.1, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0011, L-cisteína 1.0 y rezarsurina 0.01. El pH inicial se ajustó a 5.5 y se realizó un intercambio de atmósfera con nitrógeno durante 1 min. Después, las botellas se esterilizaron por calor húmedo a 121 °C y 15 lb/in<sup>2</sup> por 15 min.

Las botellas se inocularon con un volumen total de 16 mL de los inóculos previamente preparados a una densidad óptica similar (que corresponden al 12% (v/v) del volumen de trabajo). Se tuvieron cinco tratamientos que corresponden a cinco cocultivos con diferentes proporciones de inóculo hidrolítico y de inóculo fermentativo (ver Tabla 4-1). Los controles fueron un tratamiento con el monocultivo del inóculo fermentativo (*C. acetobutylicum*), y

otro tratamiento con el monocultivo del inóculo hidrolítico (*C. cellulovorans*). Cada condición se realizó por triplicado. Las botellas se incubaron a  $37\text{ °C} \pm 1$  por 16 días sin agitación. Durante el ensayo se tomaron muestras para analizar pH, biogás acumulado, ácidos grasos volátiles (AGV's) y solventes producidos.

**Tabla 4- 1** Diseño experimental, proporciones inóculo hidrolítico-inóculo fermentativo (IH:IF)

Experimento	Proporción IH:IF
1.-	5:1
2.-	5:3
3.-	1:1
4.-	1:5
5.-	3:5
6.-	<i>C. acetobutylicum</i>
7.-	<i>C. cellulovorans</i>

#### 4.4 BIOAUMENTACIÓN DE REACTORES PRODUCTORES DE HIDRÓGENO

Esta parte experimental se llevó a cabo en dos etapas: 1) etapa de fermentación natural, utilizando los microorganismos nativos de los sustratos lignocelulósicos. Al finalizar la primera etapa se continuó con la 2) etapa de bioaumentación.

##### 4.4.1 ETAPA DE FERMENTACIÓN NATURAL

Para la etapa de fermentación natural, los reactores consistieron en botellas serológicas de 250 mL con 125 mL de volumen de trabajo. Se cargaron con 8.1 g de paja de trigo como sustrato y 29.7 g de un digestato de reactor anaerobio alimentado con paja de trigo (16% de sólidos totales con 0.99 g-SV/g-ST). La relación sustrato/inóculo ( $S_0/X_0$ ) fue de 1.5.

El contenido de sólidos totales en las botellas se ajustó a 10% (p/v) con un medio de cultivo mínimo de composición (g/L): urea 0.28 y buffer de fosfatos 0.08 (Pérez-Rangel *et al.*, 2018). El pH inicial fue ajustado a 6.5. Los reactores se incubaron a  $37\text{ °C} \pm 1$  por 4 días sin

agitación, tomando muestras cada día para analizar volumen y composición de biogás, pH, producción de solventes y AGV's.

#### 4.4.2 ETAPA DE BIOAUMENTACIÓN

Los reactores se operaron durante un ciclo de 4 días para la producción de hidrógeno derivada de la actividad de los microorganismos nativos. Después de este ciclo se procedió a realizar un cambio de sustrato (alimentación de los reactores). Se extrajo el contenido del reactor (sólido y líquido). De la parte líquida se cargaron al reactor 50 mL y de la parte sólida (17% ST) se añadieron 30 g. Se pesaron 8 g de paja de trigo sin tratamiento que fue hidratada por 4 horas con 60 mL de agua destilada. La paja de trigo sin tratamiento hidratada fue añadida al reactor con 15 mL de una solución de urea (0.28 g/L). Un día después de la alimentación, se realizó la bioaumentación de los reactores adicionando 35 mL de diferentes cocultivos de especies de *Clostridium*. El diseño experimental y las proporciones de cada cocultivo se muestran en la Tabla 4-2. Los tratamientos control consistieron de: tratamiento con la bioaumentación con el monocultivo de *C. cellulovorans*, tratamiento con la bioaumentación con el monocultivo de *C. acetobutylicum*, y sin bioaumentación (adición de 35 mL del medio mineral estéril).

**Tabla 4- 2** Diseño experimental para la bioaumentación de reactores productores de hidrógeno, inóculo hidrolítico- inóculo fermentativo (IH:IF).

Experimento	Proporción IH:IF
1	4: 1
2	1: 1
3	1 : 4
4	<i>C. acetobutylicum</i>
5	<i>C. cellulovorans</i>
6	Microorganismos nativos

Los reactores se incubaron a las mismas condiciones del ciclo anterior ( $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 4 días sin agitación), tomando muestras diarias para analizar volumen de biogás, composición de biogás, pH y producción de solventes y AGV's.

#### 4.4.3 ENSAYO CONFIRMATIVO

Se realizó un ensayo de bioaumentación confirmativo utilizando cuatro residuos agrícolas como sustrato: paja de trigo, rastrojos de maíz, bagazo de caña y bagazo de agave. La composición de los sustratos sin pretratamiento se muestra en la Tabla 4-3.

**Tabla 4- 3** Composición de sustratos lignocelulósicos sin pretratamiento y después de pretratamiento biológico.

Sustrato		Sólidos Totales (g-ST/g)	Sólidos Volátiles (g-SV/g-ST)	Contenido lignocelulósico (g/g-ST)		
				celulosa	hemicelulosa	lignina
<b>Paja de trigo</b>	Sin tratamiento	0.92	0.99	0.41	0.22	0.07
	Digestato	0.11	0.99	0.50	0.20	0.10
<b>Rastrojo de maíz</b>	Sin tratamiento	0.93	0.93	0.41	0.30	0.08
	Digestato	0.13	0.99	0.50	0.30	0.10
<b>Bagazo de agave</b>	Sin tratamiento	0.94	0.97	0.40	0.26	0.07
	Digestato	0.09	0.95	0.40	0.30	0.10
<b>Bagazo de caña</b>	Sin tratamiento	0.92	0.95	0.40	0.29	0.08
	Digestato	0.09	0.96	0.50	0.20	0.10

Se realizó el mismo procedimiento descrito en 4.4.1 y 4.4.2, una etapa de fermentación natural seguida de la etapa de bioaumentación. Como diferencias se tuvieron: 1) la bioaumentación se realizó sólo con el tratamiento (cocultivo) que mejor resultado produjo en términos de producción de hidrógeno, y 2) el pH inicial después de la fermentación se ajustó a 6.5. Los reactores se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  sin agitación, tomando muestras correspondientes para analizar volumen de biogás, composición de biogás, pH y producción de solventes y AGV's.

## 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.5.1 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES ESTRUCTURALES

Se determinó el contenido de celulosa y hemicelulosa en los sustratos antes y después de los ensayos. El análisis se realizó según la metodología de Van Soest et al. (1963). Se pesaron 0.5 g de muestra en bolsas filtro y posteriormente se trataron con solución detergente neutra ANKOM Technology (120 g/L), sulfito de sodio (10 g/L) y alfa-amilasa ANKOM Technology (10 mL) a pH 7 y 100 °C durante 1 hora en el equipo ANKOM (New York, EE.UU.). Una vez terminado el ciclo de tratamiento de fibras detergentes neutras, las bolsas filtro fueron secadas a 105 °C en estufa para después enfriarse en desecador durante 20 minutos. El peso constante de cada bolsa al final de este proceso fue registrado.

Los sólidos obtenidos se someten a tratamiento con solución ácida detergente compuesta de ácido sulfúrico (0.5 M) y cetil-trimetil amonio (20 g/L) a 100 °C durante 1 hora en el equipo ANKOM (New York, EE.UU.). Las muestras se secaron nuevamente siguiendo el procedimiento del ciclo anterior. Los pesos constantes del ciclo de fibras detergentes ácidas también fueron registrados.

Las bolsas fueron sometidas a un proceso de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico 72% a temperatura ambiente por 3 horas. Al final de las tres horas las muestras se enjuagaron con agua destilada hasta obtener un pH neutro en el efluente. Finalmente, las muestras secadas y pesadas fueron calcinadas en crisoles a peso constante durante 1.5 horas a 580 °C. Se registró el peso de las cenizas después de enfriarse. El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina

La fórmula utilizada para determinar el porcentaje de fibra en cada etapa de análisis fue:

#### Ec. 4.1

$$\% \text{ Analito} = \frac{100 \times [W_3 - (W_1 \times C_1)]}{W_2}$$

Donde:  $W_1$  – Peso de la bolsa,  $W_2$  – Peso de la muestra,  $W_3$  peso de la muestra seca después del proceso de extracción y  $C_1$  Corrección del peso de la muestra, promedio del peso de las bolsas blanco después del proceso de extracción.

#### **4.5.2 CRECIMIENTO MICROBIANO**

Para los ensayos de cinéticas de crecimiento de los monocultivos en sustratos solubles se tomaron muestras de 2 mL a los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9. Se determinó la densidad óptica de cada muestra en un espectrofotómetro HACH DR 2900 a una longitud de onda de 600  $\mu\text{m}$ . El blanco de referencia utilizado fue el medio usado en los ensayos, sin inocular.

#### **4.5.3 pH**

Las muestras fueron centrifugadas a 1.1g durante 10 minutos en una centrífuga Spectrafuge 24D para eliminar la biomasa suspendida. Del sobrenadante se tomaron lecturas de pH con un potenciómetro Orion 720A+, previamente calibrado.

#### **4.5.4 CONTENIDO DE AZÚCARES (GLUCOSA Y XILOSA)**

El sobrenadante obtenido después de centrifugar la muestra tomada para medir pH (apartado 4.5.3) se analizó en un detector enzimático YSI 2900D (Ohio, EE.UU.) que cuenta con un rango de detección de glucosa de 0.05 – 25 g/L y para xilosa de 0.5 – 30 g/L. Antes de introducir la muestra al equipo se filtró con una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### **4.5.5 ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SOLVENTES**

El método de análisis para ácidos grasos volátiles y solventes se llevó a cabo mediante cromatografía de gases, con un cromatógrafo de gases modelo Varian 3300 el cual está equipado con un detector de ionización de flama y una columna Zebron ZB-FFAP 15 X 0.53 X 1. La temperatura del inyector y del detector es 190 °C y 210 °C, respectivamente. La columna comenzó a operar a una temperatura de 60 °C y aumentó en dos etapas, primero 15 °C/min hasta alcanzar 90 °C y después a razón de 25 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 170 °C donde se mantuvo durante 4.5 min. El gas utilizado como fase móvil fue nitrógeno con un flujo de 9.5 mL/min.

La cantidad de muestra inyectada al equipo fue de 2  $\mu\text{L}$ . La muestra fue tomada de los digestatos de los reactores, la cual fue centrifugada a 1.1 g por 10 minutos. El sobrenadante recuperado se diluyó 1:5 con agua destilada y previo a inyectarse se pasó a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.6 VOLUMEN Y COMPOSICIÓN DE BIOGÁS

El volumen de biogás se cuantificó mediante el desplazamiento de una columna de líquido saturado con NaCl a pH < 2.5 en probeta invertida. La composición de biogás se midió en un cromatógrafo de gases 8610C (SRI Instruments, Torrance, CA, USA) equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). El método utilizó una columna Elite-GC GS Molesieve empacada con sílica gel (1.83 m X 0.32 y columna de tamiz molecular 13 X de 1.82 m X 3.175 mm) y nitrógeno (20 mL/min) como fase móvil. Las temperaturas de operación del inyector, detector y columna fueron 71 °C, 155 °C y 40 °C, respectivamente. El equipo fue calibrado con gas estándar con una composición de hidrógeno (50%), dióxido de carbono (30%) y metano (20%), con un CV del 1% (Cardeña *et al.*, 2017).

#### 4.5.7 SÓLIDOS TOTALES, SÓLIDOS VOLÁTILES Y CENIZAS

Para determinar sólidos totales, volátiles y cenizas se siguió la metodología de Sluiter *et al.*, (2008) del NREL (National Renewable Energy Laboratory, *por sus siglas en inglés*). Se tomó 1 g de muestra y se pesó en crisoles puestos previamente a peso constante (variación < 0.1 mg). Las muestras se colocaron en la estufa a 105 °C ± 3 durante cuatro horas, después de enfriaron en un desecador y se registró el peso. Para determinar sólidos volátiles y cenizas, las muestras se calcinaron en una mufla a 580 °C durante dos horas, trascurrido el tiempo se pasaron a la estufa durante 30 min. Finalmente se enfriaron en un desecador por 20 min. Se registraron los pesos de la muestra después del tratamiento en estufa y mufla.

### 4.6 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

#### 4.6.1 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Para el cálculo de la velocidad de crecimiento se utilizó la ecuación 4.2 de acuerdo a la densidad óptica (D.O.) medida (Minty *et al.*, 2013).

$$\text{Ec. 4.2} \quad \ln C = \ln C_0 + \mu t$$

$\ln C$  – Logaritmo natural de la D.O,  $\ln C_0$  – Logaritmo natural de la D.O. inicial,  $\mu$  – Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ) y  $t$  – tiempo ( $h$ ).



#### 4.6.2 PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Se utilizó el ajuste según Gompertz para determinar los parámetros cinéticos de la producción de hidrógeno (Argun *et al.*, 2009; Arreola-Vargas *et al.*, 2014). De acuerdo con la ecuación 4.2 los parámetros calculados son:

$$\text{Ec. 4.3} \quad P(t) = P_{max} * \exp \left[ -\exp \left( \frac{2.71828 * R_{max}(\lambda - t)}{P_{max}} + 1 \right) \right]$$

$P$  – Producción de  $H_2$  ( $mLH_2/L_{reactor}$ ),  $P_{max}$  - Producción máxima de  $H_2$  ( $mLH_2/L_{reactor}$ ),  $R_{max}$  – Velocidad de producción de  $H_2$  ( $mLH_2/h$ ) y  $\lambda$  – Tiempo de la fase de latencia antes de la producción de  $H_2$  ( $h$ ).

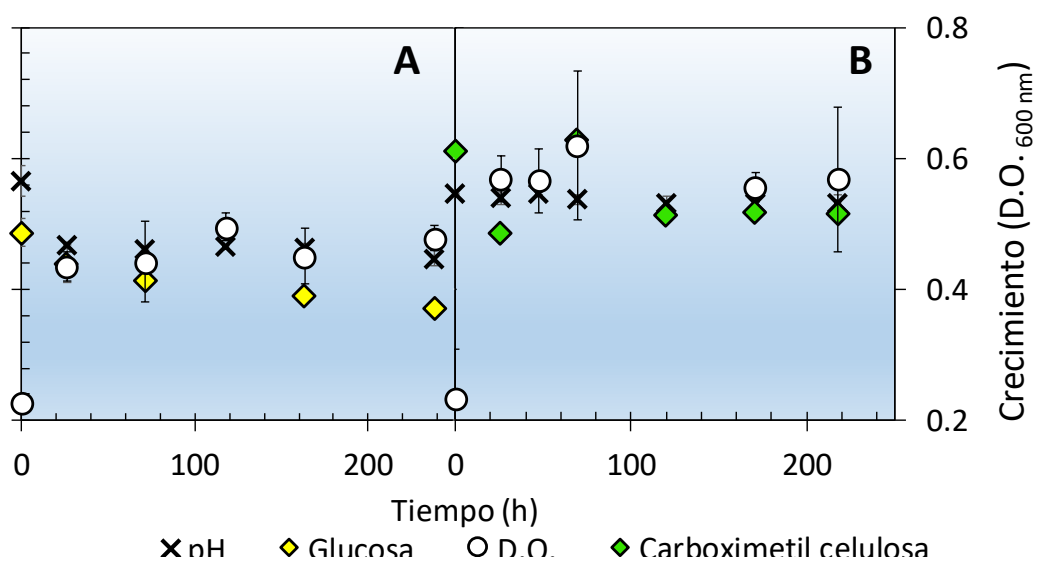
#### 4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en la producción de hidrógeno para todos los ensayos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor tomando un nivel de confianza del 95%. Para determinar diferencias significativas entre cada factor se realizó una prueba Tuckey ( $p > 0.05$ ).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

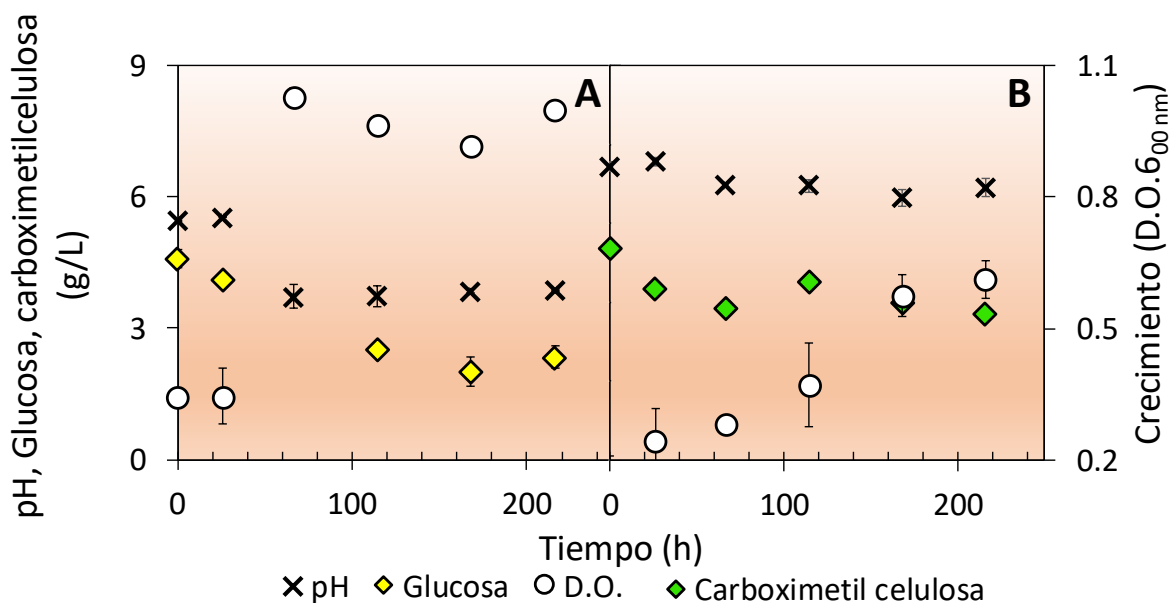
### 5.1 CARACTERIZACIÓN DE MONOCULTIVOS EN SUSTRATOS SOLUBLES

Se realizaron cinéticas de crecimiento de los monocultivos de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum* en glucosa y carboximetilcelulosa para caracterizar su actividad hidrolítica y fermentativa. *C. cellulovorans* presentó mayor crecimiento, medido como densidad óptica (600 nm), en carboximetilcelulosa que en glucosa (Figura 5-1). Las velocidades de crecimiento específico en cada sustrato fueron de  $0.019 \text{ h}^{-1}$  en carboximetilcelulosa y de  $0.009 \text{ h}^{-1}$  en glucosa. Otras cepas de *C. cellulovorans* han presentado comportamientos similares en el crecimiento con diferentes sustratos. Sleat et al. (1984) encontraron que el máximo crecimiento de *C. cellulovorans* en celulosa se presenta antes de las 48 h, mientras que en celobiosa se alcanza después de las 48 h. El crecimiento de *C. cellulovorans* en carboximetilcelulosa generó una caída en el pH teniendo un  $\Delta\text{pH}$  de 0.2 unidades, mientras que en glucosa el  $\Delta\text{pH}$  fue de 1.8 unidades. La disminución del pH es una medida indirecta de la acumulación de ácidos orgánicos, por lo que se infiere que *C. cellulovorans* produjo más ácidos orgánicos en glucosa que en carboximetilcelulosa, lo que coincide con un mayor consumo de sustrato.



**Figura 5- 1** Cinéticas de crecimiento en monocultivo de *C. cellulovorans* en (A) glucosa y (B) carboximetilcelulosa.

Por su parte, *C. acetobutylicum* presentó un mayor crecimiento en glucosa que en carboximetilcelulosa (Figura 5-2). Así, la velocidad de crecimiento específico fue mayor en glucosa con  $0.016 \text{ h}^{-1}$  comparado con carboximetilcelulosa con  $0.006 \text{ h}^{-1}$ . El crecimiento de *C. acetobutylicum* en carboximetilcelulosa no alcanzó la fase estacionaria sino hasta las 200 h de fermentación. Se tienen reportes de actividad hidrolítica de esta cepa en carboximetilcelulosa. No obstante, en sustratos como celulosa amorfa o cristalina no presenta actividad hidrolítica (Nöling *et al.*, 2001). El consumo de glucosa fue del 49% y de carboximetilcelulosa tan sólo del 18%. A lo largo de la fermentación, se observó una disminución del pH generando un  $\Delta\text{pH}$  de 1.6 unidades en glucosa, y de 0.3 unidades en carboximetilcelulosa. El pH como medida indirecta de la producción de ácidos orgánicos, muestra que la glucosa fue el sustrato en el cual la cepa tiene mejor actividad fermentativa.



**Figura 5- 2** Cinéticas de crecimiento en monocultivo de *C. acetobutylicum* en (A) glucosa y (B) carboximetilcelulosa.

Se encontró diferencia significativa entre el crecimiento de *C. acetobutylicum* y *C. cellulovorans* en glucosa ( $p < 0.05$ ), siendo que *C. acetobutylicum* presentó un mejor crecimiento y mayor aprovechamiento de los azúcares respecto a *C. cellulovorans*. No se encontró diferencia significativa en el crecimiento de ambas cepas en carboximetilcelulosa ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, si existe mayor consumo de carboximetilcelulosa por parte de *C. cellulovorans*.

Sólo el crecimiento de *C. cellulovorans* en carboximetilcelulosa presentó la acumulación de 1 g/L de glucosa. Esto se debe a que la actividad enzimática de *C. cellulovorans* le permitió degradar la celulosa a una velocidad mayor que la velocidad a la cual consumió la glucosa liberada. Debido a que el consumo de monosacáridos es lento en esta especie, se observa la acumulación de azúcares durante la cinética en material lignocelulósico (Giallo *et al.*, 1983). Wen *et al.* (2014) observaron la acumulación de 11.7 g/L de azúcares (suma de glucosa, celobiosa, xilosa, xilobiosa y arabinosa) cuando *C. cellulovorans* creció utilizando rastrojo de maíz pretratado como fuente de carbono.

Giallo *et al.* (1983) reportan que las especies hidrolíticas como *C. cellulovorans* presentan una represión en el catabolismo de carbohidratos por la acumulación de los productos de fermentación. Esta represión es mayor cuando se trata de azúcares solubles. Esto explica porque *C. cellulovorans* alcanzó menores densidades ópticas en glucosa. Debido a sus características hidrolíticas, *C. cellulovorans* es capaz de metabolizar sustratos complejos como la celulosa, mientras que *C. acetobutylicum* aprovecha a mayor velocidad los azúcares resultantes. La actividad hidrolítica por parte de *C. acetobutylicum* podría incrementar la degradación de celulosa al crecerlas en cocultivo.

Los productos finales de fermentación obtenidos con los monocultivos se muestran en la Tabla 5-1. Para *C. cellulovorans*, los productos de fermentación que se obtuvieron en mayor concentración fueron el ácido butírico y el ácido acético durante su crecimiento en carboximetilcelulosa. Las especies de *C. cellulovorans* que no han sido manipuladas genéticamente generalmente no presentan altas concentraciones de producción de solventes (Yang *et al.*, 2015). Los principales productos de fermentación reportados fueron el ácido butírico con alrededor de 3 g/L y ácido acético con concentraciones cercanas a 1 g/L (Yang *et al.*, 2015).

**Tabla 5- 1** Productos de fermentación obtenidos en los monocultivos de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum*.

Especie	Sustrato	Ácido acético (g/L)	Ácido butírico (g/L)	Butanol (g/L)	Etanol (g/L)
<i>C. cellulovorans</i>	Glucosa	0.5	0.7	0.1	0.2
	Carboximetilcelulosa	0.7	0.9	0.1	0.0
<i>C. acetobutylicum</i>	Glucosa	0.7	0.9	0.1	1.1
	Carboximetilcelulosa	0.6	0.8	0.1	0.1

*C. acetobutylicum* presentó una acumulación de 1.1 g/L de etanol además de butanol. En la cinética se tiene la ruta metabólica de fermentación acetona-butanol-etanol (ABE); la etapa solventogénica de la fermentación ABE se caracteriza por la disminución de la producción de hidrógeno. En la etapa acidogénica se presenta la mayor producción de hidrógeno con una proporción de 60% H<sub>2</sub> - 40% CO<sub>2</sub> (Janssen *et al.*, 2014).

Las concentraciones de ácidos orgánicos y solventes que alcanzó *C. acetobutylicum* en este ensayo son menores a las reportadas en literatura (Tabla 5-2). Esto se debió a que la concentración de sustrato utilizada en este ensayo fue menor respecto de las que típicamente se recomiendan para la producción de solventes, entre 15 y 20 g/L (Maiti *et al.*, 2016)

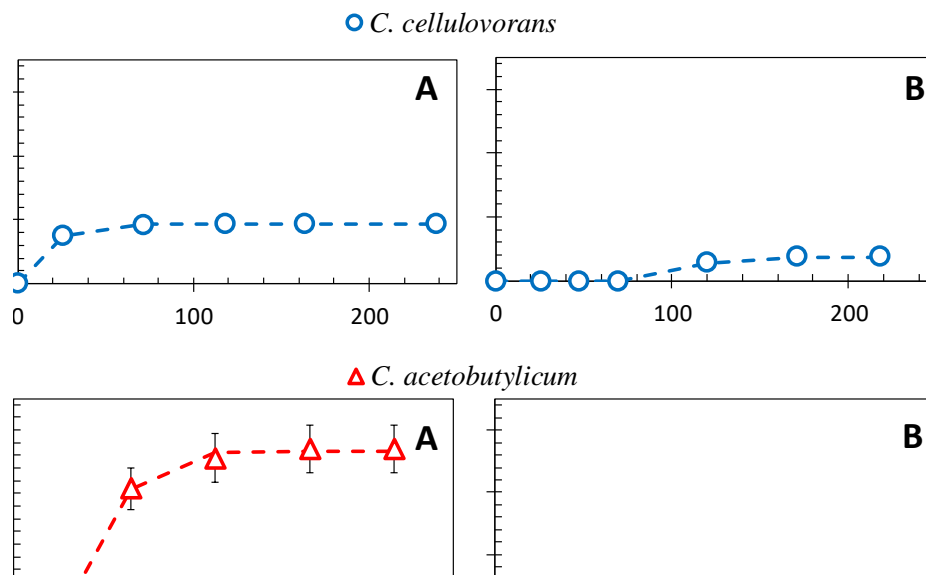
En suma, si comparamos entre ambas especies, *C. acetobutylicum* tuvo un mayor crecimiento específico en glucosa que *C. cellulovorans*. Mientras que ésta última presentó un mayor crecimiento específico en carboximetilcelulosa que *C. acetobutylicum* evidenciando una mayor actividad hidrolítica del polisacárido.

**Tabla 5- 2** Comparación de productos de fermentación por *C. acetobutylicum* en glucosa.

<b>Especie</b>	<b>Acetato (g/L)</b>	<b>Butirato (g/L)</b>	<b>Acetona (g/L)</b>	<b>Butanol (g/L)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>Referencia</b>
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>adc</i>	3.6	2.8	0.5	5.5	0.8	Lehmann et al., 2012
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 <i>buk</i>	8.4	3.3	1.9	10.5	0.7	Green and et al., 1996
<i>C. acetobutylicum</i> WUR <i>ack</i>	2.0	1.1	5.7	11.6	1.6	Kuit et al., 2012
<i>C. acetobutylicum</i>	0.7	0.9	0.0	0.1	1.1	Este trabajo

Al tratarse de especies de *Clostridium*, ambas especies presentaron producción de hidrógeno durante su crecimiento en glucosa y carboximetilcelulosa (Figura 5-3). Por tipo de sustrato, la mayor producción de hidrógeno se registró en glucosa ( $p < 0.05$ ). Mientras que, por especie, *C. acetobutylicum* tuvo la mayor producción de hidrógeno con 533 NmL/L ( $p < 0.05$ ).

La diferencia en la producción de hidrógeno fue mayor en glucosa, mientras que en carboximetilcelulosa ambas especies presentaron una producción de hidrógeno similar. Esto se debe a las diferencias en sus metabolismos, donde *C. acetobutylicum* crece más rápido y aprovecha mejor los azúcares simples. Mientras que *C. cellulovorans* posee características hidrolíticas que le permiten metabolizar mejor sustratos complejos como carboximetilcelulosa, pero tiene capacidades fermentativas inferiores (Wen *et al.*, 2014).



**Figura 5- 3** Producción de hidrógeno en los monocultivos de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum* en (A) glucosa y (B) carboximetilcelulosa.

Los parámetros cinéticos calculados con el ajuste de Gompertz se muestran en la Tabla 5-3. Las mayores velocidades de producción de hidrógeno para ambas especies corresponden a las cinéticas en glucosa, siendo mayor la velocidad de producción para *C. acetobutylicum* que para *C. cellulovorans* en glucosa. *C. cellulovorans* no cuenta con características fermentativas importantes, a pesar del crecimiento que presenta en carboximetilcelulosa. (Wen *et al.*, 2014).

**Tabla 5- 3** Parámetros cinéticos de producción de hidrógeno para *C. acetobutylicum* y *C. cellulovorans* en sustratos solubles

Parámetro	<i>C. acetobutylicum</i>		<i>C. cellulovorans</i>	
	Glucosa	Carboximetilcelulosa	Glucosa	Carboximetilcelulosa
$P_{\max}$ (NmL H <sub>2</sub> /L)	533	87	187	73
$R_{\max}$ (mLH <sub>2</sub> /h)	14	2	9	2
$\lambda$ (h)	33	31	7	94

Los rendimientos de producción de hidrógeno por mol de azúcar adicionado se presentan en la Tabla 5-4. El rendimiento de hidrógeno encontrado para *C. acetobutylicum* está dentro del rango reportado en literatura. Para *C. cellulovorans*, se encontraron pocos estudios sobre su capacidad de producir hidrógeno, pero los rendimientos esperados no son mayores a los reportados para especies fermentativas, como lo muestran los resultados de este estudio.

**Tabla 5- 4** Rendimiento de hidrógeno para especies *Clostridium* a partir de sustratos solubles.

Especie	Sustrato	Rendimiento de hidrógeno (mol H <sub>2</sub> /mol sustrato)	Referencia
<i>Clostridium acetobutylicum</i> R ZF-1108	Glucosa	1.97	Zhao et al., 2011
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glucosa	1.73 - 1.69	Mohanraj et al., 2016
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	Glucosa	2.93	Hassan and Morsy, 2015
<i>Clostridium cellulovorans</i> 743B ATCC 35296	Celobiosa	1.50	Sleat et al., 1984
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glucosa	1.88	Este trabajo.
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Carboximetilcelulosa	1.05	
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Glucosa	0.89	
<i>Clostridium cellulovorans</i>	Carboximetilcelulosa	0.56	

Los resultados de las cinéticas de crecimiento de los monocultivos en sustratos solubles, permitieron caracterizar el tipo de metabolismo de cada cepa y realizar el siguiente diseño experimental para estudiar el desempeño del cocultivo de ambas especies utilizado paja de trigo como sustrato.



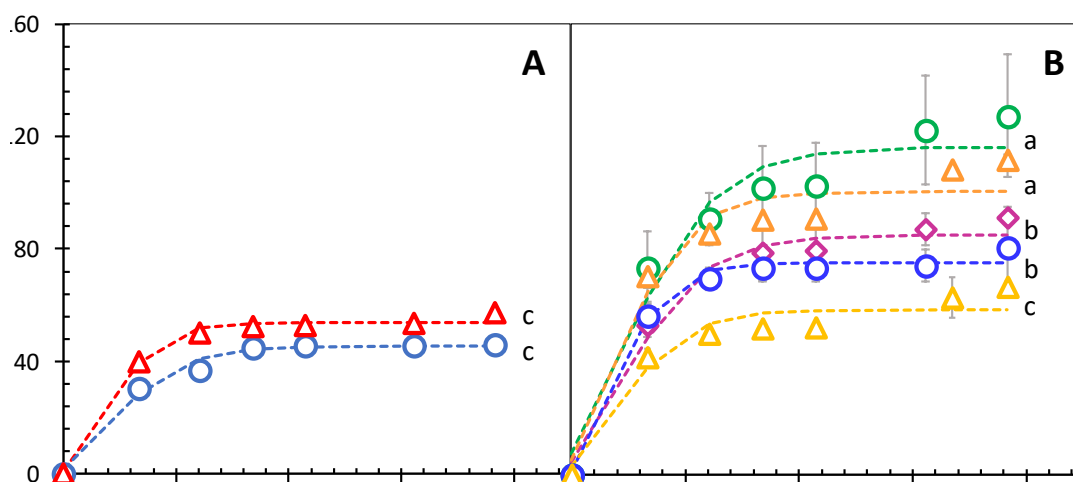
## **5.2 EFECTO DE LA PROPORCIÓN ENTRE EL INÓCULO HIDROLÍTICO (IH) Y EL INÓCULO FERMENTATIVO (IF) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO**

El uso de cocultivos microbianos aprovecha las características de cada microorganismo con metabolismos diferentes para complementar sus funciones. En la literatura, se ha reportado el uso de diferentes proporciones de especies de *Clostridium* de características hidrolíticas y fermentativas para producir biocombustibles a partir de sustratos lignocelulósicos (Wen *et al.*, 2014; Valdez-Vazquez *et al.*, 2015; Ponthein & Cheirsilp 2011).

El diseño experimental de esta etapa consistió en probar diferentes proporciones de *C. acetobutylicum* (Ca) y *C. cellulovorans* (Cc) en cocultivo para determinar su efecto sobre la producción de hidrógeno bajo condiciones estériles. Como sustrato se utilizó el digestato proveniente de un reactor anaerobio alimentado con paja de trigo. Las características de este sustrato fueron 20% ST y una relación sólidos volátiles/sólidos totales de 0.97. La composición lignocelulósica fue de: celulosa 0.5 g/g-ST, hemicelulosa 0.2 g/g-ST y lignina 0.1 g/g-ST (ver Tabla 4-3).

Se llevaron a cabo cinéticas de producción de hidrógeno en paja de trigo de las cepas por separado como controles (monocultivos). La diferencia entre las medias para la producción de hidrógeno no presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (Figura 5.4-A c). *C. acetobutylicum* alcanzó una producción máxima de hidrógeno de 54 NmL/L, mientras que el monocultivo de *C. cellulovorans* produjo un máximo de 45 NmL/L.

En la Figura 5.4-B se muestra las cinéticas de producción de hidrógeno con los cinco cocultivos probados. La máxima producción de hidrógeno se encontró con el cocultivo cuya proporción fue 5:3 con 116 NmL/L. En este cocultivo, la cepa *C. cellulovorans* estuvo en mayor proporción



**Figura 5- 4** (A) Producción de hidrógeno de monocultivos de *C. cellulovorans* (Cc) y *C. acetobutylicum* (Ca) usando paja de trigo como sustrato. (B) Producción de hidrógeno con el cocultivo Cc-Ca en diferentes proporciones.

Los parámetros cinéticos de la producción de hidrógeno se muestran en la Tabla 5-5. De acuerdo a la prueba estadística realizada, las combinaciones 5:3 y 3:5 (Figura 5.4-A a) son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) del resto de las combinaciones (Figura 5.4-A b y c). Estas proporciones presentan las mayores producciones de hidrógeno y las mayores velocidades. En las proporciones 5:1 y 1:5 se observa la misma tendencia, donde tanto la velocidad como la producción máxima de hidrógeno se presentan en el cocultivo con predominio de *C. cellulovorans*.

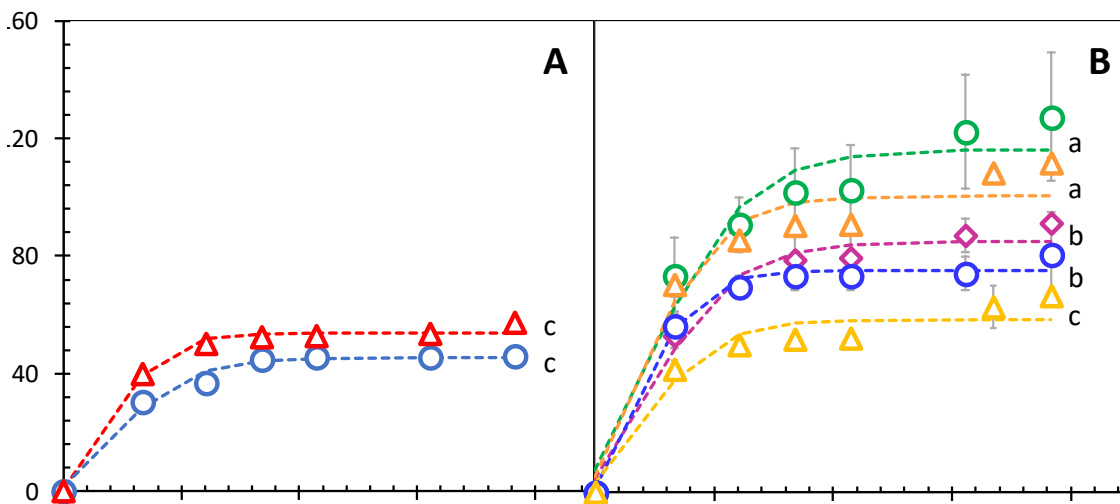
En monocultivos, la velocidad de producción de hidrógeno es mayor para *C. cellulovorans* respecto de *C. acetobutylicum*. Sin embargo, ambos tratamientos llegan a un potencial de producción de hidrógeno similar. Cabe destacar que cuando las cepas se encuentran combinadas la producción de hidrógeno mejora con respecto a la de los monocultivos.

**Tabla 5- 5** Parámetros cinéticos con ajuste de Gompertz de la producción de hidrógeno con cocultivos de *C. cellulovorans* (Cc) y *C. acetobutylicum* (Ca) en diferentes proporciones.

Proporción IH:IF	P <sub>max</sub> (NmL H <sub>2</sub> /L)	R <sub>max</sub> (mLH <sub>2</sub> /h)	λ (h)
5:1	75	1.08	10.5
5:3	116	0.96	0.0
1:1	85	0.78	3.2
1:5	59	0.62	2.6
3:5	101	1.06	2.9
<i>C. acetobutylicum</i>	54	0.80	10.4
<i>C. cellulovorans</i>	45	1.26	5.5

La hidrólisis del sustrato que se infiere lleva a cabo *C. cellulovorans* cuando se encuentra en mayor proporción, incrementa la velocidad de producción de hidrógeno. El monocultivo de *C. cellulovorans* presenta la mayor velocidad de producción de hidrógeno (1.26 NmL H<sub>2</sub>/h).

En la Figura 5-5 se muestran los perfiles de pH de las cinéticas en monocultivo y cocultivos en diferentes proporciones, la proporción 1.0:1.0 tuvo el menor pH final. Los ensayos con mayor proporción de *C. cellulovorans* 5:1 y 5:3 presentaron ΔpH similares, como medida indirecta de los ácidos orgánicos generados indicaría que cuando la proporción de *C. acetobutylicum* es menor no difiere la producción de ácidos orgánicos. En estas dos condiciones es donde se observó la mayor acumulación de acetato y butirato. En las condiciones donde *C. acetobutylicum* se encontraba en mayor proporción, 1:5 y 3:5, los ΔpH fueron diferentes ( $p < 0.05$ ), siendo mayor la proporción 1:5. En la proporción 3:5 el ΔpH fue menor al resto de todas las combinaciones. Esta combinación no presenta acumulación de ácidos, así como la combinación 1:5 donde *C. acetobutylicum* predomina.



**Figura 5- 5** (A) Perfiles de pH en las cinéticas de monocultivo en paja de trigo tratada biológicamente. (B) Perfiles de pH en las cinéticas para diferentes combinaciones de *C. cellulovorans*: *C. acetobutylicum*.

En la Tabla 5-6 se muestra la acumulación de productos de fermentación, que fueron principalmente ácido acético y butírico. Respecto de los monocultivos usados como controles, se tiene que en monocultivo la producción de ácidos orgánicos es menor. En ambos casos existe acumulación, de ácidos acético y butírico.

**Tabla 5- 6** Acumulación de productos de fermentación obtenidos en los mono y cocultivos de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum*.

Proporción IH:IF	Ác. acético (mg/L)	Ác. butírico (mg/L)
5 : 1	818	217
5 : 3	207	296
1 : 1	0	0
1: 5	0	26
3: 5	0	0
<i>C. acetobutylicum</i>	329	229
<i>C. cellulovorans</i>	209	192

En los tratamientos donde *C. cellulovorans* estuvo en mayor proporción, se presentó una acumulación de ácidos orgánicos, lo que es congruente con la producción de hidrógeno. En el tratamiento 1.0:1.0 y en los tratamientos donde *C. acetobutylicum* predomina no se presenta acumulación de ácidos orgánicos.

Petitdemange et al. (1983) observaron únicamente la etapa acidogénica en el cocultivo entre *C. acetobutylicum* y una especie *Clostridium* no determinada que presentó actividad celulolítica. Los metabolitos al final de este trabajo fueron 7.9 g/L de ácido butírico, 1.5 g/L de ácido acético y 1 g/L de etanol.

Después de realizar las pruebas con el cocultivo en condiciones estériles, se cuenta con parámetros para comparar el comportamiento de los monocultivos y el cocultivo al adicionarse directamente a los reactores donde se lleva a cabo el pretratamiento biológico de la paja de trigo.

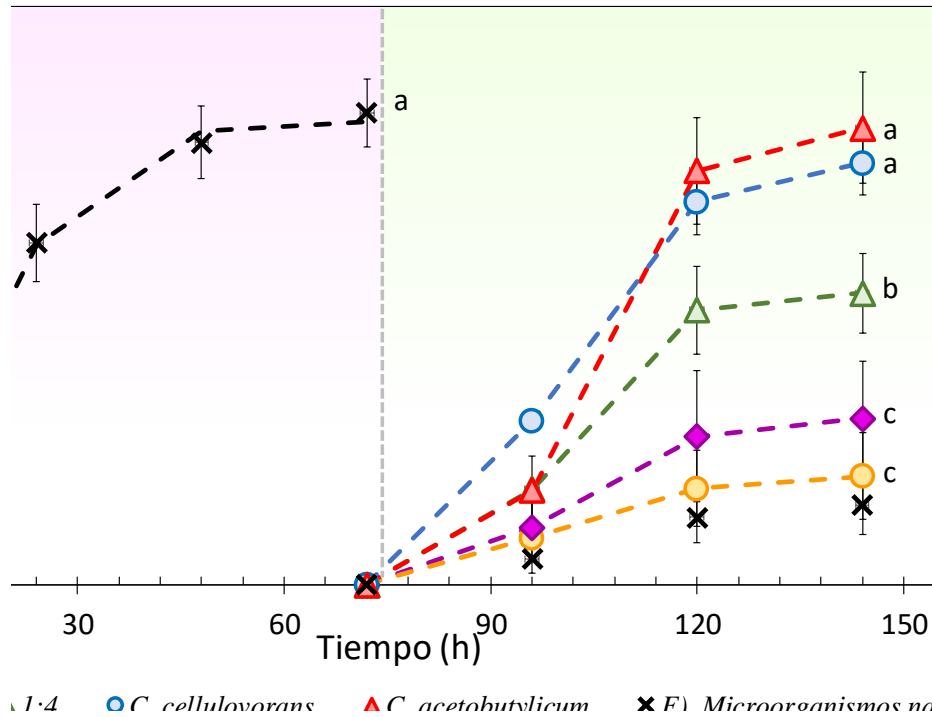
La velocidad de producción de hidrógeno fue mayor en el monocultivo de *C. cellulovorans* sin embargo el potencial de hidrógeno se compara con el monocultivo de *C. acetobutylicum*. El cocultivo 5:3 resultó más eficiente para producir hidrógeno, en comparación con los mono y cocultivos.

### 5.3 BIOAUMENTACIONES DE REACTORES PRODUCTORES DE HIDRÓGENO

El término bioaumentación se refiere a la adición de microorganismos con metabolismos específicos a bioprocesos con la presencia de cultivos mixtos. Durante la bioaumentación se pretende colonizar el reactor con nuevas especies que habrán de convivir con las que ya son parte del bioproceso (Yang *et al.*, 2016; Tsapekos *et al.*, 2017). Esta estrategia se ha propuesto para procesar sustratos con baja biodegradabilidad como los sustratos lignocelulósicos, con el fin de promover las etapas de hidrólisis y fermentación (Azman *et al.*, 2015).

Los biorreactores productores de hidrógeno alimentados con paja de trigo, fueron bioaumentados con un cocultivo de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum*. Se tuvieron diferentes proporciones de cada especie, y el propósito fue determinar el efecto de la bioaumentación sobre la producción de hidrógeno en presencia de la comunidad nativa de microorganismos del sustrato. Para ello, se tuvo un primer ciclo de fermentación natural donde los microorganismos nativos tuvieron actividad. Cuando la producción de biogás cesó, se adicionó sustrato nuevo junto con los nuevos microorganismos para llevar a cabo la bioaumentación. Las proporciones de los inóculos se siguieron de acuerdo al diseño experimental expuesto en la Tabla 4-2.

En la Figura 5-6 se observa que, en el ciclo de fermentación natural, la producción de hidrógeno con microorganismos nativos alcanzó una producción máxima de 120 NmL H<sub>2</sub>/L. En el ciclo de bioaumentación, todos los tratamientos con bioaumentación, monocultivos y cocultivos, presentaron mayor producción de hidrógeno en comparación con el control sin bioaumentación. Los monocultivos presentaron la mayor producción de hidrógeno, de 111 NmL H<sub>2</sub>/L a 119 NmL H<sub>2</sub>/L, sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Después de los monocultivos, la mayor producción de hidrógeno fue con la proporción 1:4 alcanzando 76 NmL H<sub>2</sub>/L.



**Figura 5- 6** Producción de hidrógeno en: ciclo de fermentación natural (rosa) con MN de la paja de trigo y ciclo de bioaumentación (verde) con mono y cocultivos de *C. cellulovorans* y *C. acetobutylicum*.

La producción de hidrógeno de las proporciones 4:1 y 1:1 no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) a la producción de los microorganismos nativos en el segundo ciclo. El control consistió en añadir medio estéril con el volumen equivalente de los inóculos añadidos en los tratamientos, por lo que se descarta que el efecto positivo de la bioaumentación haya sido por adición de nutrientes.

Este ensayo muestra que los microorganismos nativos tienen un ciclo de producción de hidrógeno de 4 días, y después de este tiempo se hacen presentes otros microorganismos no productores de hidrógeno. En el ciclo de bioaumentación, el control presentó escasa producción de hidrógeno.

En la Tabla 5-7 se muestran los parámetros cinéticos del ciclo de fermentación natural, los mono y cocultivos, así como el control sin bioaumentación. En el ciclo de bioaumentación, la producción por parte de los microorganismos nativos decae 83% (Figura 5-6 a y c). En comparación con el control los monocultivos presentan mayor velocidad y producción de

hidrógeno. La combinación 1:4 tuvo la mayor producción y la mayor velocidad de producción de hidrógeno respecto a las otras combinaciones.

**Tabla 5- 7** Parámetros cinéticos para el ciclo de fermentación con bioaumentación a reactores de producción de hidrógeno alimentados con paja de trigo.

	<b>Proporción IH:IF</b>	<b>P<sub>max</sub></b> <b>(NmL H<sub>2</sub>/L)</b>	<b>R<sub>max</sub></b> <b>(mLH<sub>2</sub>/h)</b>	<b>λ (h)</b>
	4:1	29	0.8	8.8
	1:1	44	1.4	13.5
	1:4	76	3.3	16.6
	<i>C. cellulovorans</i>	111	3.7	12.6
	<i>C. acetobutylicum</i>	119	5.0	19.2
<b>MN</b>	Ciclo fermentación natural	120	5.0	4.7
	Ciclo Bioaumentación	21	0.6	12.6

Estos resultados coinciden con la caracterización realizada de las cepas previamente. La velocidad de producción de hidrógeno de *C. acetobutylicum* es 1.4 veces mayor que la de *C. cellulovorans*. Sin embargo, la acumulación final de hidrógeno producido no presenta diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ambas cepas cuando se crecen en un sustrato lignocelulósico (ver Figura 5-4).



Los ensayos se llevaron a cabo sin control de pH. El ciclo de bioaumentación inició a un pH promedio de 4.5 y finalizó en 5.0 sin variación significativa entre los tratamientos. En algunos estudios la producción de hidrógeno está asociada a pH menores a 5.5 (Andersch, *et al.*, 1983). La actividad hidrogenasa de la célula disminuye a pH menores a 5.2 siendo 6.3 el pH óptimo para la producción de hidrógeno (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009). Los microorganismos que se bioaumentaron mostraron producción de hidrógeno a pesar de que el pH estaba por debajo del óptimo. Por el contrario, los microorganismos nativos se vieron afectados por el descenso del pH y no igualaron la producción de hidrógeno del ciclo anterior. En comparación con el control que tuvo una producción de metabolitos de 602 mg/L, la bioaumentación con el monocultivo de *C. cellulovorans* tuvo la mayor acumulación de ácidos grasos volátiles con 1,428 mg/L. La bioaumentación con el monocultivo de *C. acetobutylicum* produjo menos metabolitos (463 mg/L), lo que no coincide con la producción de hidrógeno observada. En todos los tratamientos y el control, el ácido acético fue el metabolito que se encontró en mayor proporción en todos los tratamientos (Tabla 5-8).

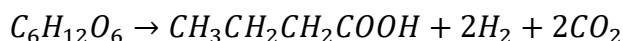
**Tabla 5- 8** Producción de ácidos grasos volátiles para el ciclo de fermentación con bioaumentación a reactores de producción de hidrógeno alimentados con paja de trigo.

Proporción IH:IF	Concentración (mg/L)					Total
	Ácido Acético	Ácido Butírico	Ácido Propiónico	Ácido Isovalérico	Ácido Caprónico	
4:1	577	127	142	44	36	926
1:1	388	92	74	47	31	632
1:4	291	100	34	29	20	474
<i>C. cellulovorans</i>	828	192	199	115	94	1428
<i>C. acetobutylicum</i>	230	58	52	70	53	463
MN en ciclo de bioaumentación	367	62	79	56	38	602

Los ácidos producidos por cada cocultivo están relacionados con la cantidad de *C. cellulovorans* presente. El cocultivo con mayor presencia de la cepa hidrolítica presentó mayor producción de ácidos grasos volátiles ( $p > 0.05$ ). De manera similar, el cocultivo con menor cantidad de *C. cellulovorans* presentó una acumulación de metabolitos comparable con el control sin bioaumentar. El género *Clostridium* tiene un rendimiento teórico de hidrógeno de 4 mol de  $H_2$  por 1 mol de glucosa cuando se produce ácido acético. Para cumplir esta eficiencia la cepa debe seguir la siguiente síntesis:



La ruta metabólica de producción de ácido butírico sigue la siguiente reacción:



De acuerdo con la estequiometría de la reacción se producen 2 mol de  $H_2$  por cada mol de glucosa (Hassan & Morsy 2015). Sin embargo, considerando la cantidad de hidrógeno producida en el ensayo, la suma de ácidos acético y butírico generada es superior a la teórica esperada. Principalmente se observa una mayor acumulación de ácido acético asociada a procesos acetogénicos a partir de hidrógeno y dióxido de carbono (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo 2009).

La disminución en la producción de hidrógeno está asociada a microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos y acetogénicos autotróficos. La aparición de microorganismos metanógenos está implícita en el uso de sustratos en condiciones no estériles. Para inhibir la aparición de los mismos se hace uso de diferentes estrategias como el tratamiento térmico del inóculo, pH bajos, altas tasas de dilución, adición de compuestos inhibidores, por mencionar los principales (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo 2009).

En las cinéticas realizadas, el digestato usado como inóculo no se sometió a tratamiento térmico y ni tampoco se realizó control de pH. Después del cuarto día, la producción de hidrógeno con microorganismos nativos cesó y se observó la aparición de metano (4% del biogás producido). En los reactores bioaumentados se observa la misma tendencia en la producción de metano después del 4 día de operación con hasta del 8.7% del biogás obtenido.

En la Tabla 5-9 se muestran los porcentajes de consumo de sustratos en este ensayo. Los mayores consumos de celulosa se muestran en los tratamientos con monocultivo de *C. cellulovorans* y el cocultivo 0.4:1.6 en los cuales se obtuvieron las mayores producciones de hidrógeno. Sin embargo, en el tratamiento con bioaumentación el monocultivo de *C. acetobutylicum* no presenta consumo de celulosa, ni hemicelulosa. La producción de hidrógeno en este ensayo puede estar relacionada con la concentración residual de glucosa proveniente con el inóculo.

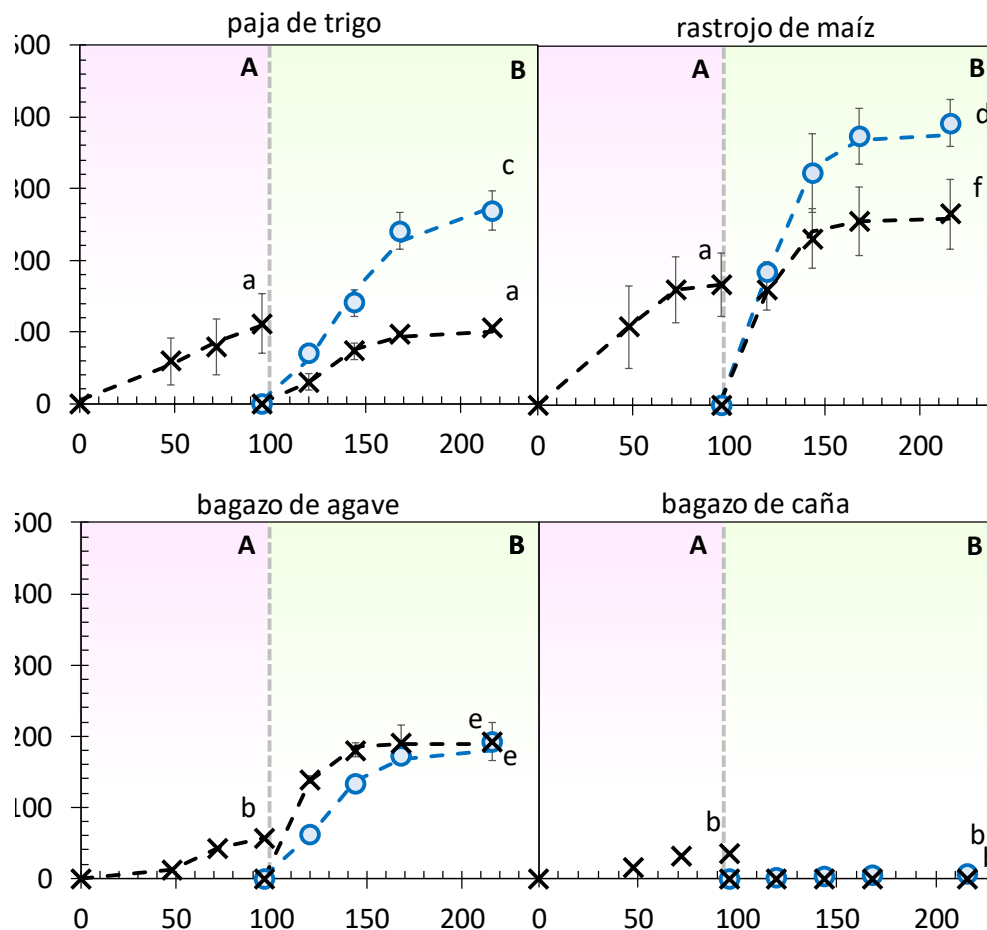
**Tabla 5- 9** Porcentaje de consumo de sustrato para el ciclo de fermentación con bioaumentación a reactores de producción de hidrógeno alimentados con paja de trigo.

<b>Proporción IH:IF</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
4:1	11	20	29
1:1	14	20	27
1:4	17	24	31
<i>C. cellulovorans</i>	17	19	31
<i>C. acetobutylicum</i>	0	6	24
MN en ciclo de bioaumentación	6	15	18

## 5.4 ENSAYO DE BIOAUMENTACIÓN CONFIRMATORIO

El ensayo de bioaumentación confirmatorio consistió en probar el monocultivo de *C. cellulovorans* bajo las mismas condiciones con tres sustratos lignocelulósicos: rastrojo de maíz, bagazo de agave y de caña de azúcar. El objetivo fue caracterizar el efecto de la bioaumentación en los reactores productores de hidrógeno utilizando diferentes sustratos lignocelulósicos. El pH inicial en el ciclo de bioaumentación se ajustó a 6.5.

En la Figura 5.7 se muestran los perfiles de producción de hidrógeno en el ciclo de fermentación natural con microorganismos nativos, y en el ciclo de bioaumentación con el monocultivo de *C. cellulovorans* para cuatro sustratos.



**Figura 5- 7** Perfiles de producción de hidrógeno en el ciclo de fermentación natural (A) y el ciclo de bioaumentación (B) con el monocultivo de *C. cellulovorans*.

En la Tabla 5-10 se muestran los parámetros cinéticos de producción de hidrógeno obtenidos para cada sustrato con microorganismos nativos en el ciclo de fermentación natural, el ciclo de la bioaumentación con *C. cellulovorans*, y los respectivos controles sin bioaumentación.

**Tabla 5- 10** Parámetros cinéticos obtenidos con el ajuste de Gompertz para el ciclo de fermentación natural y el ciclo de bioaumentación con *C. cellulovorans*.

Sustrato		Ciclo	P max (NmL H <sub>2</sub> /L)	R max (NmL H <sub>2</sub> /h)	λ (h)
Paja de trigo	Fermentación natural	Microorganismos nativos	141	1.4	9.5
	Bioaumentación	<i>C. Cellulovorans</i>	284	4.1	9.5
		Microorganismos nativos	101	2.2	10.3
Rastrojo de maíz	Fermentación natural	Microorganismos nativos	169	5.6	27.7
	Bioaumentación	<i>C. Cellulovorans</i>	377	9.8	5.3
		Microorganismos nativos	259	7.9	3.6
Bagazo de caña	Fermentación natural	Microorganismos nativos	36	1.0	31.8
	Bioaumentación	<i>C. Cellulovorans</i>	3	1.0	2.0
		Microorganismos nativos	6	3.6	7.5
Bagazo de agave	Fermentación natural	Microorganismos nativos	60	1.5	40.5
	Bioaumentación	<i>C. Cellulovorans</i>	180	3.8	7.8
		Microorganismos nativos	41	7.9	4.8

Del ciclo de fermentación natural con microorganismos nativos tenemos que las producciones de hidrógeno con paja de trigo y rastrojo de maíz no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ). La producción de hidrógeno en los sustratos mencionados es superior a la producción a partir de los bagazos de caña y agave ( $p > 0.05$ ).

Durante el ciclo de bioaumentación se observó que los resultados en paja de trigo fueron similares a los obtenidos en el ensayo anterior. Los reactores con bioaumentación presentaron una producción de hidrógeno 2.8 veces mayor respecto al control sin bioaumentación ( $p > 0.05$ ). El rastrojo de maíz con bioaumentación presentó la mayor producción de hidrógeno de todos los sustratos ( $p > 0.05$ ). La bioaumentación en este sustrato mejoró 1.5 veces la producción de hidrógeno con respecto al control sin bioaumentar.

Para el bagazo de agave, la bioaumentación no mostró tener efecto significativo sobre la producción de hidrógeno ( $p > 0.05$ ). Se observó el mismo efecto en el bagazo de caña, donde la producción de hidrógeno no fue mayor con la bioaumentación ( $p > 0.05$ ).

En la Tabla 5-11 se compara el rendimiento de hidrógeno con otros trabajos. Todos los trabajos listados hacen uso de diferentes sustratos lignocelulósicos sin pretratamiento. La estrategia de bioaumentación es comparable con el uso de cultivos mixtos en otros sistemas. El tipo de sustrato utilizado también influye en el rendimiento de producción de hidrógeno. Para residuos agrícolas de maíz, los máximos rendimientos de hidrógeno se alcanzan en sistemas estériles haciendo uso de cepas puras (Li & Fang, 2007; Ivanova et al., 2009).

**Tabla 5- 11** Comparación en la producción de hidrógeno a partir de diferentes residuos agrícolas sin pretratamiento.

Sustrato	Inóculo	Temperatura (°C)	Producción de hidrógeno (mL H <sub>2</sub> /g SV)	Referencia
Paja de trigo	Estiércol de vaca (cultivo mixto)	36	1	Fan et al., 2006
Paja de trigo	Digestato de reactores productores de H <sub>2</sub>	36	6.4	Nasirian et al., 2012
Rastrojo de maíz	<i>Clostridium butyricum</i> (cultivo puro)	35	9	Li & Fang, 2007
Hojas de maíz	<i>Clostridium saccharolyticus</i> (cultivo puro)	70	18	Ivanova et al., 2009
Tallos de maíz	Cultivo mixto anaerobio	36	3	Zhang et al., 2007
Paja de trigo	Microorganismos nativos bioaumentados con <i>C. cellulovorans</i>	37	4	Este trabajo
	Microorganismos nativos		1	
Rastrojo de maíz	Microorganismos nativos bioaumentados con <i>C. cellulovorans</i>	7		
	Microorganismos nativos	5		

Los rendimientos determinados experimentalmente en este trabajo son semejantes a los resultados obtenidos por Li y Fang en 2007. La diferencia entre ambos ensayos, además de la especie utilizada para bioaumentar, es que en este estudio se operó sin esterilidad. Considerando los costos que añade al proceso trabajar bajo condiciones asépticas, sería pertinente realizar un análisis correspondiente para determinar la rentabilidad de la producción de hidrógeno.

La producción de hidrógeno en la fase de bioaumentación está relacionada con la producción que presenta el sustrato y su comunidad nativa en el ciclo de fermentación natural. En la Tabla 5-12 se muestran los resultados de la bioaumentación en diferentes sistemas de producción de hidrógeno. Comúnmente los inóculos utilizados para la producción de hidrógeno son digestatos obtenidos de reactores de fermentación oscura. Este inóculo es sometido a un tratamiento térmico para inhibir el crecimiento de microorganismos metanogénicos (Kumar *et al.*, 2015; Sharma & Melkania, 2018; Z. Yang *et al.*, 2016).

**Tabla 5- 12** Comparación del efecto de la de la bioaumentación en la producción de hidrógeno en reactores alimentados con sustratos orgánicos e inóculos fermentativos

Sustrato	Inóculo	Especies bioaumentadas	Producción de hidrógeno			Referencia
			Inóculo	Bioaumentación	Incremento en la producción (%)	
FORSU	Lodo anaerobio	<i>Escherichia coli</i>	23.4 mLH <sub>2</sub> /gCarbo	39.2 mLH <sub>2</sub> /gCarbo	168%	(Sharma & Melkania 2018)
		<i>Bacillus subtilis</i>	28.6 mLH <sub>2</sub> /gCarbo	43.7 mLH <sub>2</sub> /gCarbo	153%	
		<i>Enterobater aerogenes</i>	25.7 mLH <sub>2</sub> /gCarbo	37.1 mLH <sub>2</sub> /gCarbo	147%	
Agua residual industrial	Lodo anaerobio	<i>Escherichia coli</i>		259.6 mL H <sub>2</sub> /gDQO	118%	(Kumar et al., 2015)
		<i>E. coli/Enterobacter cloacae</i>	221 mL H <sub>2</sub> /gDQO	248.5 mL H <sub>2</sub> /gDQO	113%	
Papas procesadas	Lodo granular anaerobio	<i>Hydrogenispora ethanolica</i> LX-B	43.4 mL H <sub>2</sub> /gSV	54.3 mL H <sub>2</sub> /gSV	125%	(Z. Yang et al., 2016)
Ensilado de maíz	Excretas de cerdo	<i>Piromyces rhinziflata</i> YM600	44.4 mL H <sub>2</sub> /gSV	52.7 mL H <sub>2</sub> /gSV	119%	(Nkemka et al., 2015)
Paja de trigo	Microorganismos nativos del sustrato		1 mL H <sub>2</sub> /gSV	4 mL H <sub>2</sub> /gSV	400%	Este trabajo.
Rastrojo de maíz		<i>C. cellulovorans</i>	5 mL H <sub>2</sub> /gSV	7 mL H <sub>2</sub> /gSV	140%	



Los principales ácidos grasos volátiles producidos tanto en paja de trigo como en rastrojo de maíz fueron ácido acético, butírico, propiónico, isovalérico y caproico. En paja de trigo la concentración final de ácidos en la bioaumentación fue de 2.9 g/L. El 49% de los ácidos acumulados fue ácido acético, seguido por propiónico y butírico con 22% y 19% respectivamente. Sin embargo, no hay diferencia entre los ácidos producidos bajo condiciones de bioaumentación respecto de los no bioaumentados.

En el rastrojo de maíz, el comportamiento de ambos tratamientos fue similar a la de paja de trigo. La composición de los AGV's principales fue de ácido acético 42%, propiónico 18% y butírico 16% (ver Tabla 5-13).

**Tabla 5- 13** Producción de ácidos grasos volátiles al final de los ciclos de fermentación natural y de bioaumentación con *C. cellulovorans*.

Sustrato	Tratamiento	Concentración (mg/L)					Total
		Ácido Acético	Ácido Butírico	Ácido Propiónico	Ácido Isovalérico	Ácido Caproico	
Paja de trigo	<i>C. cellulovorans</i>	1449	555	640	178	110	2932
	Microorganismos nativos	1478	525	689	178	102	2972
Rastrojo de maíz	<i>C. cellulovorans</i>	1326	520	584	520	207	3157
	Microorganismos nativos	1399	447	607	447	195	3095

El consumo de sustrato en los reactores que más producción de hidrógeno presentaron se muestra en la tabla 5-14. La paja de trigo sólo presentó consumo de celulosa en condiciones de bioaumentación. Con un 33% y consumo de hemicelulosa 44%. El ciclo control para la paja de trigo sólo presentó consumo de hemicelulosa con 12%. En el rastrojo de maíz el consumo de celulosa y hemicelulosa se presentó tanto en bioaumentación como en el control. Sin embargo, el porcentaje de degradación es mayor en la bioaumentación.

**Tabla 5- 14** Consumo de materia lignocelulósica después del ciclo de bioaumentación

<b>Sustrato</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
	<i>C. cellulovorans</i>	32.9	43.9	45.0
Paja de trigo	Microorganismos nativos	0.0	11.9	11.3
	<i>C. cellulovorans</i>	36.1	30.9	59.5
Rastrojo de maíz	Microorganismos nativos	22.4	15.1	51.1

## 6. CONCLUSIONES

De las cinéticas de los monocultivos en sustratos solubles se determinó que *C. acetobutylicum* presentó mayores características fermentativas medidas como producción de hidrógeno y ácidos orgánicos que *C. cellulovorans*. Al contrario, *C. cellulovorans* no presentó características fermentativas importantes, pero sí capacidades hidrolíticas (medido como consumo de carboximetilcelulosa).

En el ensayo bajo condiciones estériles con diferentes proporciones de inóculo hidrolítico (*C. cellulovorans*) e inóculo fermentativo (*C. acetobutylicum*) se tiene que:

- Los cocultivos presentaron mayor velocidad y producción de hidrógeno en comparación con los monocultivos.
- Cuando el inóculo hidrolítico (*C. cellulovorans*) estuvo en mayor proporción en el cocultivo se incrementó la velocidad de producción, pero no la producción total de hidrógeno.

Del ensayo de bioaumentación con *C. cellulovorans* utilizando los cuatros sustratos lignocelulósicos se tiene que:

- La bioaumentación con *C. cellulovorans* incrementó la producción de hidrógeno solo en paja de trigo y rastrojo de maíz como sustratos. La bioaumentación no tuvo efecto sobre la producción de hidrógeno utilizando bagazo de agave ni bagazo de caña como sustratos.

## 7. REFERENCIAS

- A. F. Saripana, A. R. (2015). Thermophilic Fermentative Biohydrogen Production From Xylan by Anaerobic Mixed Cultures in Elephant Dung. *International Journal of Green Energy*, 12, 900–907.
- Abdalla, A. M., Hossain, S., Nisfindy, O. B., Azad, A. T., Dawood, M., & Azad, A. K. (2018). Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review. *Energy Conversion and Management*, 165(April), 602–627. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.03.088>
- Andersch, W., Bahl, H., & Gottschalk, G. (1983). Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 327–332. <https://doi.org/10.1007/BF00504740>
- Anitescu, G., & Bruno, T. J. (2012). Liquid biofuels: Fluid properties to optimize feedstock selection, processing, refining/blending, storage/transportation, and combustion. *Energy and Fuels*, 26(1), 324–348. <https://doi.org/10.1021/ef201392s>
- Arantes, V., & Saddler, J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-1>
- Argun, H., Kargi, F., & Kapdan, I. K. (2009). Effects of the substrate and cell concentration on bio-hydrogen production from ground wheat by combined dark and photo-fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(15), 6181–6188. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.130>
- Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-González, R. I., Alatríste-Mondragón, F., & Méndez-Acosta, H. O. (2015). Methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresource Technology*, 181, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.036>
- Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E., Celis, L. B., & Alatríste-Mondragón, F. (2014). Sequential hydrolysis of oat straw and hydrogen production from hydrolysates: Role of hydrolysates constituents. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(34), 10756–10765. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.200>
- Auria, R., Boileau, C., Davidson, S., Casalot, L., Christen, P., Liebgott, P. P., & Combet-Blanc, Y. (2016). Hydrogen production by the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* Part II: Modeling and experimental approaches for hydrogen production. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0681-0>
- Azman, S., Khadem, A. F., Van Lier, J. B., Zeeman, G., & Plugge, C. M. (2015). Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogas production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(23), 2523–2564. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1053727>

- Bellido, C., Loureiro Pinto, M., Coca, M., González-Benito, G., & García-Cubero, M. T. (2014). Acetone-butanol-ethanol (ABE) production by *Clostridium beijerinckii* from wheat straw hydrolysates: Efficient use of penta and hexa carbohydrates. *Bioresource Technology*, *167*, 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.020>
- Bioenergéticos, L. de P. y desarrollo de los. (2008). Ley de promoción y desarrollo de los bioenergéticos, 1–12.
- Brémond, U., de Buyer, R., Steyer, J. P., Bernet, N., & Carrere, H. (2018). Biological pretreatments of biomass for improving biogas production: an overview from lab scale to full-scale. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *90*(June 2017), 583–604. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.103>
- Čater, M., Fanedl, L., Malovrh, Š., & Marinšek Logar, R. (2015). Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, *186*, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.029>
- Chang, V. S., & Holtzapple, M. T. (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *84–86*, 5–37. <https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:5>
- Fan, Y. T., Zhang, Y. H., Zhang, S. F., Hou, H. W., & Ren, B. Z. (2006). Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource Technology*, *97*(3), 500–505. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.049>
- Garrote, G., Dominguez, H., & Parajo, J. (1999). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz Als Roh- Und Werkstoff*, *57*(3), 191–202. <https://doi.org/10.1007/s001070050039>
- Giallo, J.; Gaudin, C.; Belaich, J. P.; Petitdemange, E. and Caillet-Mangin, F. (1983). Metabolism of glucose and cellobiose by cellulolytic Metabolism of Glucose and Cellobiose by Cellulolytic. *Applied and Environmental Microbiology*, *45*(3), 843–849.
- Gossett, J. M., Stuckey, D. C., Owen, W. F., & McCarty, P. L. (1982). Heat Treatment and Anaerobic Digestion of Refuse. *Journal of the Environmental Engineering Division*, *108*(3), 437–454.
- Green, E. M., & et al. (1996). Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Microbiol. 142:2079-2086*, *25*, 2079–2086.
- Hassan, S. H. A., & Morsy, F. M. (2015). Feasibility of installing and maintaining anaerobiosis using *Escherichia coli* HD701 as a facultative anaerobe for hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 from various carbohydrates. *Enzyme and Microbial Technology*, *81*, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.08.002>
- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009a). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *100*(1), 10–18.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>

- Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. (2009b). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, *100*(1), 10–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Ivanova, G., Rákhely, G., & Kovács, K. L. (2009). Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(9), 3659–3670.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.082>
- Jang, Y. S., Malaviya, A., Cho, C., Lee, J., & Lee, S. Y. (2012). Butanol production from renewable biomass by clostridia. *Bioresource Technology*, *123*, 653–663.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.104>
- Janssen, H., Wang, Y., & Blaschek, H. P. (2014). *CLOSTRIDIUM* / *Clostridium acetobutylicum*. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edi, Vol. 1). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00070-7>
- Jones, D. T., & Woods, D. R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, *50*(4), 484–524. <https://doi.org/3540574>
- Kalinci, Y., Hepbasli, A., & Dincer, I. (2009). Biomass-based hydrogen production: A review and analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(21), 8799–8817.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.078>
- Kalyani, D., Lee, K., Kim, T., Li, J., Sudha, S., Chan, Y., & Lee, J. (2013). Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. *Fuel*, *107*, 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.01.037>
- Kolek, J., Branska, B., Drahokoupil, M., Patakova, P., & Melzoch, K. (2016). Evaluation of viability, metabolic activity and spore quantity in clostridial cultures during ABE fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, *363*(6), 1–8.  
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnw031>
- Kuit, W., Minton, N. P., López-Contreras, A. M., & Eggink, G. (2012). Disruption of the acetate kinase (ack) gene of *Clostridium acetobutylicum* results in delayed acetate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*(3), 729–741.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3848-4>
- Kumagai, A., Kawamura, S., Lee, S. H., Endo, T., Rodriguez, M., & Mielenz, J. R. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing for Hinoki cypress and Eucalyptus after fibrillation by steam and subsequent wet-disk milling. *Bioresource Technology*, *162*, 89–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.110>
- Kumar, G., Bakonyi, P., Sivagurunathan, P., Kim, S. H., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., & Lin, C. Y. (2015). Enhanced biohydrogen production from beverage industrial wastewater using external nitrogen sources and bioaugmentation with facultative anaerobic strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *120*(2), 155–160.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.12.011>

- Lara-Vázquez, A. R., Quiroz-Figueroa, F. R., Sánchez, A., & Valdez-Vazquez, I. (2014). Particle size and hydration medium effects on hydration properties and sugar release of wheat straw fibers. *Biomass and Bioenergy*, *68*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.06.006>
- Li, C., & Fang, H. H. P. (2007). Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *37*(1), 1–39. <https://doi.org/10.1080/10643380600729071>
- Liew, W. H., Hassim, M. H., & Ng, D. K. S. (2014). Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. *Journal of Cleaner Production*, *71*(November 2016), 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.01.006>
- Liu, J., Jin, F., Fan, M., Zhu, L., Tang, C., Chang, R., ... Li, Q. (2018). Production of high-pure hydrogen by an integrated catalytic process: Comparison of different lignocellulosic biomasses and three major components. *Fuel*, *226*(April), 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.04.026>
- Lopez-Contreras, A. M., Martens, A. A., Szijarto, N., Mooibroek, H., Claassen, P. A. M., Oost, J. Van Der, & Vos, W. M. De. (2003). Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 of CelG, a Cellulosomal Glycoside Hydrolase Belonging to Family 9. *Society*, *69*(2), 869–877. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.869>
- Maiti, S., Gallastegui, G., Sarma, S. J., Brar, S. K., Le Bihan, Y., Drogui, P., ... Verma, M. (2016). A re-look at the biochemical strategies to enhance butanol production. *Biomass and Bioenergy*, *94*, 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.09.001>
- Minty, J. J., Singer, M. E., Scholz, S. A., Bae, C., Ahn, J., Foster, C. E., & Liao, J. C. (2013). Design and characterization of synthetic fungal-bacterial consortia for direct production of isobutanol from cellulosic biomass, *110*(36), 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218447110>
- Mohanraj, S., Anbalagan, K., Rajaguru, P., & Pugalenth, V. (2016). Effects of phyto-genic copper nanoparticles on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* and *Clostridium acetobutylicum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*(25), 10639–10645. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.197>
- Mohr, S. H., Wang, J., Ellem, G., Ward, J., & Giurco, D. (2015). Projection of world fossil fuels by country. *Fuel*, *141*, 120–135. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.10.030>
- Nasirian, N. (2012). Biological hydrogen production from acid-pretreated straw by simultaneous saccharification and fermentation. *African Journal of Agricultural Research*, *7*(6), 876–882. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.552>
- Navarro-Díaz Marcelo, V.-V. I. E. A. E. (2016). ScienceDirect Ecological perspectives of hydrogen fermentation by microbial consortia : What we have learned and the way forward, *52*(55), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.08.027>

- Ni, Y., & Sun, Z. (2009). Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(3), 415–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2003-y>
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.100>
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M. V, Kira, S., Zeng, Q., Gibson, R., ... Smith, D. R. (2001). Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum* Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, 183(16), a823–4838. <https://doi.org/10.1128/JB.183.16.4823>
- Nzila, A. (2017). Mini review: Update on bioaugmentation in anaerobic processes for biogas production. *Anaerobe*, 46, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.11.007>
- O'Connor, P. (2013). *A General Introduction to Biomass Utilization Possibilities. The Role of Catalysis for the Sustainable Production of Bio-Fuels and Bio-Chemicals* (Vol. #volume#). &copy; 2013 Elsevier B.V. All rights reserved. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56330-9.00001-2>
- Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). Biotechnology for Biofuels A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks, 14, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
- Ou, J., Xu, N., Ernst, P., Ma, C., Bush, M., Goh, K. Y., ... Liu, X. (Margaret). (2017). Process engineering of cellulosic n-butanol production from corn-based biomass using *Clostridium cellulovorans*. *Process Biochemistry*, 62(May), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.009>
- Parisutham, V., Hyun, T., & Kuk, S. (2014). Bioresource Technology Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes : From pretreatment to biofuel production. *Bioresource Technology*, 161, 431–440. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.114>
- Patinvoh, R. J., Mehrjerdi, A. K., Horváth, I. S., & Taherzadeh, M. J. (2016). Bioresource Technology Dry fermentation of manure with straw in continuous plug flow reactor : Reactor development and process stability at different loading rates. *Bioresource Technology*, i. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.011>
- Pereira Ramos, L. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quimica Nova*, 26(6), 863–871. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600015>



- Pérez-Rangel, M., Quiroz-Figueroa, F. R., González-Castañeda, J., & Valdez-Vazquez, I. (2015). Microscopic analysis of wheat straw cell wall degradation by microbial consortia for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *40*(1), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.050>
- Petitdemange, E., Fond, O., Caillet, F., Petitdemange, H., & Gay, R. (1983). A novel one step process for cellulose fermentation using mesophilic cellulolytic and glycolytic Clostridia. *Biotechnology Letters*, *5*(2), 119–124. <https://doi.org/10.1007/BF00132170>
- Ponthein, W., & Cheirsilp, B. (2011). Development of Acetone Butanol Ethanol ( ABE ) Production from Palm Pressed Fiber by Mixed Culture of Clostridium sp . and Bacillus sp . *Energy Procedia*, *9*, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.09.052>
- Quintero, J. A., Rincón, L. E., & Cardona, C. A. (2011). Production of bioethanol from agroindustrial residues as feedstocks. *Biofuels*, 251–285. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00011-5>
- Qureshi, N. (2009). Solvent Production. *Encyclopedia of Microbiology*, 512–528. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373944-5.00160-7>
- Qureshi, N., Ezeji, T. C., Ebener, J., Dien, B. S., Cotta, M. A., & Blaschek, H. P. (2008). Butanol production by Clostridium beijerinckii. Part I: Use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresource Technology*, *99*(13), 5915–5922. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.087>
- Qureshi, N., Saha, B. C., Cotta, M. A., & Singh, V. (2013). An economic evaluation of biological conversion of wheat straw to butanol : A biofuel. *Energy Conversion and Management*, *65*, 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.09.015>
- Razo, C., Ludeña, C., Saucedo, A., Astete-Miller, S., Hepp, J., & Vildósola, A. (2007). *Producción de biomasa para biocombustibles líquidos: el potencial de América latina y el Caribe*.
- Rezania, S., Din, M. F. M., Taib, S. M., Sohaili, J., Chelliapan, S., Kamyab, H., & Saha, B. B. (2017). Review on fermentative biohydrogen production from water hyacinth, wheat straw and rice straw with focus on recent perspectives. *International Journal of Hydrogen Energy*, *42*(33), 20955–20969. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.007>
- Rigal, L. (2017). CARACTERIZACION Y VALORIZACION DEL BAGAZO DE Agave tequilana Weber DE LA, (September). <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.1997.07.054>
- Roberto, W., & Gonçalves, R. (2017). Review on the characteristics of butanol , its production and use as fuel in internal combustion engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *69*(November 2016), 642–651. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.213>
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, *27*(2), 185–194.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

- Sauer, M. (2016). Industrial production of acetone and butanol by fermentation-100 years later. *FEMS Microbiology Letters*, 363(13), 1–4.  
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnw134>
- Saxena, R. C., Adhikari, D. K., & Goyal, H. B. (2009). Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(1), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2007.07.011>
- Sharma, P., & Melkania, U. (2018). Effect of bioaugmentation on hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(15), 7290–7298. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.03.031>
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Sleat, R., Mah, R. A., & Robinson, R. (1984). *Bacterium, Clostridium*, 48(1), 88–93.
- Sluiter, a, Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., ... Nrel, J. W. (2008). Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, (March), 9.  
<https://doi.org/NREL/TP-510-42621>
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Talluri, S., Raj, S. M., & Christopher, L. P. (2013). Consolidated bioprocessing of untreated switchgrass to hydrogen by the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903. *Bioresource Technology*, 139, 272–279.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.005>
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146–161.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- Tsapekos, P., Kougias, P. G., Vasileiou, S. A., Treu, L., Campanaro, S., Lyberatos, G., & Angelidaki, I. (2017). Bioaugmentation with hydrolytic microbes to improve the anaerobic biodegradability of lignocellulosic agricultural residues. *Bioresource Technology*, 234, 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.043>
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A., & Hernández-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2147–2153.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.034>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.052>
- Valdez-Vazquez, I., & Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *13*(5), 1000–1013. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.03.003>
- Vasudevan, N., & Rajaram, P. (2001). Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International*, *26*(5–6), 409–411. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00020-4)
- Voloshin, R. A., Rodionova, M. V., Zharmukhamedov, S. K., Nejat Veziroglu, T., & Allakhverdiev, S. I. (2016). Review: Biofuel production from plant and algal biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*, *41*(39), 17257–17273. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.084>
- 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), 92. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0092-5>
- Wu, H., Wang, C., Chen, P., He, A. Y., Xing, F. X., Kong, X. P., & Jiang, M. (2017). Effects of pH and ferrous iron on the coproduction of butanol and hydrogen by *Clostridium beijerinckii* IB4. *International Journal of Hydrogen Energy*, *42*(10), 6547–6555. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.094>
- Wuebbles, D. J., & Jain, A. K. (2001). Concerns about climate change and the role of fossil fuel use. *Fuel Process. Tech.*, *71*(1–3), 99–119. [https://doi.org/10.1016/S0378-3820\(01\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0378-3820(01)00139-4)
- Yang, X., Xu, M., & Yang, S. T. (2015). Metabolic and process engineering of *Clostridium cellulovorans* for biofuel production from cellulose. *Metabolic Engineering*, *32*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.09.001>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.097>
- Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, *24*(1), 5–12.
- Zhang, H., Bruns, M. A., & Logan, B. E. (2006). Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research*, *40*(4), 728–734. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.041>
- Zhang, M. L., Fan, Y. T., Xing, Y., Pan, C. M., Zhang, G. S., & Lay, J. J. (2007). Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *Biomass and Bioenergy*, *31*(4), 250–254.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2006.08.004>

Zhao, X., Xing, D., Fu, N., Liu, B., & Ren, N. (2011). Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. *Bioresource Technology*, *102*(18), 8432–8436. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.086>