



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE BACTERIAS FERMENTADORAS ABE DE SUELO RIZOSFÉRICO PARA PRODUCCIÓN DE SOLVENTES

Karol Tatiana Castro Tibabisco

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias**

Bogotá DC, Colombia

2025

EVALUACIÓN DE BACTERIAS FERMENTADORAS ABE DE SUELO RIZOSFÉRICO PARA PRODUCCIÓN DE SOLVENTES

Karol Tatiana Castro Tibabisco

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título

de:

Magister en MICROBIOLOGÍA

Director (a):

Carlos-Alberto Guerrero-Fajardo PhD Ing. Qca, PhD

Qca Catálisis.

Codirector (a):

Ivonne Maritza Campos Rincón

PhD Biotecnología

Línea de Investigación: Biotecnología: Aprovechamiento de recursos

Grupo de Investigación:

APRENA

Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Biotecnología IBUN

Bogotá, Colombia

2025

A mi abuela Elsa, a mi madre. mi tía y mis hermanas.

A todas las mujeres en quien nunca se creyó.

A las maltratadas, a las violentadas.

A aquellas para quienes la ciencia sólo se soñó

A las que sueñan con los ojos abiertos

*“Hay hombres que luchan un día y son buenos.
Hay otros que luchan un año y son mejores.
Hay quienes luchan muchos años, y son muy
buenos. Pero hay los que luchan toda la vida:
esos son los imprescindibles.”*

Berlolt Brech

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Karol Tatiana Castro Tibabisco

Fecha 14 de octubre de 2024

Agradecimientos

Al finalizar esta etapa de mi vida académica, quisiera expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que, de una u otra manera, hicieron posible la culminación de este proyecto.

En primer lugar, agradezco al multiverso por brindarme la oportunidad de conocer diferentes escenarios que me permitió la Universidad Nacional de Colombia.

A mi familia, por su comprensión y acompañamiento durante estos años.

A mi abuelita Elsa por enseñarme a creer en lo invisible, a creer en lo que se sueña.

A mis padres, por generar el valor del esfuerzo y la perseverancia.

Quiero agradecer a mi director de tesis, al Profesor Carlos Alberto Guerrero, por su guía, paciencia y apoyo a lo largo de este proceso.

Agradezco también a los profesores y tutores del programa de maestría, quienes con su dedicación y enseñanza me brindaron las herramientas necesarias para desarrollar este trabajo. Su enfoque académico y crítico fue fundamental para mi crecimiento profesional y personal, al profesor Mauricio Bernal que tuvo paciencia y tiempo me acogió en su laboratorio, mostrándome lo hermoso y complejo de este grupo de microorganismos.

Quiero extender mi gratitud a mis compañeros y amigos, quienes me acompañaron en esta travesía, compartiendo conocimientos, consejos.

Por último, quiero agradecer al grupo de investigación APRENA y al IBUN que me proporcionaron los recursos y el espacio necesarios para llevar a cabo mi investigación, así como al personal administrativo de la universidad, cuyo apoyo logístico fue crucial en momentos clave.

A todos ustedes, ¡gracias!

RESUMEN

Evaluación de bacterias fermentadoras ABE de suelo rizosférico para producción de solventes.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la producción de solventes (acetona, butanol y etanol) mediante fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) utilizando bacterias anaerobias aisladas de suelos rizosféricos de cultivo de papa *Solanum tuberosum*, a su vez se usaron residuos agroindustriales para evaluar la fermentación en los aislados y en 3 cepas de referencia conocidas. Se seleccionaron, se caracterizaron varias cepas, incluyendo *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium sacharoperaceticum* y *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, para su capacidad de producir solventes a partir de almidones extraídos de estos residuos agrícolas. La fermentación se realizó bajo condiciones anaerobias controladas, con una duración de 120 horas, cuantificándose los productos mediante cromatografía líquida (HPLC). Los resultados mostraron que el almidón de ñame fue el sustrato que generó mayores concentraciones de butanol, alcanzando hasta 4.5 g/L en las cepas más eficientes. Las cepas aisladas mostraron ser competitivas frente a las cepas de referencia, indicando el potencial de los residuos agrícolas como fuentes sostenibles para la producción de biocombustibles. Las conclusiones destacan la viabilidad de estos procesos en el contexto de la economía circular y la sostenibilidad industrial.

Palabras clave: Fermentación ABE, bacterias anaerobias, anaerobias facultativas, fuente de Carbono, almidones, aislamiento, papa, arracacha, ñame.

ABSTRACT

Evaluation of ABE-fermenting bacteria from rhizospheric soil for solvent production

This study aims to evaluate the production of solvents (acetone, butanol, and ethanol) through ABE (Acetone-Butanol-Ethanol) fermentation using anaerobic bacteria isolated from rhizospheric soils of potato crops (*Solanum tuberosum*). Additionally, agro-industrial residues were used to assess fermentation in the isolated strains as well as in three known reference strains. Several strains, including *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharoperaceticum*, and *Clostridium acetobutylicum*, were selected and characterized for their ability to produce solvents from starches extracted from these agricultural residues. The fermentation was carried out under controlled anaerobic conditions for 120 hours, with the products being quantified using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed that yam starch was the substrate that produced the highest concentrations of butanol, reaching up to 4.5 g/L in the most efficient strains. The isolated strains demonstrated competitiveness compared to the reference strains, indicating the potential of agricultural residues as sustainable sources for biofuel production. The conclusions highlight the feasibility of these processes in the context of the circular economy and industrial sustainability.

Keywords: ABE fermentation, anaerobic bacteria, carbon source, starches, isolation, potato, arracacha, yam.

CONTENIDO

Pág.

CONTENIDO	9
Lista de tablas	10
Lista de Símbolos y abreviaturas	12
INTRODUCCIÓN	13
Demanda energética y uso de combustibles fósiles	17
Impacto ambiental del uso de combustibles fósiles y sus consecuencias	19
Biocombustibles	20
Biobutanol a partir de microorganismos	23
Caracterización de suelos rizosféricos	26
Suelo rizosférico asociado a cultivo de papa <i>Solanum tuberosum</i>	29
Fermentación ABE	29
Condiciones para la fermentación ABE	35
Características de fermentadores ABE	38
OBJETIVOS	43
Objetivo general	43
Objetivos específicos	43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
HIPÓTESIS	44
Enfoque estadístico:	45
METODOLOGÍA	46
Aislamiento y tratamiento de muestras	46
Aislamiento de microorganismos cultivables de suelo rizosférico de <i>Solanum tuberosum</i>	46
Distribución de muestras el área de estudio	48
Extracción de almidones	50
Preparación de medios de cultivo	52

EVALUACIÓN DE BACTERIAS FERMENTADORAS ABE DE SUELO RIZOSFÉRICO PARA PRODUCCIÓN DE SOLVENTES

10	Siembra y cultivo de IDs y cepas de referencia.....	61
<hr/>		
	Resultados.....	67
	Análisis de Curvas de Crecimiento	90
	Análisis Comparativo de los Medios de Cultivo	101
	Construcción de la Base de Datos.....	109
	ANOVAs.....	110
	Análisis de tukey	115
8	Análisis de la producción de butanol sobre los IDs.....	118
9	Conclusiones y recomendaciones	130
A.	Anexo: Nombrar el anexo A de acuerdo con su contenido	132
	Bibliografía	135

Lista de tablas

Figura 1	Diagrama de fermentación ABE, acetogénesis, y solventogénesis	30
Figura 2	Ruta metabólica de Clostridium acetobutylicum tomado de Jones et al 2000 Acetone-Butanol Fermentation Revisited	33
Figura 3	Proceso de esporulación adaptada (Diallo, S.W.M, & Lopez Contreras, 2021)	41
Figura 4	Suelo usado para muestreo demarcación con estacas.....	46
Figura 5	Ejemplo zona de muestreo.....	48
Figura 6	Imagen explicativa de “método de cuarteo” tomado de (Monica J., 2010)	50
Figura 7	Almidones de papa, arracacha, ñame, yuca y batata respectivamente.	51
Figura 8	Medios de cultivo preparados con los diversos almidones en viales.....	52
Figura 9	Jarra de anaerobiosis, con ANEROGEN calculado según la cantidad de placas	63
Figura 10	Heatmap para pruebas bioquímicas de los IDs	73
Figura 11	Algunas fotografías de las tinciones de gran, realizadas	75
Figura 12	Crecimiento de colonias en placa en jarra de anaerobiosis a 37°C durante 24h.....	76
Figura 13	Ejemplos de algunos aislados para bioquímicas, positivo para hidrolisis de la gelatina	76
Figura 14	Producción de ButOH en cepas de referencia con glucosa	77
Figura 15	Producción de ButOH en cepas de referencia con los medios de cultivo con diversos almidones.....	79
Figura 16	Producción de butanol del Id M1 seleccionados para los procesos de fermentación por medio de cultivo	86
Figura 17	Producción de butanol del Id M5 seleccionados para los procesos de fermentación por medio de cultivo.	87
Figura 18	Producción de butanol del Id series P (P2 – P4) seleccionados para los procesos de fermentación por medio de cultivo.....	87
Figura 19	Producción de butanol del Id P6 seleccionados para los procesos de fermentación por medio de cultivo.	88
Figura 20	Curvas de crecimiento de los Id A comparados con las cepas de referenci.....	92
Figura 21	Curvas de crecimiento del Id A7 comparada con las cepas de referencia	93
Figura 22	Curvas de crecimiento de los Id M1 – M2 comparada con las cepas de referencia ..	94

Contenido	11
Figura 23 Curvas de crecimiento del Id M3 = M4 = M5 comparada con las cepas de referencia	94
Figura 24 Curvas de crecimiento del Id P2 comparada con las cepas de referencia	95
Figura 25 Curva de crecimiento del Id P6 comparada con las cepas de referencia	95
Figura 26 Comparación entre IDs de la serie A, serie M, serie P con glucosa como medio de cultivo	102
Figura 27 Comparación entre IDs de la serie A (aislados A), serie M (aislados M), serie P (aislados P) con papa como almidón en el medio de cultivo	104
Figura 28 Comparación entre IDs de la serie A (aislados A), serie M (aislados M), serie P (aislados P) con arracacha como almidón en el medio de cultivo	106
Figura 29 Comparación entre IDs de la serie A (aislados A), serie M (aislados M), serie P (aislados P) con ñame como almidón en el medio de cultivo	106
Figura 30 Comparación entre IDs de la serie A (aislados A), serie M (aislados M), serie P (aislados P) con batata como almidón en el medio de cultivo	108
Figura 31 Resultados del estadístico usado para indicar relaciones entre variables	110
Figura 32 Boxplot densidad óptica por fuente de carbono y cepa	112
Figura 33 Intervalos de confianza de Tukey para fuentes de Carbono y densidad óptica	116
Figura 34 Boxplot de producción de butanol a las 96h por fuente de Carbono	121
Tabla 1 Relación de las pruebas bioquímicas realizadas a todos los IDs de los aislados en genera	67
Tabla 2 Relación de pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de referencia	74
Tabla 3 Clasificación de gran para los IDs escogidos	74
Tabla 4 Concentración final de butanol (g/L) y rendimiento Yp/s (g butanol/g sustrato) para las cepas	80
Tabla 5 Resultados de la prueba de normalidad Shapiro Wilk	119

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
A	Área	m^2	$\iint dx dy$
t°	Temperatura	$^\circ C$	Unidad de medida
UFC	Unidades Formadores de Colonias	NA	Concentración bacteriana

Abreviaturas

Abreviatura	Término
$C\ sach$	<i>Clostridium sacharoperbutylaceticum</i>
$C\ acet$	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824
$C\ beij$	<i>Clostridium beijerinckii</i>

INTRODUCCIÓN

Con el avance de la industrialización y el constante aumento de la población, la demanda energética crece a un ritmo acelerado, y los combustibles fósiles como el carbón, el gas natural y el petróleo continúan siendo los más utilizados (Guancha, Realpe-, & García-, 2021)

Entre ellos, el petróleo se destaca por su elevado consumo global, alcanzando una cifra de aproximadamente 336 millones de litros diarios. No obstante, el uso de estos combustibles contribuye de manera significativa al incremento de la contaminación ambiental y la emisión de gases de efecto invernadero, tales como el CO₂, CH₄ y CO. Ante este escenario, factores como la incertidumbre sobre la durabilidad de las reservas de estos recursos en la Tierra y sus efectos negativos sobre el ambiente han impulsado la búsqueda y desarrollo de fuentes de energía renovables que puedan servir como alternativas sostenibles al petróleo.

La biomasa se puede definir como la colección de toda la materia orgánica que compone los organismos biológicos, los principales componentes utilizados para la producción de biocombustibles son los azúcares (almidón, azúcares simples y lignocelulosa) y los lípidos. En el mundo hay una producción de residuos agroindustriales que sobrepasa el 30% de los desechos generados anualmente, éstos no son procesados de la manera correcta, lo que genera consecuencias negativas en la calidad del ambiente por la producción de gases de efecto invernadero y gasto energético para introducir de manera rápida los subproductos a los diferentes ciclos biogeoquímicos.

La recuperación de bacterias anaerobias de suelo ha permitido conocer cada vez más los procesos que allí ocurren, como la descomposición de macromoléculas, hidrólisis, acetogénesis, y metanogénesis., todos éstos a partir de compuestos orgánicos que generan la energía necesaria para completar su metabolismo; que liberan a su vez productos ácidos que hacen parte del ecosistema de suelo y su regulación.

La fermentación de acetona-butanol-etanol ABE es un proceso bifásico que involucra la fermentación bacteriana que convierte los carbohidratos como el almidón y la glucosa en ácidos (acetato y butirato) y solventes (acetona, n-butanol, etanol) a través de una serie de reacciones de hidrólisis y reducción. Las bacterias asociadas a menudo a este proceso son un grupo específico dentro del amplio y ubicuo género *Clostridium*; microorganismos en forma de bastoncillo, grampositivos y anaerobios estrictos o facultativos que, durante la acidogénesis, los carbohidratos se despolimerizan en compuestos solubles mediante enzimas hidrolíticas y se fermentan en ácidos grasos volátiles. A medida que el pH disminuye, el metabolismo cambia a la solventogénesis y los ácidos se asimilan a los solventes ABE, que son producidos por las bacterias variando su concentración de acuerdo con la especie y las fuentes de Carbono iniciales relacionadas con el medio de fermentación. (Kamla, y otros, 2024)

El suelo está constituido por minerales de varios tamaños, formas y características químicas, raíces de plantas, población de organismos vivos (microorganismos) y materia orgánica en varias etapas de descomposición. Cada factor físico y químico del suelo influye en el crecimiento o actividad de los microorganismos. Las bacterias que promueven el crecimiento vegetal lo hacen por diferentes mecanismos como la solubilización de fósforo y la síntesis de ácido indolacético. Sin embargo, son bien estudiadas las bacterias que pueden tener una actividad en los suelos más importante, por ejemplo, actividad fungicidas, o la producción de 1 - 3 propanodiol, que ha sido datada en bacterias como *Klebsiella sp*, *Citrobacter sp*, *E coli*, *Lactobacillus sp*.

Se han identificado especies como *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum*, y *C. Saccharoperbutylacetonicum* aisladas de suelos que exponen un alto rendimiento usando insumos de bajo costo para su proceso metabólico y generación de etanol, acetona y butanol en porcentajes variados, regulados por singularidades de cada bacteria (Cárdenas, y otros, 2007)

Una de las cepas destacada es *C. beijerinckii* quien realiza el proceso en dos etapas factibles., *C. butyricum* genera la producción de ácido butírico a partir de glucosa además ácido acético, CO₂ y H₂. (Cárdenas, y otros, 2007)

Las materias primas tradicionales para la producción de butanol incluyen principalmente cultivos ricos en almidón, como el maíz y el trigo. En el siglo XXI, debido a la escasez y el aumento de los precios de los recursos de cereales, la exploración de materiales de bajo costo no derivados de cereales para reemplazar los materiales a base de cereales para la fermentación del butanol se ha convertido en un foco de investigación. En la actualidad, los materiales de bajo costo más investigados incluyen materiales amiláceos no derivados de cereales, materiales lignocelulósicos y melaza.

Demanda energética y uso de combustibles fósiles

Con el avance de la industrialización y el constante aumento de la población, la demanda energética crece a un ritmo acelerado. A nivel global, el consumo de combustibles fósiles sigue siendo predominante, con el petróleo representando cerca del 31% del suministro de energía primaria mundial en 2022 (IEA, 2023). Se estima que el consumo de petróleo alcanzó aproximadamente 336 millones de litros diarios en 2021 ((BP), 2022)

Sin embargo, el uso masivo de estos combustibles contribuye significativamente a la emisión de gases de efecto invernadero como CO_2 , CH_4 y CO los cuales son responsables del cambio climático y la degradación ambiental (IPCC, 2021). En 2022, las emisiones globales de CO_2 provenientes de combustibles fósiles alcanzaron las 36,8 gigatoneladas, mostrando un incremento del 0,9% respecto a 2021, impulsado principalmente por el aumento en el consumo de gas natural y carbón. (Global Carbon Budget , 2023)

Según la Agencia Internacional de Energía (IEA), el biobutanol ha sido identificado como un biocombustible prometedor debido a su alta densidad energética y compatibilidad con infraestructuras de combustibles existentes. Al referirse a las materias históricamente usadas para la producción de biocombustibles se mencionan materiales como la leña, que ha sido utilizada para calentar o cocinar alimentos, este uso esta mediado por una reacción de oxidación rápida dada por moléculas de bicarbonato junto con O_2 , de esta manera la madera debe pasar por un pretratamiento de secado para disminuir su humedad, para ser usada como fuente de calor, lo que desafortunadamente produce humos negros, que son mezclas de vapor de agua, compuestos volátiles, o CO que no son positivas para el proceso de calentamiento del planeta. (IRENA, 2023)

El carbón ha sido ampliamente usado para generación de energía, inicialmente por procesos de pirolisis por la transformación de madera a carbón vegetal, entre muchos de los usos de éste, se encontraba la metalurgia para fundir minerales de Cu y Fe. Durante los años 30's y la Segunda Guerra Mundial en Europa cuando la gasolina era escasa, muchos automóviles funcionaban con gas de madera, una mezcla de CO e H₂ generados por la quema parcial carbón vegetal en un gasificador. Hoy en día el carbón vegetal sigue siendo un producto valioso utilizado para cocinar, hacer barbacoas, calentar, purificar el aire y el agua, dibujo artístico y fabricación de acero. (Overend, 2000)

Generalmente los biocombustibles son generados para producir luz y calor, entre menor impacto ambiental y financiero tengan entran en el mercado reemplazando materias como la madera, petróleo, aceite vegetal y carbón. (Guo, Weiping , & Buhain , 2015)

Del consumo total de la energía mundial, solo el 13% corresponde a energía renovable y solo un pequeño porcentaje de este valor se trata de bioenergía generada a partir de biomasa. Esta biomasa puede ser aprovechada de residuos; lignocelulósica, productos de actividad agricultora, forestal y agroindustrial, los denominados biocombustibles de primera generación, que requieren del uso de suelo para cosechas específicas que serán usadas para la bioconversión. (Kamla, y otros, 2024)

Los biocombustibles de segunda generación en los que no se usan directamente los productos de las cosechas, sino los residuos generados son una buena alternativa para producirlos. El biobutanol es una alternativa creciente ya que puede ayudar a reducir las emisiones de carbono y comparado con el etanol tiene un alto contenido energético, baja presión de vapor y adicionalmente puede ser mezclado con gasolina o diésel en diferentes fracciones y es compatible con los motores actuales sin necesidad de reacondicionamiento (Kamla, y otros, 2024). El butanol tiene un alto poder calorífico (29,2 MJ/dm), bajo calor de vaporización (0,43 MJ/kg) y es menos corrosivo en comparación con el etanol. El butanol tiene muchos usos industriales, incluido su uso en motores de gasolina, lubricantes, líquidos de frenos y la síntesis de plásticos, polímeros y caucho sintético. (Kamla, y otros, 2024)

Impacto ambiental del uso de combustibles fósiles y sus consecuencias

La quema de combustibles fósiles libera una variedad de contaminantes atmosféricos que representan riesgos significativos para la salud. Entre estos contaminantes se encuentran el dióxido de carbono (CO_2), el monóxido de carbono (CO), el dióxido de azufre (SO_2) y los óxidos de nitrógeno (NO_x), que contribuyen al smog y la lluvia ácida. La exposición a estos contaminantes está asociada con enfermedades respiratorias y cardiovasculares, así como con un aumento en la mortalidad prematura. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en 2019 se registraron aproximadamente 380,000 muertes prematuras en las Américas atribuibles a la contaminación del aire. Además, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado el humo diésel como carcinógeno para los humanos, vinculándolo directamente con un mayor riesgo de cáncer de pulmón. (Tiotiu, y otros, 2020)

En el mismo sentido, la extracción de combustibles fósiles, incluyendo actividades como la minería de carbón y la perforación petrolera, provoca la destrucción de hábitats naturales, lo que conduce a la pérdida de biodiversidad. Estas actividades pueden contaminar cuerpos de agua y suelos, afectando negativamente a las comunidades locales y la fauna silvestre. Además, la fragmentación de hábitats resultante de la construcción de infraestructuras asociadas, como carreteras y oleoductos, interfiere en los patrones migratorios de las especies y reduce la conectividad entre poblaciones, aumentando su vulnerabilidad. (World Wildlife Fund, 2024)

La producción de biocombustibles, específicamente mediante la fermentación ABE (acetona-butanol-etanol), ofrece varias ventajas económicas:

- **Diversificación de fuentes energéticas:** La dependencia de los combustibles fósiles ha generado vulnerabilidades económicas debido a la volatilidad de los precios y la concentración geográfica de las reservas. La adopción de biocombustibles permite diversificar las fuentes de energía, reduciendo riesgos asociados a fluctuaciones en los mercados internacionales.
- **Desarrollo rural y generación de empleo:** La producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica, como residuos agrícolas, puede impulsar

economías locales, creando oportunidades laborales en zonas rurales y promoviendo el desarrollo sostenible (IRENA Agency, 2023)

- **Reducción de emisiones y cumplimiento de normativas:** Los biocombustibles generan menores emisiones de gases de efecto invernadero en comparación con los combustibles fósiles, lo que ayuda a las naciones a cumplir con acuerdos internacionales y evitar sanciones económicas. (IRENA Agency, 2023)

Implicaciones geopolíticas de los biocombustibles ABE

La integración de biocombustibles en la matriz energética también tiene repercusiones geopolíticas:

- **Reducción de la dependencia energética:** Países importadores de petróleo pueden disminuir su dependencia de naciones exportadoras al producir biocombustibles localmente, fortaleciendo su seguridad energética.
- **Nuevas alianzas y mercados:** La creciente demanda de biocombustibles puede fomentar alianzas entre países productores y consumidores, alterando dinámicas geopolíticas tradicionales y abriendo nuevos mercados.
- **Competencia por recursos naturales:** La expansión de cultivos energéticos para la producción de biocombustibles podría generar competencia por tierras agrícolas, afectando la seguridad alimentaria y provocando tensiones internacionales. (IRENA Agency, 2023)

Biocombustibles

En la actualidad, representan aproximadamente el 3% del combustible total utilizado para el transporte por carretera a nivel mundial, y se proyecta que para el año 2050 podrían suplir cerca del 30% de la demanda global de combustibles para este sector (FAO, 2015)

Por otro lado, la Agencia Internacional de Energía estima que los biocombustibles para el transporte en 2050 podrían potencialmente conducir a una reducción de casi el 5 % en el CO₂ relacionado con las emisiones, no obstante, la materia prima para los biocombustibles proviene de lugares en donde la agricultura es sumamente creciente. El nexo entre alimentos y energía presenta varios desafíos, que van desde el uso conflictivo de los recursos naturales recursos para hacer frente a los aumentos de precios hasta el costo energético y de recurso hídrico que pueda generar impacto ambiental. (FAO, 2015)

Desde un enfoque tecnológico, los biocombustibles se clasifican en tres generaciones, cada una basada en la naturaleza de la biomasa utilizada como materia prima:

Biocombustibles de primera generación: Se obtienen de cultivos alimentarios como maíz, caña de azúcar, colza y palma aceitera. Aunque son los más utilizados en la actualidad, presentan desafíos significativos en términos de competencia con la producción de alimentos y posible impacto ambiental negativo debido a la expansión agrícola (Alam & Tanveer, 2020)

Biocombustibles de segunda generación: Se producen a partir de residuos agrícolas, biomasa lignocelulósica y residuos sólidos urbanos, lo que permite una mayor sostenibilidad. Sin embargo, su producción aún no está ampliamente implementada debido a los costos asociados con el procesamiento de la biomasa y la necesidad de enzimas especializadas (Guo et al., 2015).

Biocombustibles de tercera generación: Derivan principalmente de microalgas y microorganismos modificados genéticamente, los cuales han demostrado mayor eficiencia en la producción de lípidos y otros precursores para biocombustibles avanzados (Kamla et al., 2024).

Los procesos de conversión para biocombustibles de segunda generación pueden ser termoquímicos o bioquímicos; los procesos termoquímicos convierten la biomasa mediante descomposición térmica y reformación química, utilizando calor en presencia de diferentes concentraciones de oxígeno mientras que los procesos bioquímicos se centran en los polisacáridos. Estos procesos pueden incluir la gasificación de la biomasa para producir gas de síntesis, que luego se transforma en combustibles líquidos mediante síntesis de Fischer-Tropsch. También se puede utilizar la hidrólisis para extraer azúcares de la

biomasa lignocelulósica, que luego se fermentan en etanol, acetona o butanol. (Naik, V. Goud , & Prasant , 2010)

Los biocombustibles de tercera generación se derivan de algas, que son microorganismos fotosintéticos que convierten la luz solar, el agua y el dióxido de carbono en lípidos. Las algas tienen altas tasas de crecimiento y pueden crecer en diversas condiciones ambientales, incluso en aguas salinas de baja calidad. Además, tienen una alta capacidad de fijación de CO₂, lo que las hace útiles para reducir las emisiones de dióxido de carbono de las centrales eléctricas y otras industrias. Las algas sintetizan ácidos grasos para la esterificación de lípidos de membrana a base de glicerol, que constituyen una parte significativa de su peso celular seco. El aceite de algunas especies de algas puede superar el 80% de su peso seco. (Naik, V. Goud , & Prasant , 2010)

Actualmente se generan productos como el biodiesel, uno de los productos más reconocidos actualmente para la generación de combustibles alternativos a los de residuos fósiles. A este se le une el bioetanol y el biobutanol que han surgido como alternativas que se mantienen gracias a la biorrefinería

El bioetanol ha evolucionado como una fuente potencial para la producción de biocombustibles a nivel mundial, para la producción de este se emplea azúcar, almidón, biomasa lignocelulósica; diferentes residuos agrícolas, hojas, desperdicios de madera, residuos de bosques, desperdicios sólidos y biomásas celulósicas comunes (residuos de cultivos como trigo, arroz, paja, hojas, tallos y mazorcas de maíz, bagazo de caña de azúcar). No obstante, de manera indirecta este tipo de alternativas para generar biocombustibles representa una preocupación que a gran escala puede verse reflejada en la explotación indiscriminada de recursos para producir dicho solvente.

Tabla 1 Proceso general de tratamiento para producción de biocombustible segunda generación adaptado (Md. Saiful Alam & Dr. Sifat Tanveer, 2020)



Las propiedades fisicoquímicas del bioetanol y el etanol son prácticamente idénticas, dado que su estructura química es la misma. Sin embargo, al compararlo con la gasolina, el bioetanol presenta ciertas diferencias en parámetros clave, como menor densidad (kg/l), menor poder calorífico, mayor punto de inflamabilidad y un índice de octanaje superior. Estas propiedades influyen en su viabilidad como biocombustible alternativo en motores de combustión interna. Actualmente, el bioetanol se utiliza como aditivo oxigenante en la gasolina para mejorar su índice de octanaje, reemplazando al metil-terbutil éter (MTBE), un compuesto con alta toxicidad y potencial contaminante de cuerpos de agua subterránea. No obstante, debido a su menor contenido energético en comparación con la gasolina, el bioetanol no se emplea exclusivamente como combustible primario en motores convencionales, sino que también se integra en formulaciones de biodiésel para mejorar su combustión y reducir emisiones contaminantes. (Suárez-Bertoa, Zardini, & Keuken, 2015)

La fermentación ABE es un proceso que utiliza la fermentación bacteriana para producir tres disolventes, acetona, n-butanol y etanol, a partir de carbohidratos como el almidón y la glucosa. La fermentación ABE produce disolventes en una proporción de tres partes de acetona ($\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{CH}_3$), seis partes de butanol ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{OH}$), y una parte de etanol ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{OH}$). (Durre, 2007)

Sin embargo, los procesos tradicionales de fermentación de butanol tienen algunos importantes desafíos, y estos se enumeran aquí:

- Aumentos en costos operativos debido al alto costo de la materia prima.
- Alto costo de recuperación debido al bajo rendimiento de producción.
- Mayores costos de capital y operativos debido al bajo volumen productividad.
- Alto coste de recuperación del producto con destilación convencional procesos.

Biobutanol a partir de microorganismos

El butanol es un alcohol de 4 Carbonos con 3 isómeros; n – butanol, 2 – butanol, iso- butanol, ter-butanol, cada uno tiene distintos usos en la industria alimentaria y farmacéutica, sin embargo, el n-butanol es aquel que comparado con el etanol puede tener

propiedades importantes a la hora de ser usado como combustible su generación se puede dar a través de reacciones termoquímicas que incluyan catalizadores de combustibles fósiles.

El estudio de los microorganismos fermentadores ABE, se remonta a los primeros aislamientos realizados por Weizman a principios del siglo XX. A partir de estos aislamientos de microorganismos se describen *S.cerevisiae*, *C.tyrobutyricum*, *E.coli* Bw2V, *C.acetobutylicum*. Posteriormente, al identificar parte del género *Clostridium* como generadores de solventes por medio de la ruta de fermentación ABE, se han descrito múltiples especies que completan de manera indirecta el estudio sobre necesidad de fuentes de Carbono y Nitrógeno que impulsen la producción en concentraciones que puedan ser separadas de los medios. Los hallazgos iniciales para la producción de solventes sugerían que el sustrato con mejores resultados eran la glucosa, con diferencias evidentes entre la fermentación, de tipo continua, discontinua, cerrada y abierta, y almidones de diferentes tipos con hidrolizados. (Rao, Sathiavelu, & Mythili, 2016)

No obstante, el uso de varios de estos microorganismos es priorizado por injertos o modificaciones génicas que permiten ciertas características en las bacterias, no solo en términos de producción sino de sobrevivencia a cambios abruptos de pH. En el caso de los clostridios fermentadores ABE regulados principalmente por la producción de metabolitos acorde con los cambios de pH, han sido descritos ampliamente, en concordancia se destacan sus dos fases, y manipuladas genéticamente tras procesos de metilación in vivo con cepas huésped carecen de la restricción muy activa varias enzimas de tipo endonucleasas. Las estrategias usadas para la aumentar producción de butanol son alteración de las rutas del butirato, acetona, lactato y acetato; la tecnología de plásmidos integracionales usando plásmidos replicantes y no replicantes para la sobreexpresión del gen *Adc*; tecnología de RNA antisentido usada para el silenciamiento de genes. (Rao, Sathiavelu, & Mythili, 2016)

El modelo de *Escherichia coli* en la producción de solventes ha sido utilizado como referencia para establecer comparaciones con otros microorganismos. En estos estudios, se ha analizado una mutación en el factor de transcripción del receptor *cAMP*, la cual confiere a *E. coli* una mayor tolerancia al iso-butanol, permitiendo su acumulación en el

medio de cultivo en concentraciones más elevadas. Además, se han aislado cianobacterias capaces de utilizar CO₂ como única fuente de carbono para la producción de biocombustibles. Un ejemplo destacado es *Synechococcus elongatus* PCC7942, la cual ha demostrado ser eficiente en la síntesis de etanol, n-butanol y 2,3-butanodiol, alcanzando una concentración de 14.5 mg/l de n-butanol. (Geng & Rongrong , 2015)

Por otro lado, en comparación con los procesos mediados por NADPH en *Clostridium beijerinckii*, este microorganismo puede producir hasta 29.9 mg/l de n-butanol, aunque su rendimiento se ve limitado por la toxicidad del solvente. En el caso del butanodiol, se ha propuesto una vía metabólica que coincide con la de las cianobacterias, logrando una producción de 2.38 g/l, lo que representa una concentración elevada mediante rutas metabólicas exógenas. (Geng & Rongrong , 2015)

Diversos estudios han demostrado el potencial de bacterias anaerobias para la producción eficiente de biocombustibles. *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485 ha sido modificada mediante ingeniería metabólica para optimizar la fermentación de xilosa, logrando una producción de 0.85 g/l de n-butanol a partir de 10 g/l de sustrato, lo que resalta su capacidad para generar solventes de alto valor energético en condiciones termófilas (Shao, y otros, 2011). Por otro lado, *Klebsiella pneumoniae* ha sido objeto de modificaciones genéticas orientadas a mejorar la producción de 1-butanol, 2-butanol, butanodiol, propanodiol, etanol e H₂, utilizando glicerol como única fuente de carbono. A partir de estas optimizaciones en la ruta CoA-dependiente y en la vía de cetoácidos, se ha reportado una producción de 15.03 mg/l de 1-butanol, con una productividad específica de 27.79 mg de butanol/g de célula, demostrando la viabilidad de esta cepa en la bioconversión de glicerol residual en compuestos de interés energético (Jung, Moo-Young , & Min-, 2015). Adicionalmente, estudios en cepas modificadas han permitido incrementar la producción de 2-butanol hasta 320 mg/l, lo que representa un avance significativo en la utilización de *Klebsiella pneumoniae* para la síntesis de biocombustibles avanzados.

Como anaerobia facultativa la bacteria *Geobacillus termoglucosidasius* bacilos grampositivos y formadores de endosporas son capaces de crecer entre 40°C y 70°C, ha sido descrita para la producción de butanol, e iso-butanol iniciando a partir de la glucosa con concentraciones de 3,3 g/l, a una temperatura óptima de 50°C.

Dentro de las arqueas también se encuentra el *Pyrococcus furiosus* de forma cocoidal flagelados, cuyos productos metabólicos son CO₂ y H₂, diseñado para la super producción de butanol, en temperaturas elevadas, con la expresión del gen del lactato deshidrogenasa para la producción de 3-hidroxipropionato utilizado como electro combustible a partir de H₂. La Producción de butanol en este mismo sentido se han estudiado a partir de procesos de clonación con *Thermoanaerobacter tengcongensis* y de *Spirochaete thermophila* para mejorar las 3 primeras reacciones acetil CoA. la producción de 1-butanol y 2 butanol fueron 70 mg/l y 15 mg/l después de 48 horas de ingeniería genética a una temperatura de 60°C. (Rao, Sathiavelu, & Mythili, 2016)

Caracterización de suelos rizosféricos

La rizosfera es el área del suelo que rodea inmediatamente a las raíces de una planta, y está influenciada tanto por los exudados radiculares como por los microorganismos asociados. En la rizosfera se distinguen tres componentes que, aunque separados, interactúan estrechamente: la rizosfera propiamente dicha, el rizoplano y la raíz misma. La rizosfera es la zona del suelo afectada por las raíces, debido a la liberación de compuestos que impactan en la actividad microbiana. El rizoplano, por su parte es la superficie de la raíz, incluyendo las partículas de suelo que permanecen firmemente adheridas a ella. Finalmente, la propia raíz forma parte del sistema, ya que algunos microorganismos, como los endófitos, pueden colonizar los tejidos radiculares. (Barea, Pozo, & Azcón, 2005)

Estudios recientes destacan que la composición microbiana de la rizosfera varía significativamente dependiendo del tipo de cultivo y las condiciones del suelo. Los exudados radiculares específicos de cada planta juegan un papel clave en la selección de las comunidades microbianas en esta región (Dennis, Miller, & Hirsch, 2010)

Por ejemplo, en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus sp* han mostrado ser predominantes, actuando como promotoras del crecimiento vegetal y mejorando la resistencia de las plantas a estres bióticos y abióticos. La actividad microbiana de la rizosfera es crucial para el crecimiento, salud y mantenimiento de las plantas porque ayuda a la absorción de nutrientes y proporciona defensa contra los patógenos. Las interacciones planta-microbio, regidas por los exudados de las raíces a través de la respuesta quimiotáctica de los microorganismos hacia los compuestos orgánicos secretados por las raíces, desempeñan un papel importante en la colonización de las raíces y las actividades de control biológico (antifúngico, antibacteriano y antiviral) (Patel, Patel, & Panchal, 2022)

El compartimento del suelo que rodea inmediatamente la raíz de la planta contiene una cantidad significativamente mayor de microorganismos que el suelo en masa sin raíces. Un subconjunto de bacterias de la rizosfera que pueden colonizar el entorno de la raíz se denomina rizobacterias. (Philippot L. , Raaijmakers, Lemanceau, & van der Putten , 2013)

Las bacterias colonizadoras de la rizosfera (PGPR) se reconocen al tener la capacidad de colonizar la raíz, mantener su metabolismo generando microhábitats asociados a la raíz, con relaciones interespecíficas y al ser promotoras de crecimiento de las plantas. Las PGPR participan en muchos procesos ecosistémicos importantes como el control biológico de patógenos de plantas, el ciclo de nutrientes y el crecimiento de plántulas. De tal manera, los mecanismos que usan son directos e indirectos, ocurriendo dentro o fuera de la planta, respectivamente. En este sentido, el uso de microorganismos aislados de suelos para la fermentación de residuos de tubérculos representa una estrategia innovadora y sostenible en la producción de biocombustibles y otros compuestos de valor agregado. A continuación, se presentan las principales razones que sustentan esta aplicación:

Adaptación Natural a la Materia Orgánica Compleja

Los suelos, especialmente aquellos ricos en materia orgánica contienen una diversidad de microorganismos especializados en la degradación de polisacáridos complejos, como el almidón y la celulosa, que están presentes en grandes cantidades en los residuos de

tubérculos (Rusănescu, Cioban, Rusănescu, & Dinculoiu, 2024). Los aislados de suelo tienen enzimas hidrolíticas activas, como amilasas, celulasas y pectinasas, que facilitan la conversión eficiente de los tubérculos en azúcares fermentables, mejorando el rendimiento del proceso fermentativo (Krueger, y otros, 2012)

1. Diversidad Metabólica para la Producción de Biocombustibles

Los microorganismos del suelo han evolucionado para utilizar diferentes fuentes de carbono, lo que los hace altamente versátiles en procesos fermentativos. Ciertas bacterias anaerobias aisladas de suelos agrícolas han demostrado alta eficiencia en la conversión de residuos de tubérculos en bioetanol y biobutanol, superando a cepas modelo como *Saccharomyces cerevisiae* y *Clostridium beijerinckii* en algunos casos (Adegboye, Ojuederie, Talia, & Babalola, 2021)

2. Reducción de Costos y Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales

El uso de residuos de tubérculos como sustrato de fermentación reduce la dependencia de azúcares refinados, lo que disminuye los costos de producción y contribuye a la economía circular. Los residuos de papa, yuca y batata contienen hasta un 70% de almidón, lo que los convierte en una fuente rica en carbono para la fermentación (Mahish, Kumar Verma, Verma, Arora, & Otero, 2024)

3. Potencial para la Biorremediación y Valor Agregado

Algunos aislados de suelo no solo fermentan los residuos de tubérculos, sino que también pueden biodegradar contaminantes o producir compuestos de valor, como ácidos orgánicos, enzimas industriales y polímeros biodegradables. El uso de microorganismos nativos del suelo evita la introducción de cepas foráneas, lo que minimiza riesgos ecológicos y promueve un enfoque de fermentación sostenible y basado en recursos locales (Mahish, Kumar Verma, Verma, Arora, & Otero, 2024)

Suelo rizosférico asociado a cultivo de papa *Solanum tuberosum*

El aislamiento de bacterias anaerobias de los suelos asociados al cultivo de papa puede proporcionar beneficios significativos para la agricultura sostenible. Estas bacterias pueden mejorar la disponibilidad de nutrientes clave en suelos de baja oxigenación, mejorar la estructura del suelo y aumentar la eficiencia en el uso de fertilizantes, reduciendo la necesidad de insumos externos. (Philippot L., Raaijmakers, Lemanceau, & Putten, 2013) Además, su rol en la descomposición de materia orgánica puede contribuir a la acumulación de materia orgánica en el suelo, un indicador clave de la calidad del suelo y su capacidad para retener agua y nutrientes.

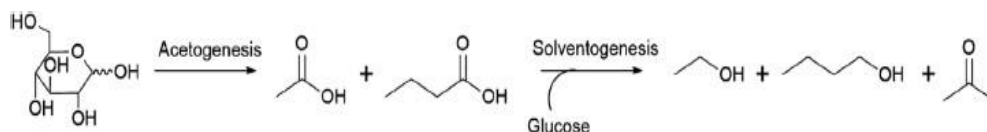
Algunas investigaciones han demostrado que las bacterias anaerobias también pueden desempeñar un papel en la promoción del crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas y la supresión de patógenos del suelo, lo que puede reducir la incidencia de enfermedades en el cultivo de papa. Por lo tanto, su estudio y aislamiento pueden abrir nuevas vías para el desarrollo de bio-inoculantes y estrategias de manejo integrado de plagas que reduzcan el uso de agroquímicos. (Berendsen, Pieterse, & Bakker, 2012)

Fermentación ABE

Los procesos fermentativos de bacterias anaerobias se pueden relacionar con 3 etapas, en la primera ocurre la hidrólisis y la fermentación, la segunda ocurre la acetogénesis y por último la metanogénesis. (Corrales, Antolinez Romero, & Bohórquez Macías, 2015)

Es un proceso bifásico que a partir de azúcares se producen ácidos (acetato, butirato) y solventes (acetona, butanol, etanol)

Figura 1 Diagrama de fermentación ABE, acetogénesis, y solventogénesis



Los sustratos de azúcar se transforman en los ácidos orgánicos ácido acético y butírico. Posteriormente, el azúcar adicional y los ácidos formados se convierten en una mezcla de acetona, butanol y etanol, dependientes de la concentración celular hallada en los medios de cultivo.

Las fermentaciones ABE convencionales producen mezclas de productos que contienen acetona: butanol: etanol en una proporción de 3:6:1 en volumen, con rendimientos de alrededor de 0,3–0,35 g de producto por g de glucosa alcanzados típicamente (= 0,18– 0,21 g iso-butanol por g de glucosa, 0,44–0,51 mol/mol) (Ewing, y otros, 2022)

El butanol se utiliza como precursor del acetato de butilo, que se utilizaba como disolvente para lacas de automóviles. Inicialmente, las plantas de ABE utilizaban almidón (principalmente de maíz), que se puede hidrolizar a glucosa mediante el uso de diversas cepas *Clostridium*, como materia prima para la fermentación. Tras el descubrimiento de cepas capaces de metabolizar la sacarosa: en la década de 1930, la melaza que contenía azúcar se convirtió en el sustrato preferido. El auge de la industria petroquímica provocó el cierre de la mayoría de las plantas de ABE en las décadas de 1950 y 1960, aunque se sabe que la fermentación industrial de ABE continuó hasta la década de 1980 en Sudáfrica y la URSS y hasta la década de 1990 en China. El proceso industrial tradicional de fermentación ABE se realizó fermentando directamente la materia prima (puré de maíz o melaza) utilizando *Clostridium sp* bajo una atmósfera de CO₂ durante 2-3 días a temperaturas que oscilan entre aprox. 30 y 40 °C. (Ewing, y otros, 2022)

Actualmente se siguen buscando materias primas y rutas alternas que puedan ser activadas en diversos microorganismos para aislamiento de aminoácidos, terpenos, amins, ácidos acéticos, ácido propiónico, ácido butírico, ácido iso-butírico, ácido valérico, ácido iso-valérico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido láctico, ácido málico, entre otros. Esta búsqueda se mantiene a partir de la biomasa más apta para iniciar la ruta, que

condiciones deben tener los microorganismos para mantener dichas condiciones, y por supuesto que la biomasa promueva alternativas de una economía circular que permita aprovechar la biomasa para distintos procesos.

Clostridium acetobutylicum genera piruvato a través de la vía Embden-Meyerhof- Parnas (EMP) y luego produce acetil-CoA bajo la acción de la ferredoxina oxidoreductasa, acompañada de la generación de CO₂ y H₂. El proceso de generación de ABE a partir de acetil-CoA se divide en la fase acidogénica y la fase solventogénica.

En la fermentación ABE, el *Clostridium acetobutylicum* sigue dos fases metabólicas principales:

Fase acidogénica: En esta fase, se producen principalmente ácido acético y ácido butírico. La bacteria descompone los azúcares mediante la glicólisis, generando piruvato, que luego se convierte en acetil-CoA a través de la enzima piruvato-ferredoxina oxidoreductasa. El acetil-CoA es un punto clave en la bifurcación metabólica hacia la producción de ácidos grasos volátiles (ácido acético y butírico) mediante la ruta de la tiolasa, o hacia la formación de subproductos como hidrógeno H₂ y CO₂.

Esta fase coincide con el crecimiento logarítmico de la célula y genera ATP, lo que proporciona energía para el crecimiento. La síntesis de ácido acético es controlada por las enzimas fosfato acetiltransferasa y acetato quinasa, mientras que la de ácido butírico está regulada por butirato quinasa y fosfato butiriltransferasa. A medida que estos ácidos se acumulan, el pH del medio de fermentación disminuye gradualmente. Cuando el pH alcanza un valor crítico (~4,5), el metabolismo bacteriano cambia a la fase solventogénica, a través de una fase de transición impulsada por el cambio de pH. (Lin, Cong, & Zhang, Biobutanol Production from Acetone–Butanol–Ethanol, 2023)

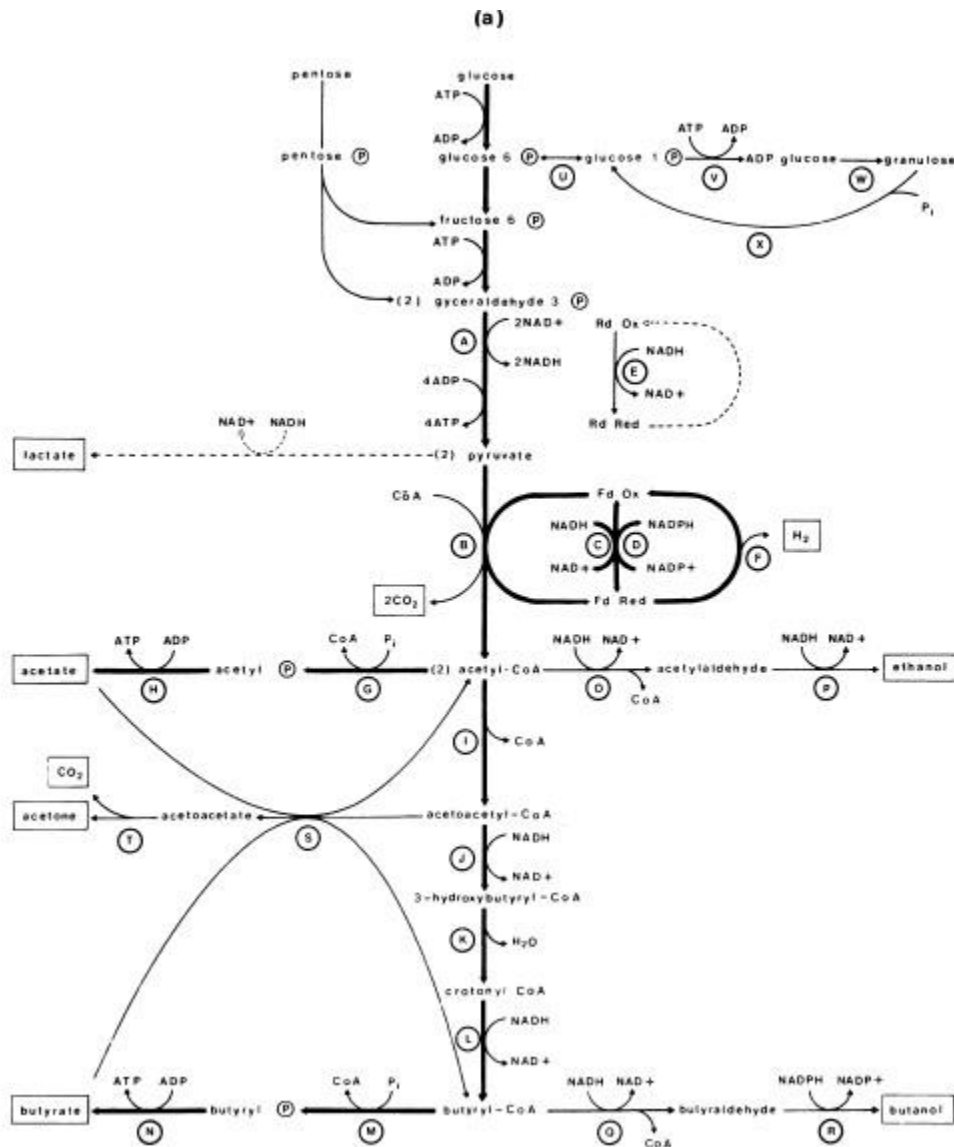
Los ácidos orgánicos penetran en el citoplasma y se disocian, alterando el gradiente de protones entre el interior y exterior de la célula. Para adaptarse, las células convierten estos ácidos en acetil-CoA y butiril-CoA, mientras siguen consumiendo sustratos para sintetizar butanol, acetona y etanol. Factores como la respuesta al estrés bacteriano, la regulación metabólica y las condiciones de cultivo afectan esta transición de la fase acidogénica a la solventogénica. (Lin, Cong, & Zhang, Biobutanol Production from Acetone–Butanol– Ethanol, 2023)

Fase solventogénica: En esta fase, los ácidos formados en la fase anterior se transforman en solventes (acetona, butanol y etanol). El ácido butírico se reduce a butiraldehído, que luego es convertido en butanol por las enzimas butiraldehído deshidrogenasa y butanol deshidrogenasa. El acetil-CoA también puede desviarse hacia la formación de acetoacetato, que se convierte en acetona por descarboxilación.

Para la síntesis de etanol, el piruvato sigue la vía enzimática de las enzimas alcohol deshidrogenasa. Los precursores clave en esta fase son acetil-CoA, butiril-CoA y acetoacetil-CoA, que participan en la producción de etanol, butanol y acetona, respectivamente. La catálisis del aldehído/alcohol deshidrogenasas (*Adh*) produce butanol y etanol, mientras que la síntesis de acetona, catalizada por acetoacetil-CoA transferasa (CTFAB) y acetoacetil-CoA descarboxilasa, libera CO₂. La producción de acetona está acoplada con la reabsorción de ácidos, y su inhibición también afecta la generación de alcoholes.

A medida que la fermentación avanza hacia su fase final, la acumulación de productos, especialmente butanol, junto con el agotamiento de nutrientes, induce la formación de esporas debido a la toxicidad de los productos y el estrés ambiental, marcando el fin de la fermentación. (Lin, Cong, & Zhang, Biobutanol Production from Acetone–Butanol–Ethanol, 2023)

Figura 2 Ruta metabólica de *Clostridium acetobutylicum* tomado de Jones et al 2000 Acetone-Butanol Fermentation Revisited



Balance Redox y Energético: El proceso está limitado por la disponibilidad de NADH/NADPH, necesarios para las reacciones de reducción en la síntesis de butanol. La adición de precursores como el ácido butírico puede aliviar estas limitaciones al reducir la cantidad de pasos biosintéticos que consumen estos cofactores.

- **Control de pH:** La producción de solventes es altamente sensible al pH. Un pH bajo favorece la formación de ácidos, mientras que un pH ligeramente más elevado promueve la síntesis de solventes. Esto se puede controlar con tampones o ajustes en el cultivo.
- **Condiciones anaerobias:** La fermentación ABE requiere condiciones estrictamente anaerobias, ya que la presencia de oxígeno inhibe tanto el crecimiento celular como la producción de solventes.

Condiciones para la fermentación ABE

Para generar un proceso de fermentación óptimo, es necesario mantener ciertas condiciones que favorezcan el crecimiento de las bacterias, y la producción de solventes a la concentración que se espera. A partir de esto es necesario tener en cuenta:

- pH óptimo: El pH del medio de fermentación debe mantenerse en un rango dependiendo de la fase en la que se encuentre la ruta metabólica, por lo general pH entre 5,5 y 6,5 es el ideal ya que no inhibe el crecimiento bacteriano en sus distintas fases.
- Fuente de Carbono: La fuente de carbohidratos fermentables como almidón, glucosa, sacarosa, celulosa, son las fuentes iniciales de la ruta metabólica, los microorganismos poseen enzimas que les permiten monomerizar carbohidratos como el almidón, por medio de enzimas tales como la α amilasa.
- Temperatura: La temperatura de fermentación es un factor determinante para el crecimiento de las bacterias, durante el proceso de fermentación se recomienda rangos entre 35,5 - 37°C.
- Nitrógeno: La fuente de Nitrógeno es obligatoria para la fermentación, y el crecimiento inicial de las bacterias.
- Anaerobiosis: Es necesario mantener las condiciones libres de O₂, para la producción de solventes de acuerdo la cepa.
- Tiempo de fermentación: El tiempo de fermentación varía según la cepa, de manera que debe mantener las demás condiciones para cumplir con la generación de los solventes.

De los diversos sustratos estudiados para generar metabolitos, y en el caso de la fermentación ABE, se ha usado la yuca, es un tubérculo rico en almidón y se cultiva principalmente en regiones subtropicales y tropicales. En China, Vietnam y Tailandia, la yuca se utiliza principalmente para la producción y la preparación de almidón y puede crecer en tierras infértiles sin competir con los cultivos de cereales, de esta manera al ser usado como sustrato para la fermentación los valores entre la producción de butanol, a partir de la cepa de *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 en contraste con los de glucosa, son muy similares. (Gu, y otros, 2009)

En otros estudios se indica el almidón de sagú hidrolizado enzimáticamente contiene pequeñas cantidades de compuestos nitrogenados, así como trazas de minerales y suplementos nutricionales que mejoran la fermentación en microorganismos. Se ha utilizado como sustrato para varios procesos de fermentación, como la producción de ácido láctico, producción de ABE y la producción de butanol. (Nasser, Shorgani, Sahaid Kalil, Mohtar, & Yusoff, 2013)

En cuanto al uso de otros almidones *Ipomoea batatas* también conocida como “batata colombiana” se caracteriza por su alta calidad, con propiedades fisicoquímicas que lo hacen adecuado para diversos usos industriales, incluidos los procesos de fermentación. Este almidón tiene un alto contenido de amilosa y una capacidad de gelificación favorable, lo que le otorga una textura suave y homogénea al ser sometido a procesos de degradación enzimática. Además, presenta una alta capacidad de absorción de agua y un buen comportamiento frente a tratamientos térmicos, características que lo hacen adecuado para la producción de biocombustibles como el butanol durante la fermentación ABE. El tamaño de los gránulos de almidón de *Ipomoea batatas* varía generalmente entre 5 y 40 μm en diámetro. Sin embargo, los gránulos de almidón de diferentes variedades de batata pueden tener ligeras variaciones en tamaño, dependiendo de factores como el clima y las condiciones de cultivo. En la batata colombiana, estos gránulos tienden a ser

pequeños a medianos en comparación con otras fuentes de almidón como el maíz o la papa (Lin, y otros, 2019)

El almidón de ñame (*Dioscorea spp.*) se caracteriza por sus propiedades fisicoquímicas particulares, que permiten aplicaciones industriales como alimentos, papel y bioplásticos. Sus gránulos de almidón varían en tamaño de 10 a 100 μm , con una forma ovalada o redondeada. Tiene un alto contenido de amilosa (entre el 20-30%), lo que le otorga propiedades de retrogradación favorables, como la formación de geles firmes tras el enfriamiento, una cualidad útil en la industria alimentaria. Además, este almidón exhibe una alta viscosidad y capacidad de absorción de agua, lo que lo hace útil en la producción de productos espesantes y adhesivos.

El almidón de papa (*Solanum tuberosum*) tiene gránulos de gran tamaño, que varían entre 5 y 100 micrómetros, siendo algunos de los más grandes entre los almidones vegetales. Este almidón se caracteriza por su alta capacidad de hinchamiento y gelatinización a temperaturas relativamente bajas, lo que lo hace ideal para aplicaciones en la industria alimentaria, como espesantes, agentes estabilizadores y en la producción de papas fritas y productos horneados. Además, el almidón de papa tiene un contenido de amilosa moderado (aproximadamente 20-30%), lo que le otorga buenas propiedades de formación de geles, siendo útil también en la fabricación de bioplásticos. (Al-Shorgani, Sahaid Kalil , & Wan Yusoff , 2011)

En contraste la arracacha o *Arracacia xanthorrhiza*, es un tubérculo nativo de los Andes que se cultiva principalmente en países como Colombia, Venezuela, Perú, y Brasil. Este tubérculo es apreciado por su alto valor nutricional y por las propiedades únicas de su almidón, que lo hacen útil tanto en la alimentación humana como en la industria. El almidón de arracacha es particularmente valorado por su fina granulometría, lo que le otorga una textura suave y de fácil digestión, superior a la de otros almidones como el de maíz o papa. (Cortazar, Wolf, & Armendáriz González, 2013)

El almidón de *Arracacia xanthorrhiza* presenta una composición única que lo distingue de otros tubérculos. Este almidón tiene una alta viscosidad y claridad en soluciones acuosas, lo que lo convierte en un excelente espesante en la industria alimentaria. Además, debido a su bajo contenido de amilosa (alrededor del 20%), es más fácil de gelatinizar y se

considera más adecuado para la elaboración de productos de repostería y alimentos infantiles. El tamaño pequeño de sus gránulos, generalmente de entre 2 y 5 micrómetros, contribuye a una rápida degradación en el tracto digestivo, haciéndolo ideal para dietas de fácil digestión (Sánchez , Ceballos , Morante , & Dominique, 2016)

Características de fermentadores ABE

Dentro de la clase Clostridia, se encuentra una amplia diversidad de microorganismos con características metabólicas variadas. A pesar de esta diversidad, comparten una serie de propiedades comunes, definidas en estudios filogenéticos antiguos. Entre estas características destacan su morfología en forma de bastón, la presencia de una pared celular Grampositiva con múltiples capas de peptidoglicano, y la capacidad de formar endosporas termoestables. Además, presentan un crecimiento anaeróbico, un metabolismo fermentativo sin capacidad de reducir sulfatos, y un bajo contenido de G+C en su ADN genómico. (Durre, 2007)

El grupo incluye especies psicrófilas, mesófilas y termófilas, muchas de las cuales poseen flagelos peritricos que les permiten la movilidad en distintos entornos. Su resistencia a condiciones extremas, como sequedad y altas temperaturas, les confiere una notable adaptabilidad.

En el ambiente natural, las bacterias del género Clostridium desempeñan un papel fundamental en la degradación de materia orgánica, transformándola en ácidos orgánicos, alcoholes, CO₂, H₂ y minerales. Además, tienen la capacidad de sintetizar fuentes de carbono complejas en una variedad de metabolitos, incluyendo ácidos carboxílicos, cetonas y solventes como propanol y butanol, lo que las hace de gran interés en procesos biotecnológicos y en la producción de biocombustibles.

Ampliamente se han estudiado secuencias por RNA 16s, para la inclusión de cepas al grupo, no obstante, las clásicas pruebas son necesarias para la identificación de *Clostridium*, estas características son:

- Morfología colonial en medios de cultivo sólidos y aspecto en medios de cultivo líquidos
- Morfología celular, incluido el tamaño y la forma de la célula, morfología de la endospora, motilidad
- Morfología de los flagelos, estructuras de fijación y producción de cápsulas extracelulares, gránulos intracelulares y reacciones de tinción, y ultraestructura de la pared celular
- Características de crecimiento, incluidos los intervalos superiores, inferiores y óptimos de temperatura
- pH y otros parámetros de crecimiento
- Grado de anaerobiosis y requisitos atmosféricos
- Nutrición, necesidades de crecimiento y bioquímica
- Absorción, utilización de azúcares y aminoácidos
- Capacidad para degradar macromoléculas complejas, incluidos carbohidratos y proteínas
- Tipo de metabolismo empleado y productos finales producidos
- Capacidad de utilizar compuestos como única fuente de carbono para la energía y el crecimiento
- Capacidad de utilizar compuestos como fuente de nitrógeno y metabolismo del nitrógeno
- Producción de toxinas y enzimas extracelulares

En cuanto a las fuentes de Carbono usadas para sus procesos metabólicos se dividen, en sacarolíticos, proteolíticos, “lipídicos” y mixtos. Cada grupo realiza una síntesis con azúcares, proteínas, lípidos, azúcares/proteínas respectivamente. (Diallo, S.W.M, & Lopez Contreras, 2021)

La relación con la esporulación de los clostridios fermentadores ABE es la de solventes, ya que la producción de solventes puede afectar a la célula bacteriana, cambiando el pH

al punto de promover la esporulación o la apoptosis. La esporulación es un mecanismo de defensa que usan para generar una endospora que metabólicamente está inactiva y tiene un alto costo energético para las bacterias. Las endosporas pueden sobrevivir a tratamientos severos como altas temperaturas, la presencia de oxígeno (para bacterias anaeróbicas), desecación, incubación de lisozima, radiación ionizante y solventes químicos. (Diallo, S.W.M, & Lopez Contreras, 2021)

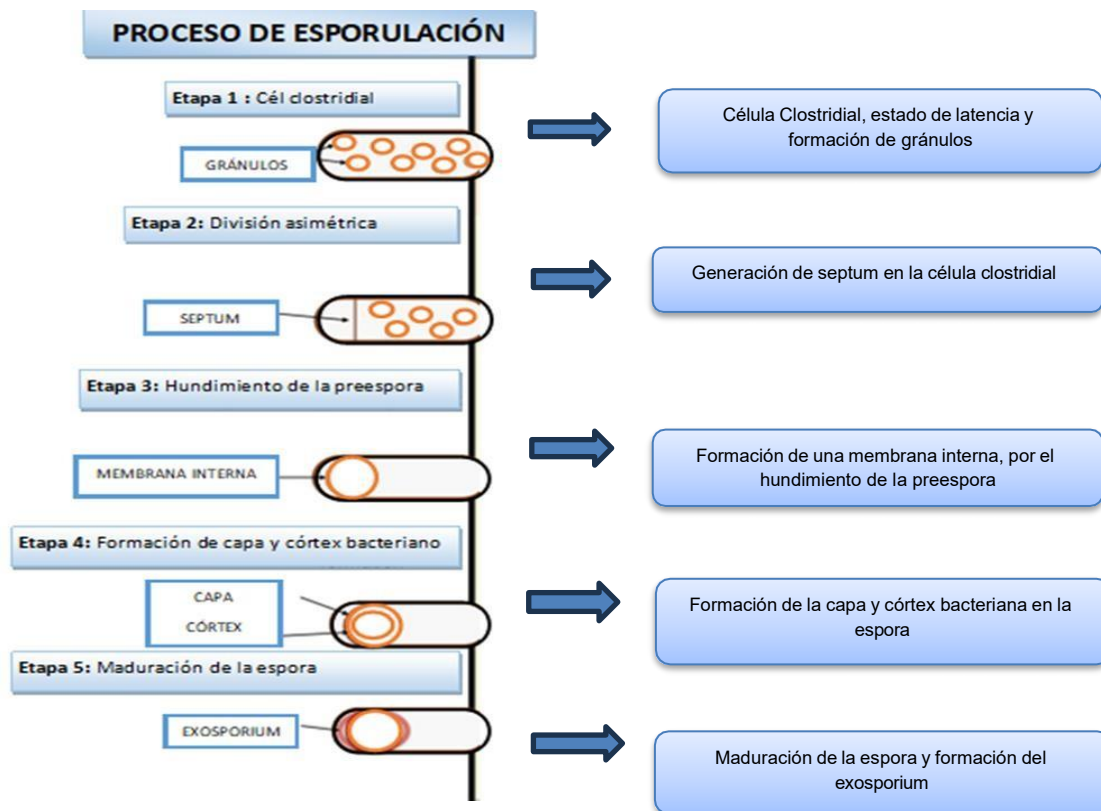
Esporulación

El proceso de esporulación esta indirectamente relacionado a la producción de solventes, ya que induce a un estado de latencia, donde el microorganismo forma gránulos con reservas inorgánicas y orgánicas, que pueden proveer de fuentes de Carbono y Nitrógeno. La producción de DPA (Acido dipicolínico) y Ca^+ , está relacionada con el mantenimiento de la actividad de la espora, el DPA puede representar en clostridios hasta el 30% del peso seco de la espora.

La ubicación de la espora es un aspecto destacado en la identificación de especies dentro del género *Clostridium*; en *Clostridium pasteurianum* espora terminal, en *Clostridium beijerinckii* espora excéntrica, espora subterminal en *Clostridium acetobutylicum*.

Además de esto, la esporulación puede estar relacionada directamente con la fuente de Carbono del medio de crecimiento, fuente mineral y medio externo, de tal manera que en especies como *Clostridium beijerinckii* promueve la producción de esporas, con la glucosa en el medio de cultivo, media a su vez en otras especies por el contenido metálico en el medio. (Diallo, S.W.M, & Lopez Contreras, 2021)

Figura 3 Proceso de esporulación adaptada (Diallo, S.W.M, & Lopez Contreras, 2021)



Los especímenes de las cepas tipo suelen estar normalmente en las principales colecciones de cultivos de referencia, las cepas tipo no necesariamente debe ser la mejor representada, sino las más descritas. Para ser incluida en una especie, cualquier cepa nueva debe compararse con las características de la cepa tipo.

Hábitat

Los clostridios son bacterias anaerobias obligadas con una tolerancia limitada al oxígeno. Esta sensibilidad se debe a su incapacidad para neutralizar los reactivos de oxígeno generados durante el metabolismo aeróbico. Los productos tóxicos, como el superóxido y el peróxido de hidrógeno, son normalmente degradados por enzimas como el superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa. Sin embargo, en clostridios fermentadores, la actividad de estas enzimas es baja o inexistente, lo que limita su tolerancia al oxígeno. No obstante, algunas especies, como *Clostridium perfringens* y *Clostridium ramosum*, poseen SOD, lo que le confiere cierta resistencia al oxígeno. Durante el crecimiento los clostridios.

establecen características bajas en el potencial redox, entre 200 – 400 mV en el ambiente, posteriormente la germinación de las esporas es dependiente de la exposición al O₂, y pueden durar años en espera de iniciar el proceso hasta que encuentren condiciones anoxicas estrictas o facultativas parciales, en este ultimo la cantidad de nutrientes posterior a la germinación debe suplementar dichas condiciones. (Okabe, y otros, 2023)

Requerimiento de nutrientes

Los requerimientos de nutrientes clasifican a los microorganismos del género *Clostridium* en 4 grandes grupos:

1. **Clostridios sacarolíticos:** Son usualmente no patógenos, capaces de crecer en carbohidratos como la xilosa, manitol, glucosa, fructosa, lactosa entre otros. Este grupo incluye especies que usan almidón, celulosa, pectina, y quitina.
2. **Clostridios proteolíticos:** Son microorganismos que secretan proteasas y proteínas digestivas que fermentan ácidos grasos de cadenas ramificadas, un gran número de clostridios proteolíticos son altamente patogénicos.
3. **Clostridios mixtos:** En este grupo están los microorganismos que pueden sintetizar ambos sustratos y agregarlo a su metabolismo; con alta capacidad de sintetizar muchos componentes orgánicos, con hábitats que permiten una buena formación de esporas mientras todas las condiciones permiten generar la célula vegetativa. (Durre, 2007)

Para las cepas de referencia usadas se destacan las características asociadas a su metabolismo, dentro de esta clasificación se indica que *C. acetobutylicum* ATCC 824 y *C. beijerinckii*, son amilolíticas, y son capaces de hidrolizar los almidones por enzimas propias de dichas cepas y tendrán ventajas para la producción de biomasa y solventes.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar aislados bacterianos fermentadores ABE que a partir de suelo rizosférico sean capaces de producir butanol como solvente principal.

Objetivos específicos

1. Caracterizar los microorganismos fermentadores ABE aislados de suelo rizosférico
2. Identificar los productos y rendimientos de la fermentación ABE a partir de fuentes de Carbono seleccionadas mediante cromatografía líquida (HPLC).
3. Seleccionar y contrastar los aislados fermentadores ABE con cepas de referencia ATCC 824, *Clostridium beijerinckii*, y *Clostridium sacharoperbutylaceticum* para la producción de solventes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El creciente uso de combustibles fósiles ha generado preocupaciones ambientales significativas debido a su contribución al cambio climático, la contaminación y el agotamiento de recursos no renovables. En este contexto, la búsqueda de fuentes de energía alternativas, sostenibles y renovables, como los biocombustibles, se ha convertido en una prioridad a nivel mundial. Entre los biocombustibles, el butanol ha ganado interés debido a sus propiedades favorables, como su alta eficiencia energética y menor impacto ambiental en comparación con los combustibles tradicionales.

A pesar de los avances en la investigación de biocombustibles, la producción de butanol mediante fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol) aún enfrenta varios desafíos. Entre estos, uno de los más críticos es la optimización de los medios de cultivo, en particular la relación Carbono/Nitrógeno (C/N), que juega un papel clave en el crecimiento microbiano y la eficiencia en la producción de solventes. Si bien se han realizado estudios sobre el uso de diferentes cepas bacterianas y fuentes de carbono, persiste la necesidad de mejorar el conocimiento sobre cómo estas interacciones afectan la productividad y cómo pueden ser optimizadas para lograr procesos más eficientes y sostenibles.

Dado que los residuos agrícolas representan una fuente renovable y económica de sustratos para la fermentación, es crucial investigar cómo la variación en la relación C/N en estos medios influye en la producción de butanol. Así, el problema central que aborda esta investigación es cómo ajustar los medios de cultivo, especialmente en lo que respecta a la proporción de carbono y nitrógeno, para maximizar la producción de butanol mediante la fermentación ABE.

HIPÓTESIS

En el contexto de la biotecnología aplicada a la producción de biocombustibles, los microorganismos capaces de llevar a cabo fermentaciones tipo ABE (acetona-butanol-etanol) representan una alternativa prometedora para la obtención de solventes con alto valor energético, como el butanol. Esta investigación busca evaluar el potencial de aisladas bacterias provenientes de suelo rizosférico para producir butanol como metabolito principal, considerando que su desempeño podría estar influenciado por diversos factores, entre ellos la cepa utilizada, el tiempo de fermentación y la fuente de carbono. En este sentido, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo, que orientarán tanto la caracterización microbiológica como el análisis comparativo con cepas de referencia mediante herramientas estadísticas como el análisis de varianza (ANOVA).

Hipótesis general:

- **H₁**: Existen aislados bacterianos fermentadores ABE provenientes de suelo rizosférico capaces de producir butanol como principal solvente en condiciones de fermentación controladas.

Hipótesis principales:

1. **H_{1.1}**: Los aislados bacterianos obtenidos del suelo rizosférico presentan características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas compatibles con microorganismos del género *Clostridium* capaces de realizar fermentación ABE.
2. **H_{1.2}**: La fermentación ABE realizada por los aislados bacterianos con fuentes de carbono seleccionadas genera perfiles de productos y rendimientos diferenciados que pueden ser cuantificados por cromatografía líquida (HPLC).
3. **H_{1.3} (Hipótesis estadística)**:
 - **H₀ (nula)**: No existen diferencias significativas en la producción de butanol entre los aislados bacterianos fermentadores ABE y las cepas de referencia (*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *C. beijerinckii* y *C.*

sacharoperbutylaceticum), independientemente del tiempo de fermentación.

- **H₁ (alternativa)**: Existen diferencias significativas en la producción de butanol entre los aislados bacterianos fermentadores ABE y las cepas de referencia, dependiendo del tiempo de fermentación.

Enfoque estadístico:

Para probar la hipótesis H1.3, se realizará un ANOVA multifactorial, donde se evaluarán los efectos individuales y combinados de:

- Las cepas bacterianas (aislados vs. cepas de referencia),
- El tiempo de fermentación (por ejemplo, 24 h, 48 h, 72 h, etc.),
- Y la producción de butanol como variable dependiente.

METODOLOGÍA

Aislamiento y tratamiento de muestras

Aislamiento de microorganismos cultivables de suelo rizosférico de *Solanum tuberosum*

El área de estudio se desarrolló en la Unidad Agroambiental el Vergel en el municipio de Facatativá Cundinamarca con las coordenadas de 4°52'01.6"N 74°20'28.8"W perteneciente a la Universidad de Cundinamarca, esta finca ha sido usada para cultivo de papa como actividad académica y de investigación. El área usada para cultivo de papa fue la base del muestreo realizado.

Figura 4 Suelo usado para muestreo demarcación con estacas.



Se calculó la cantidad de muestras que tendrían la desviación estándar deseada para abarcar una muestra representativa bajo las condiciones del suelo en cuanto a la diversidad de los microorganismos deseada. Teniendo en cuenta que el número de muestras óptimo para una extensión de 10 Ha es de 15 se calcularon la cantidad de muestras para obtener una muestra representativa, ya que es este método se sugiera una muestra por hectárea; esta técnica es común en estudios de microbiología de suelos, ya que permite capturar la variabilidad espacial en un área determinada. El número de muestras a recolectar dependerá de:

1. Extensión del área (10 Ha).
2. Variabilidad esperada del suelo
3. Método de muestreo (zig-zag cubriendo toda la zona).
4. Densidad recomendada de muestreo (muestras por Ha).

Figura 5 Estacas demarcadas para muestreo.



Distribución de muestras el área de estudio

El método de muestreo usado es *Zigzag*, debido a que las plantas tienen su mayor densidad radicular en una profundidad de 15 a 20 cm, los análisis de rizosfera se tomaron muestras sobre 25 cm, para identificar análisis de salinidad la longitud de muestras es de 5 cm.

Figura 5 Ejemplo zona de muestreo



Características químicas y físicas del suelo

- **pH:** Se tomaron medidas de pH de cada uno de los puntos de toma de muestras de suelo, variante entre los puntos 6,4 +- 2
- **Textura:** Franco-arenosa a franco-limosa, lo que significa que contienen una mezcla de partículas de arena, limo y arcilla, con predominancia de partículas medianas.
- **Estructura:** Granular y migajosa, lo que facilita tanto el movimiento del agua como del aire en el perfil del suelo. Esto también contribuye a un buen crecimiento de las raíces y a la estabilidad de los cultivos.

Se tomaron 25 muestras de suelo rizosférico, suelo para análisis de composición, y raíces pertenecientes a rizosfera de papa pastusa *Solanum tuberosum*. La forma de muestreo se dio a partir del uso de un palín, se abre un hueco en forma de "V", se corta una tajada de espesor uniforme de 2 a 3 cm de gruesa; manteniendo dicha tajada sobre la pala se eliminan los bordes. Esta operación se repitió 20 veces a lo largo de 1 Ha.

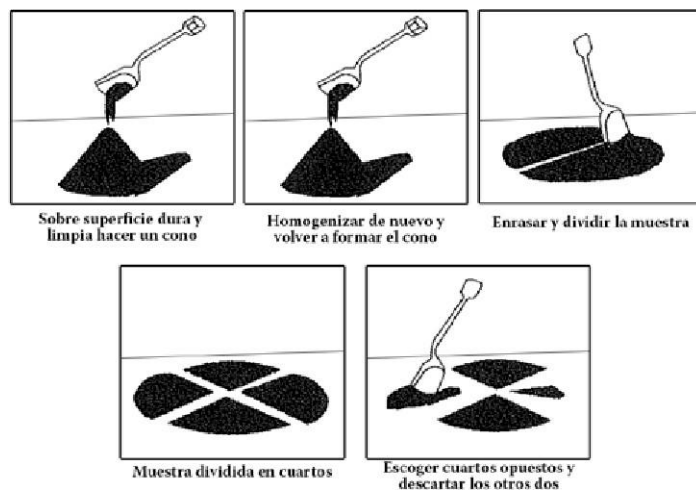
Para el empaque de las muestras se emplearon bolsas plásticas herméticas, se sellan de manera inmediata para evitar la entrada de agua, y evitar el cambio de pH del suelo, hasta llegar al laboratorio, para el transporte se usó una nevera de icopor de 50 l.

1.1 Procesamiento de muestras

Para el tratamiento de las muestras en laboratorio se calculó el porcentaje de humedad situando 10 g de muestra suelo en el horno a una temperatura de 105 °C durante 24 h y se procede a medir nuevamente la masa. Las otras muestras se homogenizaron, se tamizaron con medidas de 0,55 mm y se descartaron las fracciones que no pasaron dicho tamiz, puesto que pertenecían a piedras.

Para la selección de las muestras analizar se usó el “método de cuarteo” que consiste en poner la muestra tamizada sobre una hoja de papel formando un montón cónico, con una espátula se dividió en 4 partes iguales, y se tomaron dos partes iguales para rotular las muestras por punto.

Figura 6 Imagen explicativa de "método de cuarteo" tomado de (Monica J., 2010)



Extracción de almidones

Pretratamiento de residuos de tubérculos

Los tubérculos usados para los medios de cultivo son residuos industriales, de batata, ñame, y papa, a su vez se compararon con un medio de cultivo control, con almidón de papa, reactivo analítico.

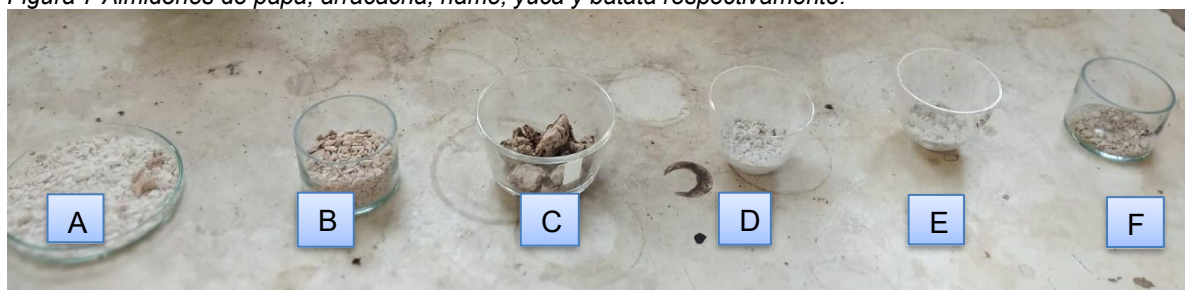
Los residuos industriales de los tubérculos corresponden cosechas que no se usan para la distribución, ya sea por tamaño, forma o color, de tal manera generalmente se desechan, inicialmente se lavaron, quitando impurezas prominentes y se midió su masa hasta alcanzar los topes propuestos para la extracción.

Preparación de almidones como fuente de Carbono

Se hizo la extracción de almidón de batata, ñame y arracacha por medio de El almidón de papa de la variedad, se extrae según la metodología propuesta por Aristizábal y Sánchez (2007). (Aristizábal, Sánchez, & Mejía Lorío, 2007)

Los tubérculos en buen estado son lavados, pelados y cortados en finas rodajas, luego son triturados en un rayador de 0,5 cm por agujero, en algunas metodologías lo relacionan con licuados, pero es posible que se rompan algunas estructuras de almidón más de lo deseado. Luego el producto obtenido se filtra con la ayuda de un lienzo, realizando varios lavados de la pulpa con agua destilada para retirar todo el almidón hasta que el líquido saliera claro. Se continúa con la sedimentación de los lavados durante 4 horas, se separa el agua presente y la pasta resultante se somete a secado en estufa por 24 horas a 48°C; finalmente se muele o se macera el almidón y se almacena en bolsas con cierre hermético de polipropileno calibre de 0,002 m en ambiente seco. Posterior a esto los almidones son comparados en cuanto a color, tamaño de poro y consistencia.

Figura 7 Almidones de papa, arracacha, ñame, yuca y batata respectivamente.



Almidón de batata



Almidón de ñame



Almidón de papa



Almidón de arracacha

Preparación de medios de cultivo

Medio de cultivo para activación bacteriana

Se prepararon medios de cultivo con RCM (Reinforced Clostridium Medium), inicialmente las bacterias evaluadas fueron cepas ya identificadas en la literatura para fermentación ABE, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium sacharoperaceticum*, *Clostridium beijerincki*, éstas fueron suministradas por el IBUN, y activadas en viales de 100 ml durante 24 h, incubadas a 37°C.

Figura 8 Medios de cultivo preparados con los diversos almidones en viales.



- **Métodos analíticos para cuantificación de biomasa**

Se realizaron mediciones cada 2 horas del crecimiento bacteriano, la densidad óptica por medio de espectrofotómetro UV VIS a 600 nm, esto indica la refracción de la concentración de bacterias que hay en ese tiempo de medición.

Para la cinética de todos los microorganismos (*C acetobutylicum* ATCC 824; *C beijerinckii*; *C sacharoperbutylaceticum*., y de los aislamientos (A_x ;P_x; M_x) se calculó peso seco de cada muestra por intervalos de 2h.

Para el peso seco se tomaron muestras de cada tiempo de medición en tubos eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron a 15000 rpm a temperatura ambiente, se extrae el sobrenadante, y se resuspende a NaCl 0,9 p/v de nuevo se centrifugó con las condiciones descritas, se descarta sobrenadante, se resuspende a 10 ml de NaCl, se centrifugo 30 min a 5000 rpm para medir la absorbancia a 540 nm.

- **Medio de cultivo para fermentación**

Los medios de fermentación se realizaron y compararon según lo descrito a continuación maneras:

- **Medios con los almidones como fuente de Carbono alterna**

Los almidones usados se trataron con NaCl 0.5 p/v, para quitar impurezas antes de ser agregados al medio. Se realizaron 4 medios distintos que fueron evaluados con cada uno de los aislamientos y las cepas ABE ya reconocidas en literatura.

La preparación del Medio de cultivo líquido, Hidrolizado del almidón 5 g/l Extracto de levadura, Almidón, NaCl. y cisteína. Este medio se usó como estándar para los demás medios, tras la preparación se calentaban hasta punto de ebullición en un Schot del volumen deseado, y se servían en viales de 100 ml, en cámara de anaerobiosis, taponándose debidamente con tapones de caucho con un grafador en el mismo medio aislado de O₂. Tras sacarlos de la cámara se auto clavaron y se usaron.

- **Medio P (almidón de papa)**

El medio P contiene almidón de papa 15 g/l, hidrolizado del mismo almidón 5 g/l, hidrolizado de caseína 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cisteína 0,5 g/l, y NaCl 5 g/l. y los pasos ya indicados.

▪ **Medio B (Almidón de batata)**

El medio B contiene almidón de batata 15 g/l, hidrolizado del mismo almidón 5 g/l, hidrolizado de caseína 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cisteína 0,5 g/l, y NaCl 5 g/l. y los pasos ya indicados.

• **Medio Ñ (Almidón de ñame)**

El medio Ñ contiene almidón de ñame 15 g/l, hidrolizado del mismo almidón 5 g/l, hidrolizado de caseína 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cisteína 0,5 g/l, y NaCl 5 g/l., y se siguió el procedimiento ya indicado para T6.

• **Medio A (Almidón de arracacha)**

El medio A contiene almidón de ñame 15 g/l, hidrolizado del mismo almidón 5 g/l, hidrolizado de caseína 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cisteína 0,5 g/l, y NaCl 5 g/l., y la preparación descrita.

Relación C/N de los medios de Cultivo

Medio P (almidón de papa *Solanum tuberosum*)

La concentración añadida al medio por cada componente fue almidón de papa 20 g/l, hidrolizado de papa del mismo almidón, hidrolizado de caseína 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cisteína 0,5 g/l, y NaCl 5 g/l.

Los porcentajes de carbono de cada componente cambian y por ende su relación C/N:

- Almidón de papa: 44% de carbono
- Hidrolizado de almidón de papa: 44% de carbono
- Hidrolizado de caseína: 50% de carbono, 15% de nitrógeno
- Extracto de levadura: 45% de carbono, 10% de nitrógeno
- Cisteína: 29% de carbono, 11.6% de nitrógeno
- NaCl: 5 g/l (no aporta carbono ni nitrógeno)

Se calculó la cantidad de carbono y nitrógeno en cada componente usando las siguientes fórmulas:

- **Almidón de papa**

Carbono: $15 \text{ g/l} \times 0.44 = 6.6 \text{ g de carbono}$

- **Hidrolizado de almidón de papa**

Carbono: $5 \text{ g/l} \times 0.50 = 2.5 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/l} \times 0.15 = 0.75 \text{ g}$

- **Hidrolizado de caseína**

Carbono: $5 \text{ g/l} \times 0.45 = 2.25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/l} \times 0.10 = 0.5 \text{ g de nitrógeno}$

- **Extracto de levadura**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.45 = 2.25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.10 = 0.5 \text{ g}$

- **Cisteína**

Carbono: $0.5 \text{ g/L} \times 0.29 = 0.145 \text{ g}$

Nitrógeno: $0.5 \text{ g/L} \times 0.116 = 0.058 \text{ g}$

La relación C/N se calcula dividiendo el total de carbono entre el total de nitrógeno:

$$\text{Relación } \frac{13,695 \text{ g C}}{1,308 \text{ g N2}} = \mathbf{10,47}$$

Por lo tanto, la relación C/N es de 10.47.

Medio B (almidón de batata *Ipomoea batatas*)

La concentración añadida al medio por cada componente fue almidón de ñame: 15 g/l, hidrolizado de almidón de ñame 5 g/l, hidrolizado de caseína 5 g/l, Extracto de levadura: 5 g/l, Cisteína: 0.5 g/l, NaCl 5 g/l (no aporta carbono ni nitrógeno)

Los porcentajes típicos de carbono y nitrógeno son los siguientes:

- Almidón de ñame: aproximadamente 70% de carbono según la especie indicada
- Hidrolizado de almidón de batata: también asumimos aproximadamente 70% de carbono.
- Hidrolizado de caseína: 50% de carbono, 15% de nitrógeno
- Extracto de levadura: 45% de carbono, 10% de nitrógeno
- Cisteína: 29% de carbono, 11.6% de nitrógeno

Se calculó la cantidad de carbono y nitrógeno en cada componente de la siguiente manera:

- **Almidón de batata:**

Carbono: $15 \text{ g/L} \times 0.44 = 6.6 \text{ g}$

- **Hidrolizado de almidón de batata:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.25 = 1,25 \text{ g}$

- **Hidrolizado de caseína:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.50 = 2.5 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.15 = 0.75 \text{ g}$

- **Extracto de levadura:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.45 = 2.25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.10 = 0.5 \text{ g}$

- **Cisteína:**

Carbono: $0.5 \text{ g/L} \times 0.29 = 0.145 \text{ g de}$

Nitrógeno: $0.5 \text{ g/L} \times 0.116 = 0.058 \text{ g}$

Relación C/N = $\frac{12,145 \text{ g C}}{1,308 \text{ g N}_2} = \mathbf{9,28 \text{ g}}$

La relación C/N del medio de cultivo que incluye almidón de batata es de aproximadamente 9,28. Esto indica que hay alrededor de 9,28 partes de carbono por cada parte de nitrógeno en el medio.

Medio Ñ (almidón de ñame (*Dioscorea spp*))

La concentración añadida al medio por cada componente fue almidón de ñame 15 g/l, hidrolizado de ñame del mismo almidón, hidrolizado de caseína 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, cisteína 0,5 g/l, y NaCl 5 g/l.

Almidón de ñame: 65% de carbono

Hidrolizado de almidón de ñame: asumimos aproximadamente 65% de carbono.

Hidrolizado de caseína: 50% de carbono, 15% de nitrógeno

Extracto de levadura: 45% de carbono, 10% de nitrógeno Cisteína:

29% de carbono, 11.6% de nitrógeno

- **Almidón de ñame:**

Carbono: $15 \text{ g/l} \times 0,44 = 6,6 \text{ g}$

- **Hidrolizado de almidón de ñame:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0,65 = 3,25 \text{ g}$

- **Hidrolizado de caseína:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0,50 = 2,5 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0,15 = 0,75 \text{ g}$

- **Extracto de levadura:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0,45 = 2,25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0,10 = 0,5 \text{ g}$

- **Cisteína:**

Carbono: $0,5 \text{ g/L} \times 0,29 = 0,145 \text{ g}$

Nitrógeno: $0,5 \text{ g/L} \times 0,116 = 0,058 \text{ g}$

La relación C/N se calcula dividiendo el total de carbono entre el total de nitrógeno:

Relación C/N = $\frac{14,145}{1,308} = 10,814$

La relación C/N del medio de cultivo que incluye almidón de ñame es de aproximadamente 10.814. Esto indica que hay alrededor de 10,814 partes de carbono por cada parte de nitrógeno en el medio.

Medio A (almidón de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*))

La concentración añadida al medio por cada componente fue almidón de arracacha: 15 g/l, hidrolizado de almidón de arracacha 5 g/l, hidrolizado de caseína 5 g/l, Extracto de levadura: 5 g/l, Cisteína: 0.5 g/l, NaCl 5 g/L (no aporta carbono ni nitrógeno).

Hidrolizado de almidón de arracacha: asumimos 62% de carbono.

Hidrolizado de caseína: 50% de carbono, 15% de nitrógeno

Extracto de levadura: 45% de carbono, 10% de nitrógeno Cisteína:

29% de carbono, 11.6% de nitrógeno

- **Almidón de arracacha:**

Carbono: $15 \text{ g/L} \times 0,44 = 6,6 \text{ g}$

- **Hidrolizado de almidón de arracacha:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.62 = 3.1 \text{ g}$

- **Hidrolizado de caseína:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.50 = 2.5 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.15 = 0.75 \text{ g}$

- **Extracto de levadura:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.45 = 2.25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.10 = 0.5 \text{ g}$

- **Cisteína:**

Carbono: $0.5 \text{ g/L} \times 0.29 = 0.145 \text{ g}$

Nitrógeno: $0.5 \text{ g/L} \times 0.116 = 0.058 \text{ g}$

La relación C/N se calcula dividiendo el total de carbono entre el total de nitrógeno:

$$\text{Relación C/N} = \frac{10,895}{1,308} = 8,329$$

La relación C/N del medio de cultivo que incluye almidón de arracacha es de aproximadamente 8,329. Esto significa que hay alrededor de 8,329 partes de carbono por cada parte de nitrógeno en el medio.

En contraste a estos medios de cultivo, se realizan medios sin hidrolizados, es decir cada uno de los medios con el almidón directo después del pretratamiento, y purificación del almidón. Esos medios de cultivos tuvieron la siguiente composición:

Medio con almidón de papa

- **Almidón de papa**

Carbono: $15 \text{ g/l} \times 0.44 = 6.6 \text{ g}$ de carbono

- **Hidrolizado de caseína**

Carbono: $5 \text{ g/l} \times 0.45 = 2.25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/l} \times 0.10 = 0.5 \text{ g}$ de nitrógeno

- **Extracto de levadura**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.45 = 2.25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.10 = 0.5 \text{ g}$

- **Cisteína**

Carbono: $0.5 \text{ g/L} \times 0.29 = 0.145 \text{ g}$

Nitrógeno: $0.5 \text{ g/L} \times 0.116 = 0.058 \text{ g}$

La relación C/N se calcula dividiendo el total de carbono entre el total de nitrógeno:

$$\text{Relación} \frac{11,245 \text{ g C}}{1,308 \text{ g N}_2} = 8,61$$

Por lo tanto, la relación C/N es de 8,61.

Medio almidón de batata○ **Almidón de batata:**

Carbono: $15 \text{ g/L} \times 0.70 = 10.5 \text{ g}$

○ **Hidrolizado de caseína:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.50 = 2.5 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.15 = 0.75 \text{ g}$

○ **Extracto de levadura:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.45 = 2.25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.10 = 0.5 \text{ g}$

○ **Cisteína:**

Carbono: $0.5 \text{ g/L} \times 0.29 = 0.145 \text{ g}$ de

Nitrógeno: $0.5 \text{ g/L} \times 0.116 = 0.058 \text{ g}$

Relación C/N = $\frac{15,395 \text{ g C}}{1,308 \text{ g N2}} = 11,76$

Medio almidón de ñame○ **Almidón de ñame:**

Carbono: $15 \text{ g/L} \times 0.65 = 9.75 \text{ g}$

○ **Hidrolizado de caseína:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.50 = 2.5 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.15 = 0.75 \text{ g}$

○ **Extracto de levadura:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0.45 = 2.25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0.10 = 0.5 \text{ g}$

○ **Cisteína:**

Carbono: $0.5 \text{ g/L} \times 0.29 = 0.145 \text{ g}$

Nitrógeno: $0.5 \text{ g/L} \times 0.116 = 0.058 \text{ g}$

La relación C/N se calcula dividiendo el total de carbono entre el total de nitrógeno:

$$\text{Relación C/N} = \frac{14,67}{1,308} = \mathbf{11,21}$$

Medio de almidón de arracacha

- **Almidón de arracacha:**

Carbono: $15 \text{ g/L} \times 0,44 = 6,6 \text{ g}$

- **Hidrolizado de caseína:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0,50 = 2,5 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0,15 = 0,75 \text{ g}$

- **Extracto de levadura:**

Carbono: $5 \text{ g/L} \times 0,45 = 2,25 \text{ g}$

Nitrógeno: $5 \text{ g/L} \times 0,10 = 0,5 \text{ g}$

- **Cisteína:**

Carbono: $0,5 \text{ g/L} \times 0,29 = 0,145 \text{ g}$

Nitrógeno: $0,5 \text{ g/L} \times 0,116 = 0,058 \text{ g}$

La relación C/N se calcula dividiendo el total de carbono entre el total de nitrógeno:

$$\text{Relación C/N} = \frac{14,195}{1,308} = \mathbf{10,85}$$

Siembra y cultivo de IDs y cepas de referencia.

Los aislamientos fueron nombrados a través de 3 letras P, M, A ; los números que los siguen están relacionados con el orden de procesamiento de cada muestra.

Inicialmente se realizaron siembras en medio líquido RCM, en tubos Falcon de 50 ml, posteriormente se agitaron en vortex durante 20 min, y se incubaron durante 12 h en cuarto de crecimiento a 37°C, agregándosele un tratamiento de 0,5% p/v para disminuir impurezas asociadas a la rizosfera.

Posteriormente, se sembraron en viales con medio de cultivo anaerobios al 7.5%. Para cada aislamiento se tomaron siembras por triplicado y se incubaron durante 24 h, posteriormente se tomaron muestras para hacer pruebas bioquímicas, y observar por microscopia.

Activación bacteriana

Para la activación bacteriana los viales con los aislados de sembraban 7,5 % posteriormente se dejaban en baño termostatado a 70°C durante 15 min y luego por choque térmico en baño de hielo durante 15 min

Siembra en placa

Para la siembra en placa se seleccionaron en total 9 cepas bacterianas que presentaron crecimiento en el medio RCM, las placas contenían RCM, preparado Agar – agar al 1.5%, de tal manera que tuviera la suficiente consistencia para el crecimiento de *Clostridium*.

A su vez para analizar la cinética, se tomaron muestras cada 2h, por aislamiento para evaluar la tasa de crecimiento de los aislados, midiéndose densidad óptica en espectrofotómetro. de esta manera identificar los tiempos de crecimiento y posteriormente el de fermentación.

Se realizaron diluciones en función de la concentración deseada, teniendo en cuenta que los cultivos se hallaban en medio líquido con una OD conocida, se tomó una alícuota de la muestra original, y se diluyó en 9 partes con s/n salina estéril, este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución de 10^{-3} , con el fin de observar las colonias presentes.

Figura 9 Jarra de anaerobiosis, con ANEROGEN calculado según la cantidad de placas



Las placas sembradas fueron marcadas y se insertaron en una jarra de anaerobiosis, junto a sobres de Gaspack que permiten mantener las condiciones anóxicas, a su vez se añade un indicador de tinción rezasurina (Indicador redox) de la marca *Thermofisher*, y se mantuvieron allí para crecimiento durante 24 h, luego se tomaron muestras y fotografías para el caso de los aislamientos y las cepas indicadas patrón. Tras identificar su morfología macroscópica, se procede a la morfología microscópica.

Ensayos bioquímicos

Análisis de producción de acetona

Para identificar los aislados fermentadores ABE se realizó una prueba de producción de acetona, en donde se preparó nitroprusiato de sodio 5% p/v – y 25% p/v de hidróxido de amonio. En la presencia e acetona se formó un anillo rojo – violeta. (Montoya et al 2000)

Identificación *Clostridium sp*

Para las siguientes pruebas se tomaron las condiciones de incubación en anaerobiosis a 37°C, jarra de anaerobiosis, y Gaspack de 9,5 l en cada una.

Producción de indol a partir de triptófano

Caldo triptonado pH 7,1 Triptona 15,0 g Cloruro de sodio 5,0 g Agua destilada 1000,0 ml
Disuelva los ingredientes, reparta en tubos y esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C

Reducción del nitrato

Para la prueba de nitratos se preparó medio agar nitrato tripticasa con nitrato de potasio, peptona, Después de la incubación, se añaden reactivos de Griess (ácido sulfánico y α -naftilamina) para detectar nitrito.

Hidrolisis de almidón

Para esta prueba se preparó agar almidón, se identificó durante 24h, 48h para observar hidrolisis por medio de un halo en cada placa

Prueba catalasa

Para esta prueba de preparo medio agar nutritivo y con H₂O₂ se comprobó la generación de la enzima.

Prueba de motilidad

Para esta prueba se preparó Medio SIM en placas y observó crecimiento de 24h, 48h, y 72h, posteriormente se revisó para corroborar la prueba de indol líquida, con reactivo de Kovac y a su vez se evaluó motilidad.

Hidrólisis gelatina

Se preparo gelatina nutritiva, y se incubó durante 24h, al pasar a nevera identificar solidificación.

Producción de celulasa

Se usó medio específico con celulosa microcristalina, al tener el tamaño de partícula pequeño, sirve como sustrato para las partículas de celulosa. pH 5 – 7,5.

Tinción de gram

Con el fin de identificar características más detalladas de los aislamientos, se tiñeron cada uno de los aislados y las bacterias patrón, identificando y diferenciando características de la pared celular y las esporas.

Tinción de esporas

Teniendo en cuenta que el género más reconocido para fermentadores ABE, es esporulado, se realizan tinciones de esporas de los medios líquidos que ya han agotado sus fuentes de Carbono, esto corroborado por mediciones de peso seco y densidad óptica, se preparó frotis de una muestra de una colonia sobre una lámina desengrasada, se dejó secar al aire y se fijó al calor. Seguidamente se cubrió la preparación con una solución 5% de verde de malaquita y se colocó papel absorbente sobre esta y calentando con vapor de agua por 15 minutos. Luego se lavó suavemente con agua y colorante por 30 segundos con pocas gotas de safranina.

Cuantificación de productos de fermentación en IDs

Tras el crecimiento bacteriano durante 24 h, el proceso de fermentación se evaluó en 24h, 48h, 72h, 96h, 104h, para cada uno de éstos se tomó muestra de los medios usados para la fermentación, estas muestras se retiraron a tubos eppendorf de 1,5 ml se centrifugó a

15000 rpm y de allí se recupera tanto pellet como sobrenadante. El sobrenadante es aprovechado para las pruebas de sustrato residual, y el pellet se resuspende en 5 ml de s/n NaCl al 0,9 p/v estéril preparado anteriormente, se centrifuga de nuevo y de allí, se recuperan los datos de biomasa tras medir la absorbancia a 540 nm.

Las muestras fueron procesadas a una nevera de -20°C, posteriormente se cuantificaron en HPLC con una columna de azúcares SHODEX SH1011, donde se identificaron datos de concentración de glucosa, almidón, ácido acético, ácido butírico, acetona, etanol, y butanol para el caso de las cepas usadas como referencia *C acetobutylicum*, *C beijerinckii*, *C sacharoperbutylaceticum*.

Los cromatogramas fueron analizados y contrastados entre los datos resultantes de las cepas de referencia y los IDs.

Resultados

Se evaluaron todas las muestras como medida selectiva para identificar las que producían solventes, sin embargo, a todos los aislamientos se les realizaron ensayos bioquímicos para estimar bacterias fermentadoras ABE, basados en los mismos ensayos para cepas proporcionadas por el IBUN *C sacharoperbutylaceticum*, *C acetobutylicum*, *C beijerincki*. La nomenclatura de los aislados corresponde a letras generadas por el punto de recolección.

De cada punto, se tomaron muestras, los puntos se separaron por letras, a partir de estas de pendiente al número de muestra se les asignó un número, este es el relacionado. Todos estos aislados fueron tratados con medio diferencial y con limitación de O₂ para limitar su crecimiento, y hacer una selección para los ensayos de fermentación.

A continuación, se muestran los resultados para las pruebas bioquímicas de los aislados

Tabla 1 Relación de las pruebas bioquímicas realizadas a todos los IDs de los aislados en genera

Prueba de bioquímica	Catalasa	Hidrolisis de la gelatina	Degradación de celulosa	Indol	Hidrolisis del almidón	Producción de acetona
P2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO
P4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO
P6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO
M1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVA	POSITIVO
M2	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVA	POSITIVO
M3	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVA	POSITIVO
M4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO
M5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO
M6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
M7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
M8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO

M9	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
M10	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
A1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	POSITIVA
A2	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVA	POSITIVA
A3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	POSITIVO
A4	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	POSITIVO
A5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
A6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
A7	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
A8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
A9	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
A10	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
B1	NEGATIVO	POSITIVA	POSITIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
B2	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
B3	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO

**EVALUACIÓN DE BACTERIAS FERMENTADORAS ABE DE SUELO
RIZOSFÉRICO PARA PRODUCCIÓN DE SOLVENTES**

B4	POSITIVO	POSITIVA	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
B5	POSITIVO	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
B6	POSITIVO	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVO	NEGATIVA	POSITIVO
B7	POSITIVO	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVO	NEGATIVA	POSITIVO
B8	POSITIVO	POSITIVA	NEGATIVA	POSITIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
B9	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	POSITIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
C1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	POSITIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
C2	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
C3	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
C4	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
C5	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
C6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
C7	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
C8	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO

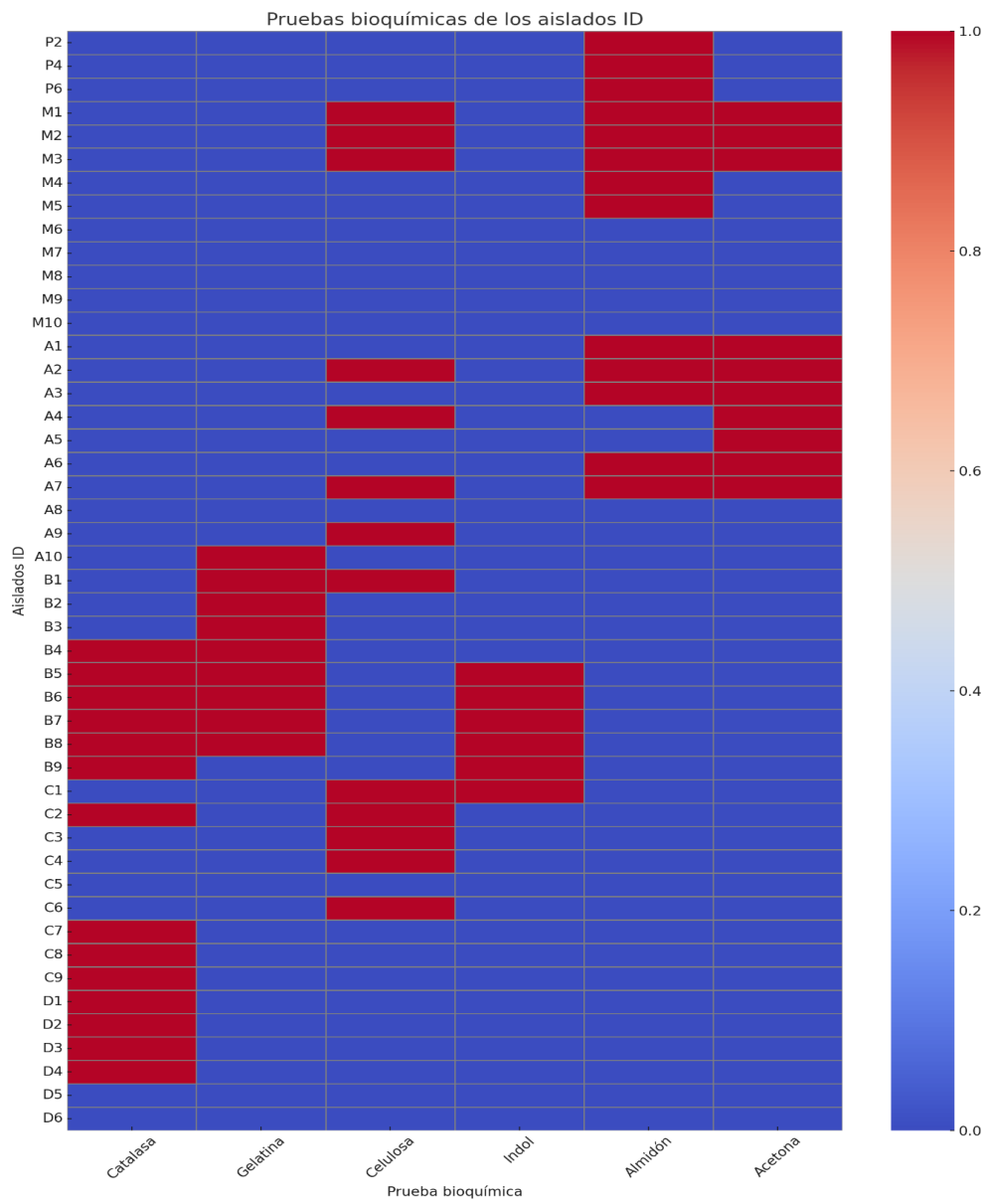
C9	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
D1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
D2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
D3	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
D4	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
D5	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO	NEGATIVA	NEGATIVO
D6	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Aunque la selección final de las cepas para los experimentos se basó principalmente en su capacidad para hidrolizar almidón y producir acetona, se llevó a cabo una serie de pruebas bioquímicas adicionales con el objetivo de obtener una caracterización más completa de los aislados. Estas pruebas permitieron identificar diversas capacidades metabólicas y enzimáticas de las bacterias, proporcionando información valiosa sobre su potencial en diferentes condiciones y aplicaciones. Además, una caracterización bioquímica detallada es fundamental para la identificación precisa de las especies bacterianas y para comprender mejor su comportamiento en procesos fermentativos.

La realización de estas pruebas también facilitó la comparación de los aislados con cepas de referencia y con datos existentes en la literatura científica. Al documentar las características bioquímicas de los aislados, se desarrolló una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones industriales, permitiendo una selección más informada de cepas para procesos específicos. En resumen, aunque la selección para los experimentos se centró en dos pruebas clave, la realización de un conjunto más amplio de pruebas bioquímicas fue esencial para una comprensión integral de las capacidades y el potencial de los aislados estudiados.

Los IDs seleccionados son **M₁, M₂, M₃, M₄, M₅, P₂, P₄, P₆, A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆, A₇**, ya que estos dieron positivo para producción de acetona e hidrólisis del almidón, además presentaban características similares a las cepas de referencia estudiadas.

Figura 10 Heatmap para pruebas bioquímicas de los IDs



En cuanto a las pruebas bioquímicas de los usados como patrones a continuación se indican:

Tabla 2 Relación de pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de referencia

PRUEBA	CATALASA	HIDROLISIS DE GELATINA	DEGRADACIÓN DE CELULOSA	INDOL	HIDROLISIS DE ALMIDON	PRODUCCIÓN DE ACETONA
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	POSITIVA	POSITIVA
<i>C. sacharoperbutylacetonicum</i>	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	POSITIVA	POSITIVA
<i>C. beijerinckii</i>	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	NEGATIVA	POSITIVA	POSITIVA

De los aislados se seleccionaron 15 que poseían las características de hidrolizar almidón y producción de acetona para realizar tinción de Gram, y tinción de esporas.

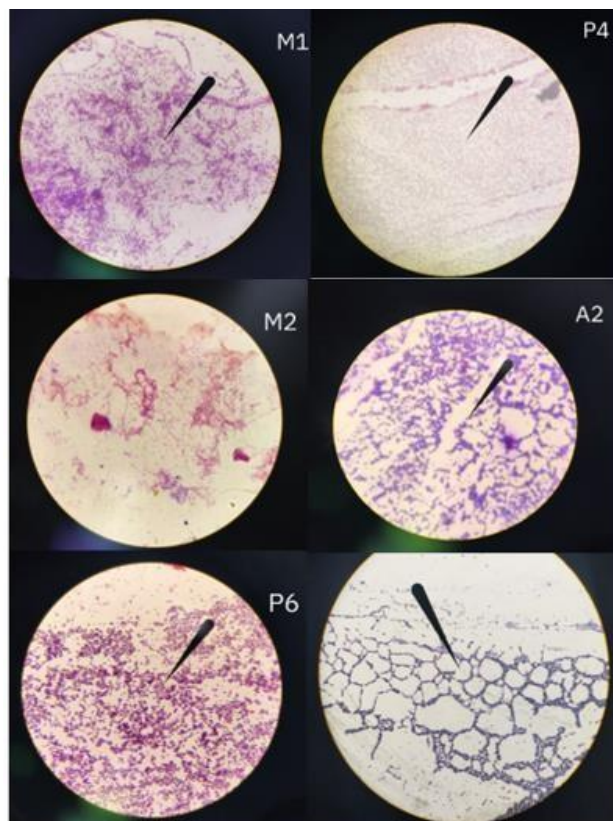
Tinción de gram

Se realizó tinción de gran para rodos los aislados que se pudieron sembrar en placa, de manera que se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3 Clasificación de gran para los IDs escogidos

IDs	Prueba de Gram
P2	Gram +
P4	Gram +
P6	Gram -
M1	Gram +
M2	Gram +
M3	Gram +
M4	Gram -
M5	Gram -
A1	Gram +
A2	Gram +
A3	Gram +
A4	Gram +
A5	Gram +
A6	Gram +
A7	Gram +

Figura 11 Algunas fotografías de las tinciones de gran, realizadas



A partir de los anteriores ensayos bioquímicos se procedió al proceso de fermentación que se dividió en dos fases; crecimiento de los aislamientos y cepas y fermentación oscura.

Morfología macroscópica

A continuación, se muestran algunas de las formaciones en placa que se presentaron en varios de los aislados

Figura 12 Crecimiento de colonias en placa en jarra de anaerobiosis a 37°C durante 24h

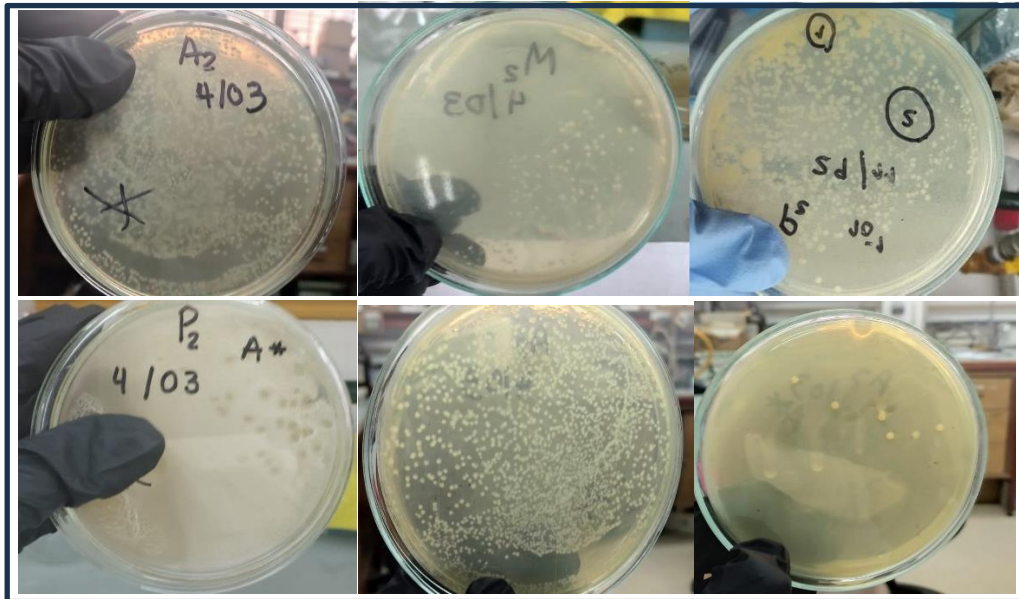
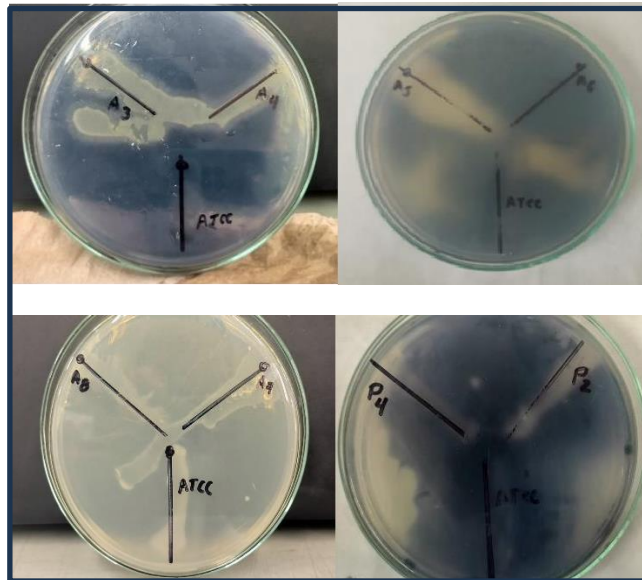


Figura 13 Ejemplos de algunos aislados para bioquímicas, positivo para hidrólisis de la gelatina

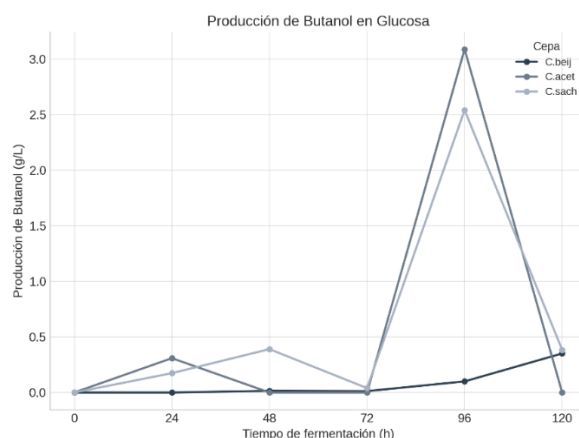


Curva de crecimiento de las cepas de referencia

Las cepas usadas como controles se evaluaron en para cada tiempo de fermentación tras tener como medio de crecimiento con medio RCM y medio de fermentación con fuente de

Carbono principal, También se evaluaron las cepas con los medios de dos de los diferentes almidones; batata, ñame, arracacha y papa. A continuación, se mostrarán las curvas de crecimiento de estas, indicando como *C. acetobutylicum*, *C. beijerincki*, y *C. saccharoperbutylacetonicum*, crecen a partir de medios con almidones, de acuerdo con sus características distintivas en el metabolismo.

Figura 14 Producción de ButOH en cepas de referencia con glucosa



La cinética de la fermentación ABE mostró diferencias notables entre glucosa y almidones. En medios con glucosa (figura 14), las cepas *C. acetobutylicum* y *C. saccharoperbutylacetonicum* alcanzaron concentraciones máximas hacia las 96 h (3,09 y 2,54 g/L de butanol, respectivamente), mientras que *C. beijerinckii* incrementó lentamente su producción hasta 120 h (0,35 g/L). En contraste, en medios con almidones la acumulación de butanol fue más gradual y retardada. Por ejemplo, *C. saccharoperbutylacetonicum* alcanzó 1,44 g/L en arracacha y 1,76 g/L en ñame cerca de 96 h, y sólo 0,40 g/L en batata al final del experimento. *C. beijerinckii* presentó picos tardíos en ñame (~1,10 g/L a 96 h) pero muy baja producción en arracacha (~0,157 g/L a 120 h). En papa la producción fue prácticamente nula, *C. acetobutylicum* sólo 0,0033 g/L. En general, la glucosa indujo picos de butanol más pronunciados y tempranos, mientras que los almidones mostraron curvas de fermentación más aplanadas. Esto concuerda con informes previos: *C. saccharoperbutylacetonicum* es capaz de fermentar tanto almidón como glucosa con alta eficiencia, lo que explica su desempeño relativamente bueno en ambos medios.

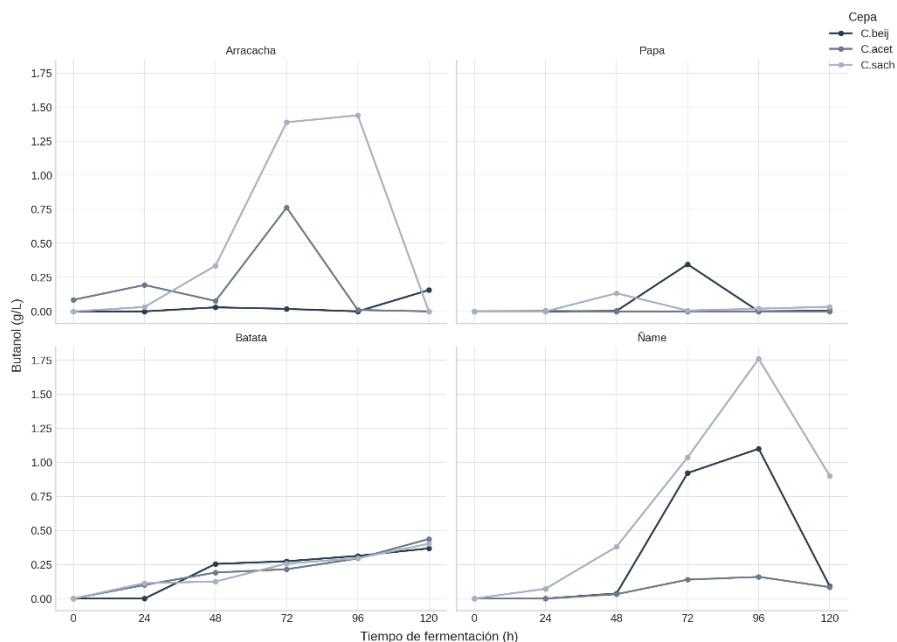
Al comparar los valores máximos de butanol, se observa que los sustratos más simples dieron los rendimientos absolutos mayores. Con glucosa, *C. acetobutylicum* produjo el valor más alto (3,09 g/L) y *C. saccharoperbutylacetonicum* el segundo (2,54 g/L), mientras que *C. beijerinckii* sólo alcanzó ~0,35 g/L. En medios amiláceos ninguno superó estos picos: el mayor rendimiento fue ~1,76 g/L (los 39 % del máximo con glucosa) obtenido por *C. saccharoperbutylacetonicum* en ñame. Con arracacha este mismo cultivo llegó a 1,44 g/L, con batata 0,40 g/L, y con papa prácticamente 0 (pico ~0,346 g/L con *C. beijerinckii*). En síntesis, la glucosa permitió rendimientos de butanol muy superiores. Estas observaciones están en línea con estudios previos; Castro et al. (2024) encontraron que el almidón de ñame generó los mayores niveles de butanol, hasta 2 g/L en cepas eficaces, lo cual es consistente con nuestros resultados donde los almidones más eficientes (ñame, arracacha) produjeron menos de la mitad del butanol obtenido con glucosa.

Las tres cepas mostraron perfiles de fermentación distintos según el sustrato. *C. acetobutylicum* demostró ser especialista en glucosa: sólo en ese medio alcanzó un pico alto (3,09 g/L) y en los almidones sus rendimientos fueron muy bajos. Por el contrario, *C. saccharoperbutylacetonicum* fermentó eficazmente ambos tipos de sustrato: además del alto rendimiento en glucosa 2,54 g/L, produjo cantidades sustanciales de butanol en ñame y arracacha 1,76 y 1,44 g/L, y moderadas en batata 0,40 g/L. Este comportamiento coincide con informes que señalan que *C. saccharoperbutylacetonicum* secreta enzimas amilolíticas muy activas, permitiéndole utilizar directamente el almidón con alta eficiencia.

C. beijerinckii, por último, mostró un perfil intermedio: produjo más butanol en los almidones que en glucosa, sugiriendo una mejor adaptación a sustratos amiláceos de tipo tubérculo. En conjunto, estos datos indican que *C. acetobutylicum* responde mejor a fuentes de carbono simples como la glucosa, mientras que *C. saccharoperbutylacetonicum* y *C. beijerinckii* pueden aprovechar relativamente bien ciertos almidones especialmente ñame y arracacha. De hecho, estudios comparativos reportan que *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 produjo ~6,04 g/L de butanol con almidón puro (1,33–2,30 veces lo de *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii*), confirmando su capacidad superior para hidrolizar y fermentar estos polisacáridos.

La glucosa resultó el sustrato más eficiente para maximizar la producción de butanol en las cepas de referencia. Sin embargo, entre los almidones evaluados el ñame se perfila como el más prometedor: fue el único que permitió acercarse a rendimientos significativos (~1,76 g/L con *C. saccharoperbutylacetonicum*), mientras que el almidón de arracacha quedó en 1,44 g/L y batata/papa en 0,40 g/L. En términos de % de recuperación, ñame alcanzó cerca del 58 % del butanol obtenido en glucosa. Estos datos sugieren que, aunque la fermentación con glucosa produce más butanol absoluto, el uso de almidones nativos de tubérculos (principalmente ñame y arracacha) ofrece un rendimiento relativamente alto y presenta ventajas de sostenibilidad. En efecto, la literatura destaca la viabilidad del almidón de ñame como fuente de carbono preferente en fermentación ABE debido a sus elevados rendimientos de butanol. En conclusión, según nuestros datos, la glucosa es la fuente de carbono más eficiente en términos de rendimiento puro, pero el almidón de ñame emerge como el sustrato amiláceo más prometedor para la producción de butanol, logrando concentraciones notablemente mayores que otros almidones locales.

Figura 15 Producción de ButOH en cepas de referencia con los medios de cultivo con diversos almidones



Producción de butanol de IDs seleccionados para los medios de producción

A continuación, se muestran curvas de producción de butanol, por aislado indicando las diferencias de crecimiento entre las fuentes de Carbono, y las cepas de referencia con medio T y G descrito como ideal para la producción de solventes en *Clostridium sp.*

Se calcularon los rendimientos de producción de butanol (Yp/s) para cada cepa aislada, usando la concentración final de butanol obtenida en la fermentación y asumiendo un consumo de 20 g/L de sustrato (glucosa o equivalente). La tabla 5 resume, para cada cepa aislada, la concentración de butanol alcanzada (g/L), el rendimiento Yp/s correspondiente (gramos de butanol producidos por gramo de sustrato inicial) y un valor de referencia tomado de la literatura para cepas patrón bajo condiciones estándares, con el cual comparar dichos rendimientos.

Tabla 4 Concentración final de butanol (g/L) y rendimiento Yp/s (g butanol/g sustrato) para las cepas

Cepa	Butanol (g/L)	Yp/s (g/g)	Referencia (cepa patrón)	Cita de contraste
M1	1,25	0,062	<i>C. acetobutylicum</i> – Yp/s ≈0,20 g/g (glucosa)	Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by clostridia. <i>Biotechnology and Bioengineering</i> , 101(2), 209–228.
M2	1,73	0,087	<i>C. acetobutylicum</i> – Yp/s ≈0,24 g/g (mejorado)	Qureshi, N., Saha, B. C., Hector, R. E., Hughes, S., & Cotta, M. A. (2010). Butanol production from wheat straw hydrolysate using <i>Clostridium beijerinckii</i> . <i>Biomass and Bioenergy</i> , 34(4), 559–565.
M3	1,72	0,086	<i>C. acetobutylicum</i> – Yp/s ≈0,24 g/g (mejorado)	Zverlov, V. V., Berezina, O., Velikodvorskaya, G. A., & Schwarz, W. H. (2006). Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the

				Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. Applied Microbiology and Biotechnology, 71(5), 587–597.
M4	2,01	0,101	<i>C. beijerinckii</i> BA101 – Yp/s ≈0,32 g/g	Formanek, J., Mackie, R., & Blaschek, H. P. (1997). Enhanced butanol production by <i>Clostridium beijerinckii</i> BA101 grown in semidefined P2 medium containing 6 percent maltodextrin or glucose. Applied and Environmental Microbiology, 63(6), 2306–2310
M5	0,64	0,032	<i>C. acetobutylicum</i> – Yp/s ~0,20–0,30 g/g	Balat, M. (2017). A biodiesel production process catalyzed by the leaching of alkaline earth oxides: A response surface methodology study. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 92(5), 1094–1102.
P2	0,72	0,036	<i>C. acetobutylicum</i> – Yp/s ~0,20–0,30 g/g	Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by clostridia. Biotechnology and Bioengineering, 101(2), 209–228.
P4	0,41	0,021	<i>C. acetobutylicum</i> – Yp/s ~0,20–0,30 g/g	Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. 2017. A biodiesel production process catalyzed by the leaching of alkaline metal earths in methanol: from a model oil to microalgae lipids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 92(5) 1094-1103
P6	0,19	0,01	<i>C. acetobutylicum</i> – Yp/s ~0,13 g/g (residuo algal)	Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. 2017. A biodiesel production process catalyzed by the leaching of alkaline metal earths in methanol: from a model oil to microalgae lipids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 92(5) 1094-1103

A1	0,26	0,013	C. acetobutylicum – Yp/s ~0,20 g/g (glucosa)	Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. 2017. A biodiesel production process catalyzed by the leaching of alkaline metal earths in methanol: from a model oil to microalgae lipids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 92(5) 1094-1103
A2	0,12	0,006	C. acetobutylicum – Yp/s ~0,13 g/g (residuo algal)	Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. 2017. A biodiesel production process catalyzed by the leaching of alkaline metal earths in methanol: from a model oil to microalgae lipids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 92(5) 1094-1103
A3	0,3	0,015	C. acetobutylicum – Yp/s ~0,20 g/g (glucosa)	Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. 2017. A biodiesel production process catalyzed by the leaching of alkaline metal earths in methanol: from a model oil to microalgae lipids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 92(5) 1094-1103
A4	0,1	0,005	C. acetobutylicum – Yp/s ~0,20 g/g (glucosa)	Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. 2017. A biodiesel production process catalyzed by the leaching of alkaline metal earths in methanol: from a model oil to microalgae lipids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 92(5) 1094-1103
A5	0,33	0,016	C. acetobutylicum – Yp/s ~0,20 g/g (glucosa)	Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. 2017. A biodiesel production process catalyzed by the leaching of alkaline metal earths in methanol: from a model oil to microalgae lipids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 92(5) 1094-1103
A6	0,15	0,007	C. acetobutylicum – Yp/s ~0,20 g/g (glucosa)	Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. 2017. A biodiesel production process catalyzed by the leaching of

				alkaline metal earths in methanol: from a model oil to microalgae lipids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 92(5) 1094-1103
A7	0,22	0,011	C. acetobutylicum – Yp/s ~0,20 g/g (glucosa)	Veillette, M.; Giroir-Fendler, A.; Faucheux, N.; Heitz, M. 2017. A biodiesel production process catalyzed by the leaching of alkaline metal earths in methanol: from a model oil to microalgae lipids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 92(5) 1094-1103

Los rendimientos obtenidos a partir de los diferentes aislados en este estudio, usando arracacha como fuente de carbono, se situaron entre 0,005 g/g y 0,101 g/g. Estos valores se encuentran por debajo de los reportados en cepas patrón optimizadas, como *Clostridium acetobutylicum* y *Clostridium beijerinckii*, utilizadas comúnmente en fermentación ABE.

Por ejemplo, George et al. (1997) reportaron un rendimiento de 0,24 g/g para *C. acetobutylicum* ATCC 824 utilizando glucosa como sustrato en condiciones optimizadas, mientras que *C. beijerinckii* BA101 ha alcanzado 0,32 g/g en condiciones similares (Qureshi & Maddox, 2005). Estos datos son consistentes con otras investigaciones donde se ha observado que el tipo de sustrato, las condiciones de fermentación y el estado fisiológico de la cepa influyen significativamente en el rendimiento (Papoutsakis, 2008; Al-Shorgani et al., 2012).

El mejor rendimiento en este estudio (0,101 g/g) fue obtenido por el aislamiento M4, lo cual representa aproximadamente un 31% del rendimiento esperado para *C. beijerinckii* BA101 en medios con glucosa pura (Qureshi & Maddox, 2005). Esto puede explicarse por la complejidad estructural del almidón de arracacha, que requiere pretratamientos para su completa hidrólisis, lo cual puede no haber sido tan eficiente como la disponibilidad inmediata de glucosa (Romero-Vargas et al., 2023). Asimismo, cepas nativas no adaptadas a condiciones industriales suelen presentar menores tolerancias a la acumulación de solventes y menores eficiencias de conversión (Jang & Lee, 2012).

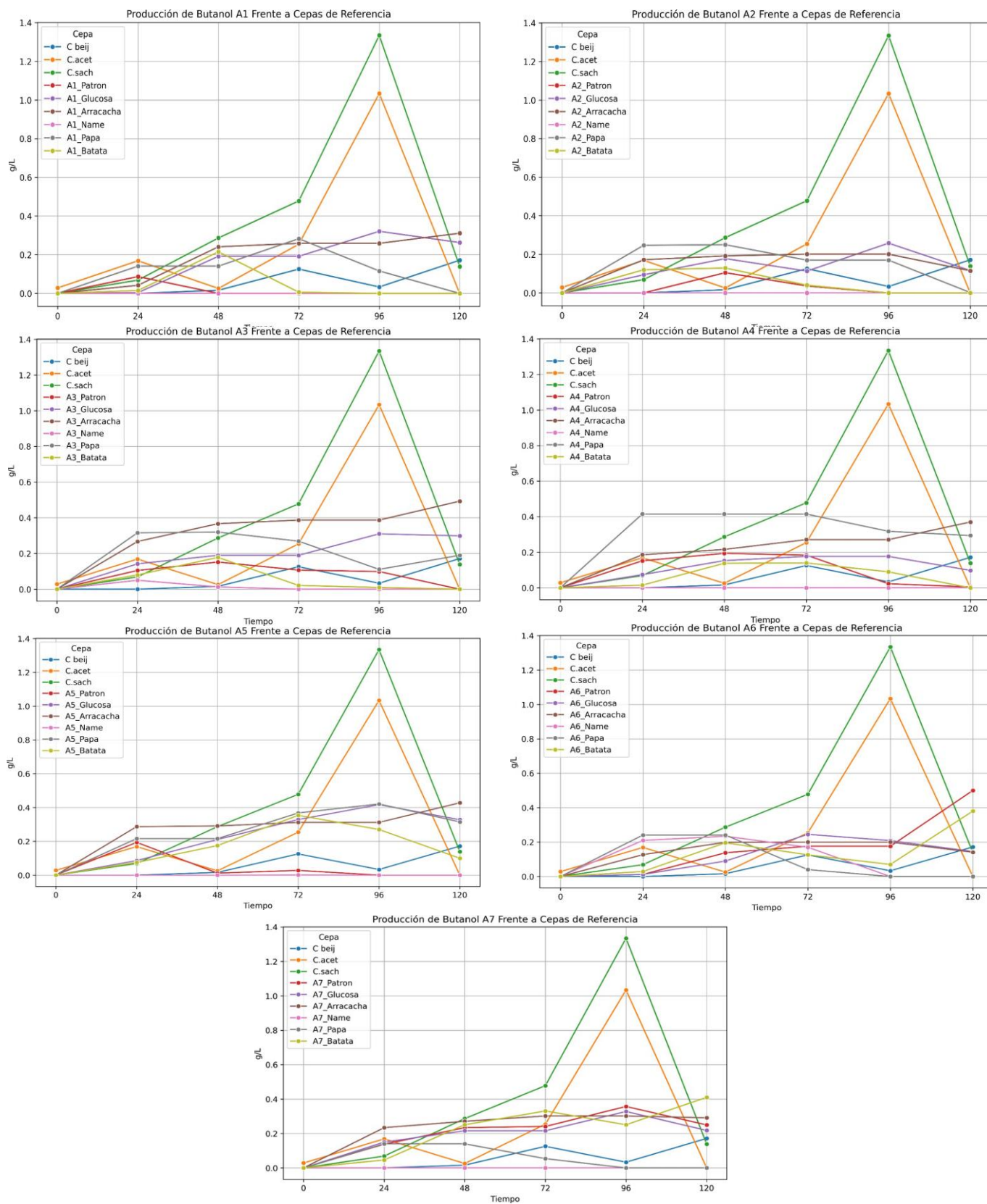
Aislados como M2 y M3, (Tabla 4) con rendimientos cercanos a 0,087 g/g, muestran un potencial prometedor, especialmente considerando que no han sido objeto de mejoramiento genético ni procesos de adaptación en cultivo continuo. Sin embargo, cepas como A4, A2 o P6, con rendimientos por debajo de 0,01 g/g, presentan una conversión escasa del sustrato, lo que podría deberse a inhibición temprana por solventes, pobre actividad enzimática amilolítica o falta de regulación adecuada de la transición ácido-solvente (Zhangnan et al., 2019).

Aunque los valores obtenidos no superan los estándares industriales actuales, sí demuestran que ciertos aislados nativos, en especial M4, M2 y M3, podrían ser candidatos para posteriores optimizaciones, ya sea por adaptación progresiva, co-cultivos, o ingeniería genética. Este tipo de estudios permite identificar biodiversidad microbiana funcional para fermentaciones en condiciones no convencionales y con residuos agroindustriales, contribuyendo al desarrollo de bioprocesos sostenibles (Orozco & Redwood, 2012). El análisis de las curvas de producción de butanol a lo largo de 120 horas para los diferentes aislados bacterianos revela patrones de fermentación altamente variables, determinados tanto por el origen del aislado como por la fuente de carbono utilizada. Las cepas de referencia, especialmente *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (C. sach), presentan un comportamiento solventogénico clásico, caracterizado por un marcado pico de producción hacia las 96 horas y una disminución posterior. Este patrón se observa con claridad en todas las gráficas y actúa como control funcional frente al cual se evaluó el desempeño de los aislados.

En la serie A, los aislados A1 a A6 mostraron producciones más discretas, con una clara estabilización entre 0.3 y 0.6 g/L hacia el final del proceso. Aislados como A5 y A6 mostraron mejor desempeño con batata y arracacha, mientras que A2 y A4 se mantuvieron por debajo de 0.3 g/L en la mayoría de los sustratos. Estos resultados indican un metabolismo menos robusto o adaptable en condiciones fermentativas, aunque todavía relevante si se consideran las condiciones de bajo costo y posible coproducción de otro metabolito.

En conjunto, los resultados indican que algunos aislados, en particular M3, M4 y M2, presentan un potencial biotecnológico competitivo frente a cepas industriales establecidas. Además, la efectividad de sustratos alternativos como arracacha, batata y papa destaca su valor en la fermentación sostenible a partir de recursos agroindustria

Figura 17 Producción de butanol de IDs serie A para los procesos de fermentación por medio de cultivo.



Entre los aislados de la serie M (asociado al punto de toma de la muestra), se destacan M2, M3 y M4 por su alta capacidad de producción de butanol. El aislado M3 sobresale con valores superiores a 4 g/L en medio con arracacha, lo cual sugiere un metabolismo altamente eficiente en la conversión de almidones nativos. Asimismo, M2 y M4 alcanzan valores por encima de 2 g/L con medios suplementados con glucosa y batata, evidenciando su potencial para procesos biotecnológicos de fermentación ABE en sustratos alternativos. En cambio, M1 y M5 presentan niveles intermedios pero sostenidos, con mejores rendimientos en glucosa y papa. El comportamiento del aislado M4 es particularmente notable por su tendencia exponencial en arracacha, alcanzando casi 6 g/L a las 120 horas, superando significativamente a las cepas estándar.

Figura 16 Producción de butanol del Id M1 seleccionados para los procesos de fermentación por medio de cultivo

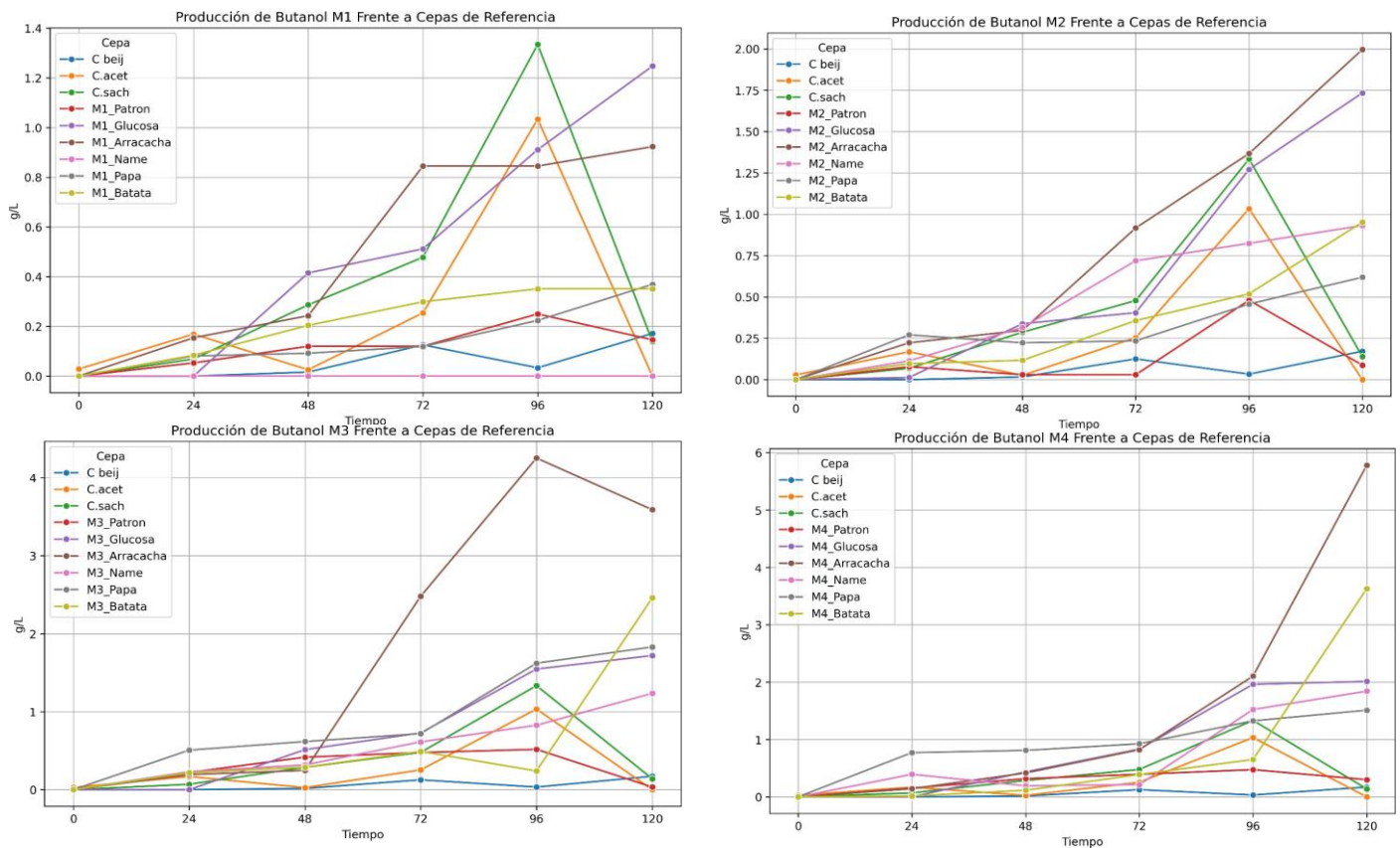
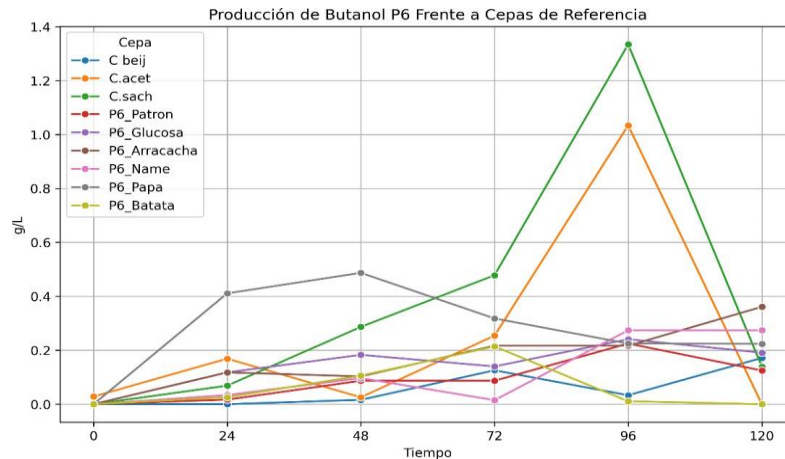


Figura 19 Producción de butanol del Id P6 seleccionados para los procesos de fermentación por medio de cultivo.



En cuanto a las cepas usadas como referencia, *C. saccharoperbutylacetonicum* es consistentemente la que alcanza el mayor pico de producción de butanol, especialmente alrededor de las 96 horas, con valores que en la mayoría de los gráficos superan 1.3–1.5 g/l. Esto sugiere que tiene una alta capacidad solventogénica.

En cuanto a *C. acetobutylicum* ATCC 824, aunque es ampliamente conocida por su papel histórico en la fermentación ABE, en los experimentos realizados se muestra, una producción moderada de butanol, muchas veces por debajo de *C. saccharoperbutylacetonicum*, en cuanto a *C. beijerinckii* se tiende a mostrar curvas más suaves y sin picos tan pronunciados.

La producción de butanol de menor magnitud, a veces similar o inferior a algunos de los aislados nativos como M2 o M3. Esto sugiere que, aunque útil, no siempre es el estándar más competitivo frente a cepas enriquecidas o adaptadas localmente.

Los aislados P2, M4 y M3 (Figura 14 y 16) alcanzan los valores más altos de DO600 (cerca de 2.5 - 3.0), lo que indica una buena capacidad de aprovechamiento de arracacha, para los aislados M4 y P2 (Figura 21 y 22) tienen un crecimiento sostenido, lo que sugiere que pueden estar adaptados a este tipo de sustrato y M3 también muestra un buen desempeño, aunque su curva es menos estable que en el medio de glucosa. A1, A6 y P6 muestran crecimientos bajos, lo que indica que no

utilizan bien la arracacha como fuente de carbono. El IDs A3, que tuvo un buen desempeño en glucosa, no crece tanto en arracacha, lo que sugiere que depende de azúcares simples

En el medio de cultivo con fuente de Carbono principal ñame, se destacan los IDs M4 y A1 muestran las mayores densidades ópticas (OD600), alcanzando valores cercanos a 4.0, lo que indica una excelente adaptación al almidón de ñame. P2 y M5 también tienen buenos valores de DO600 (alrededor de 3.0-3.5), lo que sugiere una eficiente utilización del sustrato.

No obstante, los aislados como A3 y P6 presentan curvas más bajas, lo que indica que no aprovechan bien el almidón de ñame. Algunos aislados como M1 y A5 tienen un crecimiento más inestable, lo que sugiere que podrían necesitar más tiempo para adaptarse al medio. Para el medio de cultivo con fuente de Carbono principal de papa los aislados A1 y A6 muestran los valores más altos de OD600 (~3.5), lo que indica una gran capacidad para metabolizar almidón de papa. Los IDs P4, M7 y P2 también presentan un crecimiento alto (~2.5-3.0), por lo que pueden aprovechar bien este sustrato.

Aun así, los aislados como A5 y A7 tienen valores bajos de OD600, lo que indica poca eficiencia en el uso de almidón de papa. M4 y M3, que fueron buenos en otros medios como glucosa o arracacha, aquí presentan un crecimiento más bajo, lo que sugiere que no se adaptan bien a este sustrato.

Por último, el medio relacionado con la fuente de Carbono principal de batata, indica que los IDs A1 y A6 alcanzan las mayores densidades ópticas (DO600 ~3.5-3.7), lo que indica que pueden aprovechar bien la batata, y siguiendo con los aislados M4 y P4 también muestran buenos valores (~2.5-3.0), lo que sugiere que pueden procesar este sustrato eficientemente. En cuanto a los aislados M1 y A7 presentan los valores más bajos de DO600, lo que indica que su metabolismo no se adapta bien al almidón de batata, y por parte de M3 y P6 tienen un crecimiento más inestable, lo que puede significar que su eficiencia en este sustrato es limitada.

Análisis de Curvas de Crecimiento

A continuación se destacan las curvas de crecimiento por separado de los IDs seleccionados para este estudio, el medio que se grafica aquí es RCM ya que así es posible graficar y comparar cada uno de los aislados con datos de las cepas de referencia indicadas.

Los aislados de las series A y P (obtenidos de fermentaciones con almidón de residuos agrícolas) muestran curvas de crecimiento celular comparables a las de las cepas patrón analizadas. En experimentos controlados de fermentación ABE con almidón como fuente de carbono, estos aislados tuvieron fases logarítmicas y estacionarias que siguen el patrón bifásico típico, sin anomalías significativas en la cinética de crecimiento. De hecho, en términos de biomasa alcanzada y tiempos de duplicación, las cepas aisladas A y P resultaron competitivas frente a las cepas de referencia tradicionales. Por ejemplo, en fermentaciones de 120 h con almidón extraído de residuos (papa, arracacha, ñame, etc.), los aislados A y P lograron crecimientos robustos durante las primeras 24 h, consumiendo los azúcares liberados del almidón y entrando en fase estacionaria con densidades celulares comparables a *C. acetobutylicum* ATCC 824 o *C. beijerinckii* bajo las mismas condiciones. Esto sugiere que la eficiencia de conversión de sustrato a biomasa de los aislados es similar a la de las cepas patrón. Un aspecto notable es que los aislados A y P fueron obtenidos de entornos naturales (suelos rizosféricos) y probablemente están adaptados a utilizar polímeros como el almidón. Este hecho concuerda con el desempeño observado: ambos aislados crecieron eficazmente sobre almidón como única fuente de carbono, indicando producción de enzimas amilolíticas comparable a la de *C. saccharoperacetonicum* u otras especies amilolíticas. En la fase exponencial, los aislados mostraron tasas de crecimiento específicas del mismo orden que las cepas ATCC, alcanzando sus máximos de biomasa entre 18 y 30 horas dependiendo del tipo de almidón y las condiciones.

Al igual que las cepas patrón, los aislados entraron en fase solventogénica tras la caída de pH asociada a la acidogénesis, sin continuar creciendo en densidad, pero manteniendo células viables durante la producción de solventes. No se observó en

ellos un acid crash prematuro, lo que sugiere que sus curvas de pH y crecimiento estuvieron bien sincronizadas para permitir la transición a solventogénesis, tal como ocurre en cepas bien estudiadas

En términos cuantitativos, si comparamos las biomásas máximas: los aislados dentro de las series A y P alcanzaron valores cercanos a 2–4 g/L en medio con almidón de ñame, mientras que *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii* de referencia rondaron 3–5 g/L en medios equivalentes (glucosa o almidón) según la literatura (Feldmane et al., 2024; Branská et al., 2018)

Estas pequeñas diferencias pueden deberse a variaciones en la eficiencia de hidrólisis del almidón o en tolerancia a productos, pero en general las curvas de crecimiento son del mismo orden de magnitud. Asimismo, el momento de inicio de la fase estacionaria fue similar: todos los cultivos (aislados y patrones) agotaron la mayor parte del sustrato alrededor de las 24 h, entrando entonces en fase estacionaria/productiva. Cabe resaltar que los aislados mostraron menor degeneración o pérdida de capacidad solventógena durante los sucesivos subcultivos en almidón, comparado con algunas cepas control que pueden sufrir degeneración. Esto implica que mantuvieron un crecimiento sostenido y consistente en sus curvas. Al final de la fermentación (≥ 72 h), tanto aislados como cepas patrón presentaron disminución de células vegetativas por esporulación; sin embargo, dado que los aislados derivan de ambientes naturales, podrían tener cierta resistencia a la autólisis, resultando en una biomasa residual viable ligeramente mayor al término del proceso. En cualquier caso, los patrones de crecimiento celular de A y P reflejan datos similares a los de las cepas *Clostridium* solventogénicas, confirmando que su comportamiento metabólico es análogo en presencia de sustratos amiláceos. Esto está respaldado por la evidencia de que las cepas aisladas fueron igual de eficientes que las de referencia en la producción de butanol a partir de almidón (produjeron hasta ~2 g/L de butanol con almidón de ñame, similar a *C. beijerinckii* y *C. acetobutylicum* bajo las mismas condiciones) – logro posible solo con un crecimiento celular adecuado en la fase acidogénica inicial.

En conclusión, las curvas de crecimiento (biomasa vs. tiempo) de los aislados A y P se alinean fuertemente con las de *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* y *C. saccharoperacetonicum*, mostrando fases exponenciales rápidas seguidas de fases estacionarias asociadas a solventogénesis, con niveles de biomasa comparables y una eficiente utilización del almidón como fuente de carbono.

Las referencias recientes de fermentaciones ABE respaldan estos hallazgos,

demostrando que, dentro de los últimos años, tanto cepas patrón como nuevas cepas aisladas pueden exhibir curvas de crecimiento muy similares cuando fermentan sustratos amiláceos bajo condiciones optimizadas.

Al observar las siguientes gráficas, se identifican distintas tendencias en el crecimiento bacteriano.

Figura 20 Curvas de crecimiento de los Id A comparados con las cepas de referencia

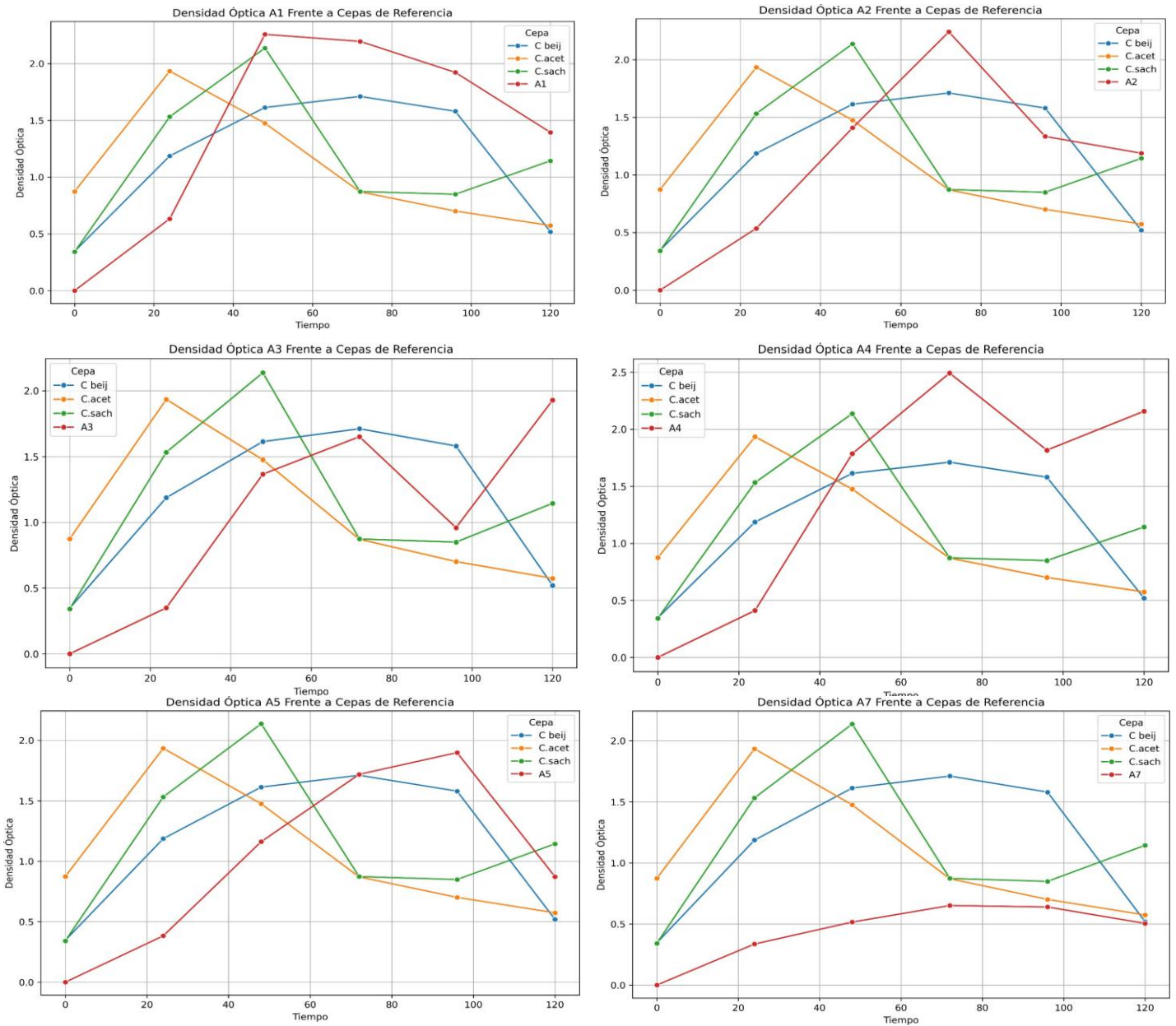
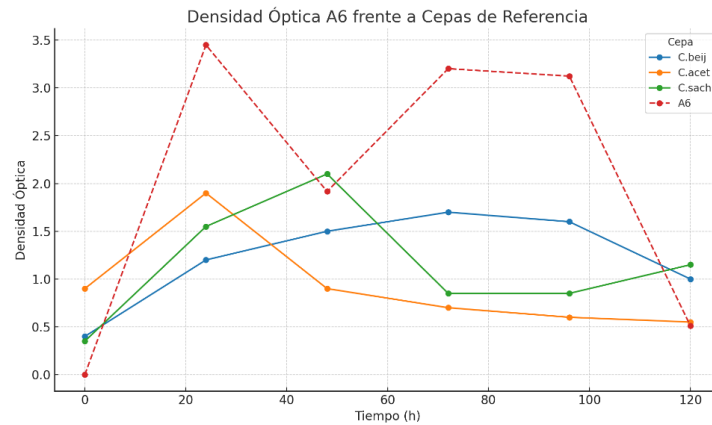


Figura 21 Curvas de crecimiento del Id A7 comparada con las cepas de referencia



Con respecto a los IDs M3 y M4 muestran las mayores densidades ópticas en la fase exponencial y una caída tardía en la curva, lo que indica que podrían estar generando más biomasa y tener una fase solventogénica más prolongada. En cuanto los IDs P2 y A7 también muestran buen crecimiento, pero su OD 600 no es tan alta como la de M3 y M4, además no es claro si están metabolizando las fuentes de Carbono que hay, ya que no parece llegar a una fase logarítmica clara. Las cepas como A1 y P6 presentan menor crecimiento y una fase estacionaria poco prolongada, lo que indica menor eficiencia en la fermentación.

Figura 22 Curvas de crecimiento de los Id M1 – M2 comparada con las cepas de referencia

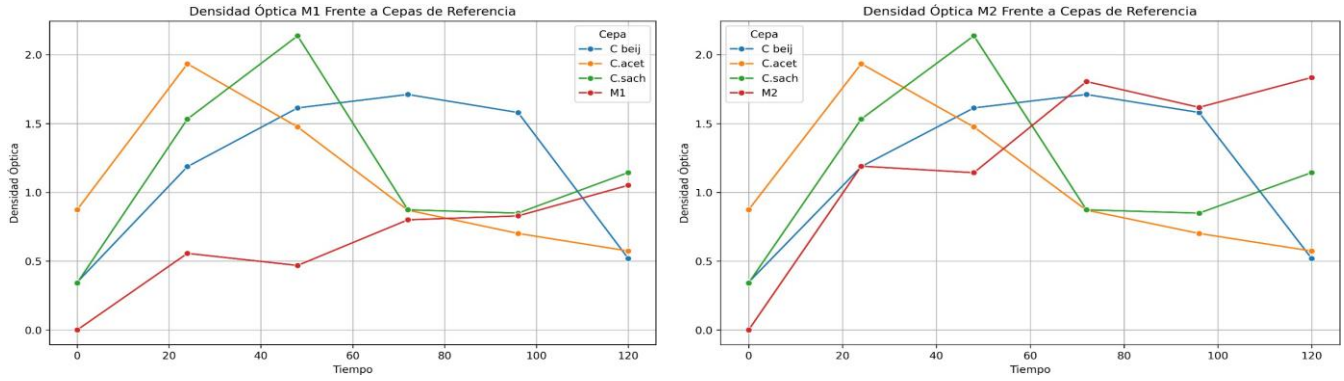


Figura 23 Curvas de crecimiento del Id M3 – M4 – M5 comparada con las cepas de referencia

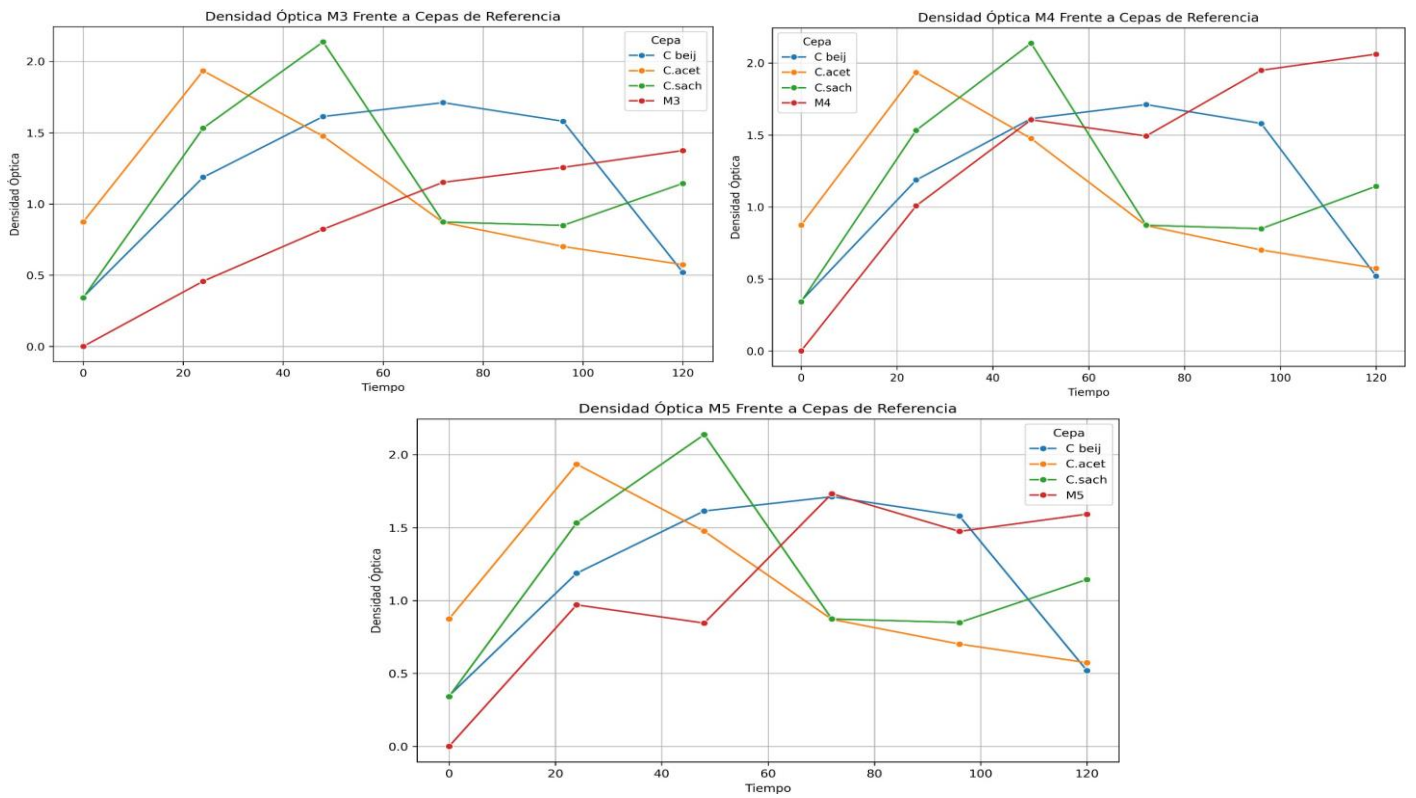


Figura 24 Curvas de crecimiento del Id P2 y P4 comparada con las cepas de referencia

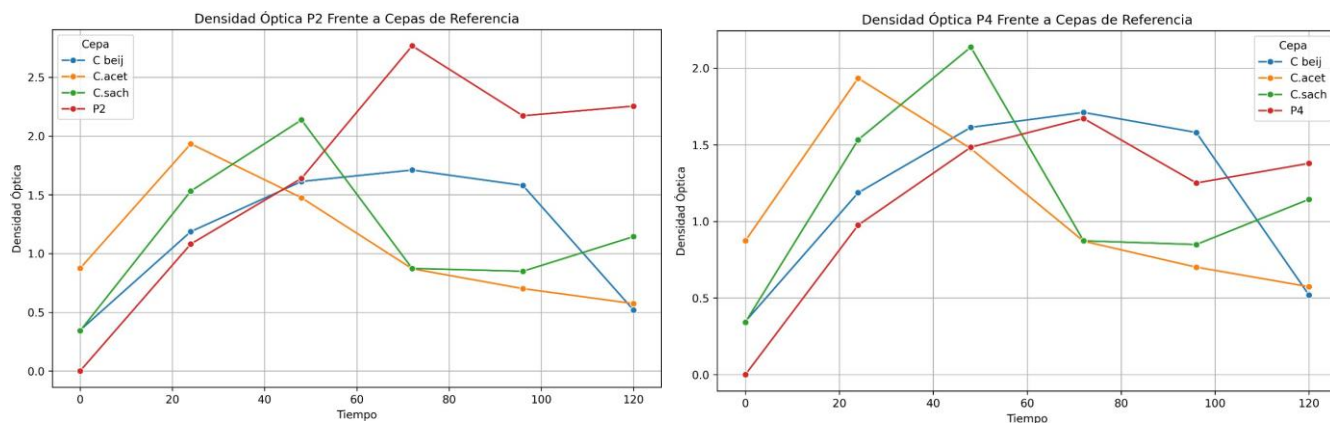
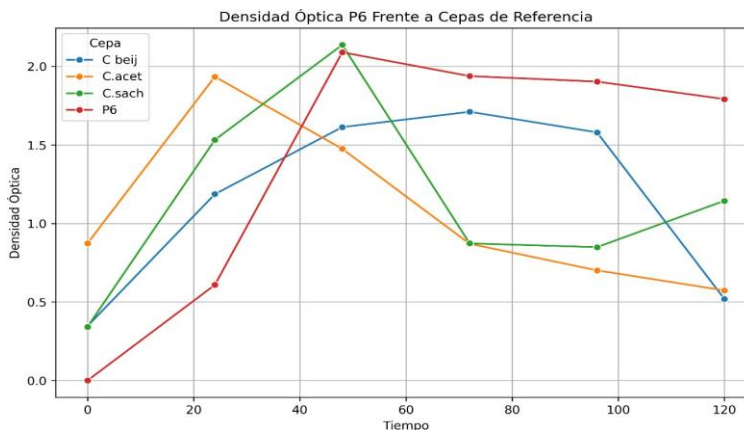


Figura 25 Curva de crecimiento del Id P6 comparada con las cepas de referencia



Algunos aislados mostraron curvas de crecimiento equiparables o incluso superiores en densidad celular final respecto a las cepas de referencia. Destacan en este grupo, por ejemplo, los aislados A6, M4 y P6, cuyos valores de densidad óptica al final del cultivo (OD ~2.8–3.5) fueron tan altos o mayores que los máximos de *Clostridium* de referencia. Estas cepas lograron una fase exponencial sostenida y una biomasa abundante en RCM, lo cual indica una excelente adaptación al medio y eficiente utilización de los nutrientes. Es posible que su tasa de crecimiento (μ) sea comparable a la de *C. acetobutylicum* o incluso mayor en las condiciones dadas, permitiéndoles acumular más células antes de agotar el sustrato. Un aspecto para considerar es que una mayor biomasa final podría sugerir también diferencias metabólicas, es decir si el aislado tiene menor tendencia a esporular o autolisarse durante la fase estacionaria, mantendrá más células viables por más tiempo.

De hecho, *C. saccharoperbutylacetonicum* se caracteriza por una esporulación reducida en comparación con *C. acetobutylicum*, lo que favorece densidades celulares más altas al final de la fermentación. Algo similar podría ocurrir con ciertos aislados: podrían estar menos sujetos al desencadenamiento de la esporulación, permaneciendo en estado vegetativo y prolongando la fase estacionaria sin declive abrupto.

Otra posibilidad es que estos aislados produzcan menores cantidades de solventes o subproductos tóxicos durante el cultivo, reduciendo el estrés químico. Una producción solventogénica moderada implicaría que menos butanol (tóxico a $> \sim 13\text{--}14$ g/L) se acumula, permitiendo a las células seguir multiplicándose. No obstante, incluso si producen solventes, su tolerancia podría ser mayor. Por ejemplo, *C. beijerinckii* y *C. saccharoperbutylacetonicum* suelen resistir concentraciones de butanol similares a *C. acetobutylicum* (del orden de 8–12 g/L) antes de inhibirse significativamente, y algunos aislados ambientales pudieran tener tolerancias mejoradas.

En este sentido, los aislados A6, M4, P6 (Figuras 18, 21 y 23) demostraron un crecimiento sobresaliente en RCM, indicando alto potencial fermentativo. Su rápida utilización del sustrato sugiere una cinética eficiente. De momento, su comportamiento sugiere buena adaptación: lograron poblar el medio en igual o mayor medida que los *Clostridium* de referencia, lo cual es prometedor para su capacidad fermentativa. Estos resultados concuerdan con reportes donde cepas silvestres de *Clostridium* bien adaptadas al medio pueden alcanzar biomasa elevada; por ejemplo, ciertos aislados de *C. acetobutylicum* de origen ambiental muestran crecimientos comparables a cepas estándar cuando el medio contiene los nutrientes apropiados. En particular, si el aislado aprovecha múltiples fuentes de carbono (glucosa, almidón, péptidos de RCM) de forma eficaz, su rendimiento celular será mayor. *C. saccharoperbutylacetonicum* por ejemplo puede metabolizar una amplia variedad de sustratos, desde azúcares simples hasta almidón, lo que le otorga versatilidad para crecer vigorosamente.

Desde la perspectiva fisiológica, es posible que estos aislados robustos logren entrar en fase solventogénica sin detenerse por los ácidos. Un crecimiento rápido conlleva acumulación veloz de ácidos en la fase exponencial; si la cepa no gestiona bien esa transición, puede ocurrir el fenómeno conocido como “acid crash”, donde el pH cae tanto que inhibe el crecimiento antes de que inicie la producción de solventes.

Sin embargo, nuestros aislados de alto rendimiento claramente superaron ese punto, continuando su proliferación hasta agotar el sustrato. Esto sugiere que activaron adecuadamente la solventogénesis a tiempo (reasimilando ácidos y neutralizando el pH) o bien poseen cierta tolerancia intrínseca a pH más ácido.

En cualquier caso, el hecho de alcanzar $OD > 2$ indica que completaron la secuencia lag-exponencial-estacionaria de modo exitoso. Es probable que hacia el final del cultivo también estas poblaciones entren en declive (por falta de nutrientes y estrés de solventes); si extendiéramos el tiempo más allá de 120 h, quizá veríamos descender sus curvas como es típico en *Clostridium*. Vale resaltar que uno de los aislados (A6) superó incluso la OD máxima de cualquier referencia, lo cual es notable. Podría tratarse de un organismo particularmente bien adaptado o posiblemente una variante hipermetabólica. Investigaciones previas han logrado mejorar cepas de *Clostridium* mediante adaptación en laboratorio para que crezcan más rápido o toleren mejor ciertos ambientes.

En síntesis, este grupo de aislados exhibe dinámicas de crecimiento similares a las cepas ABE tradicionales, con fases exponenciales claras y altas productividades celulares, indicando que son candidatos prometedores para fermentación (asumiendo que cuentan con las rutas solventogénicas activas).

En un punto medio se encuentran aquellos aislados cuyo crecimiento, sin ser tan elevado como el de las cepas referencia o los aislados robustos, tampoco fue nulo. En esta categoría clasificamos la mayoría de los aislados que alcanzaron densidades ópticas finales aproximadamente entre ~ 1.0 y 2.0 . Por ejemplo, A1, M2, M3, P4 y M5 lograron OD_{600} en el rango de 1.2 – 2.0 al cabo de ~ 120 h. Sus curvas de crecimiento indican que efectivamente pasaron por una fase exponencial y llegaron a una fase estacionaria, aunque con un rendimiento de biomasa más modesto que las cepas de referencia. Varias causas pueden subyacer a este desempeño intermedio. En primer lugar, podrían tener tasas de crecimiento específicas ligeramente inferiores a las de las cepas de referencia. Es decir, su μ (h^{-1}) es menor, haciendo que tarden más en duplicar su población. Esto se traduciría en curvas más aplanadas – menos empinadas durante la fase exponencial. Es decir, si *C. acetobutylicum* tiene un tiempo de duplicación de 1 o 2 h en condiciones óptimas, quizás estos aislados duplican cada 3 a 4 h bajo las mismas condiciones, acumulando menos células en un mismo período. Un menor μ puede resultar de particularidades metabólicas (enzimas menos eficientes, rutas energéticas distintas) o de una adaptación incompleta al medio. En el caso de resultar lo segundo, es conocido que cepas recién aisladas o introducidas a un nuevo medio pueden requerir varios subcultivos para optimizar su metabolismo al entorno.

Sandoval-Espinola et al. observaron que transferencias secuenciales en un medio nuevo aumentaban gradualmente la tasa de crecimiento de *C. beijerinckii*, evidenciando la aparición de células adaptadas genéticamente al cultivo. Es posible que nuestros aislados intermedios aún estuvieran en proceso de adaptación a RCM, de modo que su primer crecimiento no fue máximo. Aun así, su capacidad de alcanzar OD 1 o 2 demuestra que sí pueden metabolizar los nutrientes de RCM y crecer de forma sostenible.

Otro factor en juego podría ser la etapa de inoculación o fase fisiológica inicial de estos cultivos. Algunos aislados podrían tener vías fermentativas desviando más flujo a productos secundarios (ácidos orgánicos u otros metabolitos) a expensas de biomasa. Si un aislado produce proporcionalmente más ácido acético y butírico durante su crecimiento, podría auto-limitarse antes de tiempo (acidificación temprana). No hasta el punto de un “crash” severo, pero sí lo suficiente para frenar el crecimiento antes de alcanzar las ODs de las cepas referencias. Esto encajaría con los resultados: aislamientos de crecimiento intermedio quizás inician solventogénesis un poco prematuramente o con menos células, estabilizando su población a OD 1 o 1.5 mientras reasimilan ácidos y producen solventes.

Sus curvas probablemente muestran una meseta estacionaria prolongada en ese rango de OD, en lugar de un pico alto seguido de declive abrupto. Dicho comportamiento estable pero moderado podría no ser desfavorable; de hecho, en fermentación ABE industrial a veces se busca evitar los crecimientos explosivos para prevenir acidificaciones drásticas. Un crecimiento más controlado puede traducirse en un proceso más manejable. Fisiológicamente, estos aislados intermedios habrían completado su ciclo de crecimiento completo en RCM: superaron la fase lag, crecieron exponencialmente hasta cierto punto, produjeron ácidos, posiblemente iniciaron solventogénesis en el caso de que realicen esta ruta y luego quedaron en equilibrio o declive ligero. No se aprecia en ellos una muerte masiva temprana; más bien, parecen persistir en fase estacionaria a un nivel de población menor que las referencias. Esto podría indicar alguna limitación nutricional específica para ellos.

Finalmente, se identificó un grupo de aislados cuyo crecimiento en RCM fue muy pobre, apenas marginal en comparación con las cepas de referencia. En este grupo están, por ejemplo, A2, A7, M1 (y en menor medida A5, que, aunque creció algo más, alcanzó solo OD = 0.68). Estos cultivos mostraron curvas casi planas o con incrementos mínimos de densidad óptica, no superando OD aprox 0.3–0.4 en 5 días, lo que indica que la población apenas se multiplicó unas cuantas veces a partir del inóculo inicial. Este resultado sugiere serios problemas de adaptación o de

metabolismo en dichas cepas bajo las condiciones empleadas.

Esto puede deberse a:

- Lag phase prolongada o esporas no germinadas: Es posible que estos aislados no llegaran realmente a salir de la fase de latencia durante el experimento. Si las células estaban en forma de esporas durmientes y tuvieron dificultad para germinar en RCM, podrían haber permanecido viables pero metabólicamente inactivas gran parte del tiempo. Un ligero aumento en OD podría deberse más a hinchamiento o hidratación de esporas que a verdadero crecimiento. Clostridium requiere condiciones reductoras y ciertos nutrientes para germinar; aunque RCM contiene Cisteína-HCl para reducir el medio, puede que algún aislado necesitara una señal germinativa específica ausente. Esto resultaría en casi nulo crecimiento.
- La incapacidad de utilizar los nutrientes disponibles: RCM provee glucosa (5 g/L) y almidón soluble (1 g/L) como fuentes de carbono, además de peptonas, extractos de levadura/carne como fuentes de aminoácidos y factores. Si un aislado no puede metabolizar eficientemente la glucosa ni el almidón, podría quedarse esencialmente sin fuente de energía aprovechable. Algunas bacterias clostridiales son estrictamente proteolíticas (degradan aminoácidos) y no fermentan azúcares; si alguno de nuestros aislados pertenece a este tipo, tal vez no obtuvo suficiente energía de las peptonas para crecer significativamente. Un indicio de esto sería que el pH del medio no haya cambiado mucho (sin fermentación de glucosa, no se generarían ácidos en cantidad). Alternativamente, si el aislado requiere un sustrato distinto, RCM sería subóptimo. Es decir, puede haber una desadaptación nutricional: el medio RCM, diseñado para clostridios fermentadores comunes, quizá no satisface las necesidades de ese aislado particular.
- Inhibición por productos propios (acid crash temprano): Cabe la posibilidad de que algunos de estos aislados sí metabolizaran un poco la glucosa inicial, pero de manera desbalanceada, produciendo ácidos rápidamente y entrando en un bloqueo por pH casi inmediato. Este fenómeno es el "acid crash" mencionado, observado clásicamente en mutantes degenerados de Clostridium que ya no pueden producir solventes. En tales casos, la OD apenas sube (porque el crecimiento se trunca temprano) y luego puede incluso bajar ligeramente conforme las pocas células activas mueren.

Algunos de nuestros aislados limitados podrían encajar en esta descripción: por ejemplo, A7 mostró una pequeña alza inicial hasta OD 0.3 o 0.4 y luego se mantuvo estancado o ligeramente declinante hacia 120 h. Esto es consistente con una acidificación prematura sin solventogénesis. Sin la conversión de ácidos a solventes, el pH no se recupera y las células no prosperan. Respaldo de esta idea se encuentra en estudios donde mutantes de *C. beijerinckii* incapaces de inducir solventogénesis exhibieron acumulación de ácido y crecimiento truncado.

- Otra posibilidad es que estos aislados no fueran en realidad *Clostridium* solventogénicos, sino otras bacterias anaerobias no adaptadas a RCM (por ejemplo, *Clostridium* no ABE o géneros distintos). De ser así, su fisiología podría ser incompatible con el medio (por requerir cofactores ausentes, etc.) resultando en poco o ningún crecimiento.

Considerando lo anterior, la evidencia apunta a problemas metabólicos intrínsecos. Desde el punto de vista de capacidad fermentativa, estos aislados de crecimiento escaso plantean dudas. Si no pueden crecer, difícilmente producirán solventes en cantidades apreciables. Podrían ser cepas “muertas” para efectos biotecnológicos en medio RCM, a menos que se encuentren condiciones específicas en las que sí prosperen (por ejemplo, diferente fuente de carbono, distintos parámetros de cultivo).

No obstante, no se debe descartar que con adaptación progresiva puedan mejorar. En trabajos con *Clostridium*, cepas inicialmente pobres se han adaptado mediante pases sucesivos: por ejemplo, un estudio halló que usar como inóculo células en fase estacionaria adaptadas aumentó 70% la producción solvente en el siguiente cultivo. Tal adaptación podría “rescatar” a un aislado lento. Sin embargo, si el problema es genético (pérdida de genes), la producción solvente no ocurrirá, aunque crezca.

Es concebible que alguno de nuestros aislados requería un pH diferente para arrancar (tal vez más ácido si provino de ambiente fermentativo ácido, o más básico si es de otro nicho). Factores como estos podrían investigarse para rescatar su crecimiento.

Análisis Comparativo de los Medios de Cultivo

Al ser analizado el crecimiento de los aislados en diferentes medios de cultivo que contienen glucosa (control), almidón de arracacha, almidón de ñame, almidón de papa y almidón de batata se realiza una comparación entre cepas de referencia y aislados. A continuación, se presenta un análisis comparativo para determinar qué medio favorece más el crecimiento bacteriano y cuál puede ser el mejor candidato para la fermentación ABE.

La Figura 24 muestra las curvas de crecimiento bacteriano, evaluadas mediante densidad óptica a 600 nm, para los distintos grupos de aislados (series A, M y P) y para las cepas de referencia *C. acetobutylicum* ATCC 824, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. beijerinckii* cultivadas en medio con glucosa como única fuente de carbono. En todos los casos, se observa la cinética clásica de crecimiento de bacterias solventogénicas en fermentación, caracterizada por una fase lag breve seguida de un incremento exponencial en la biomasa durante las primeras 24–48 horas, alcanzando un máximo entre las 48 y 72 horas según la cepa o el aislamiento. Posteriormente, en la mayoría de los perfiles se presenta una disminución progresiva en la densidad óptica a partir de las 96 horas y acentuada a las 120 horas, lo que concuerda con el inicio de la esporulación, la lisis celular y la acumulación de productos metabólicos tóxicos como ácidos y solventes (Lee et al., 2023; Zhao et al., 2019).

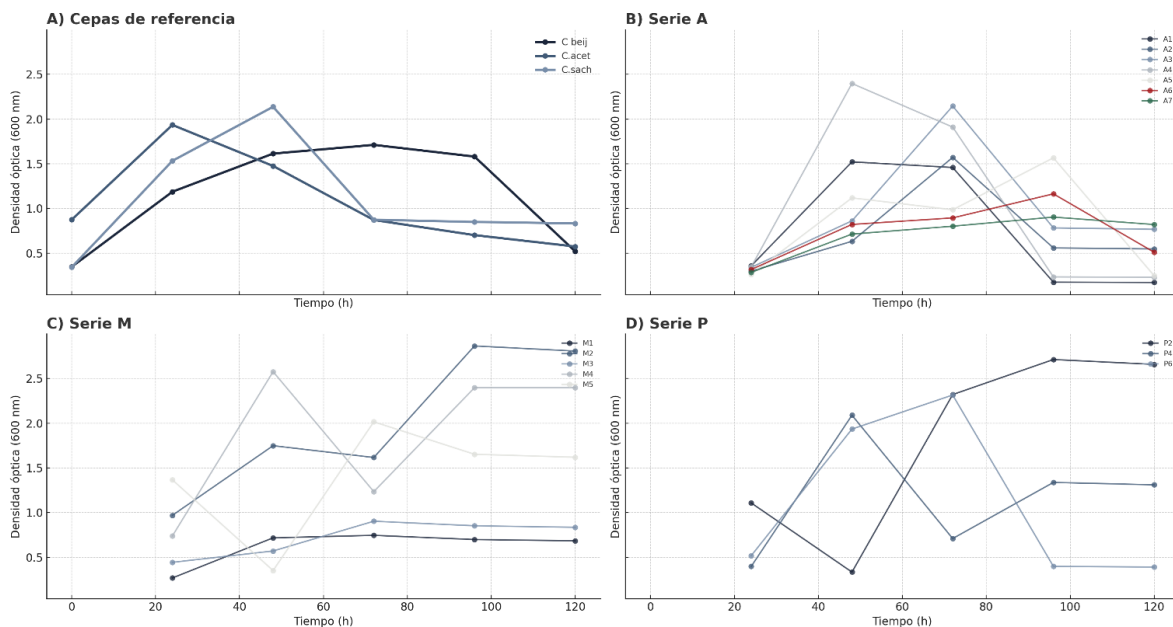
Las cepas de referencia (panel A) muestran curvas suaves, con un crecimiento robusto durante las primeras 48 horas y un descenso claro a las 120 horas. Esto confirma su comportamiento típico reportado en la literatura para fermentación ABE, donde el agotamiento de glucosa y la acumulación de butanol inducen el paso a la fase estacionaria y declive (Ntaikou et al., 2022).

Por su parte, los aislados de las series A, M y P (Figura 24) exhiben patrones similares, aunque con ciertas variaciones en la velocidad de crecimiento y el tiempo de máximo desarrollo celular.

Algunos aislados, especialmente de la serie M, alcanzan valores de densidad óptica comparables a los de las cepas patrón, lo que indica una buena capacidad de adaptación al sustrato y eficiencia fermentativa. Sin embargo, la tendencia descendente a las 120 horas es común en todos los grupos, reflejando el agotamiento de sustrato y los mecanismos de supervivencia de las bacterias bajo condiciones de estrés metabólico.

Estos resultados no solo validan la calidad de los aislados en cuanto a su aptitud fermentativa, sino que también reafirman que el diseño experimental y el seguimiento temporal realizado son consistentes con los principios descritos para fermentaciones batch en sistemas *Clostridium*-glucosa (Al-Shorgani et al., 2019; Zhang et al., 2021). La comparación directa entre series y con cepas de referencia permite identificar aislamientos candidatos para futuras aplicaciones orientadas a la producción de solventes a partir de fuentes alternativas de carbono.

Figura 26 Comparación entre IDs de la serie A, serie M, serie P con glucosa como medio de cultivo



Las cepas de referencia cultivadas en medio con glucosa muestran un patrón típico de crecimiento que inicia con una fase exponencial rápida (24–48 h) seguida por una disminución progresiva de la DO hasta las 120 h.

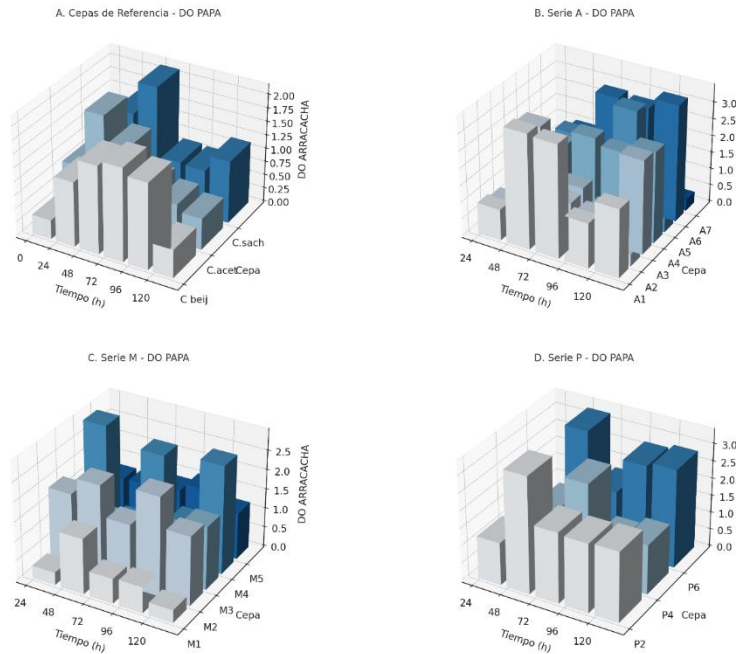
Este comportamiento sugiere que, tras el consumo inicial de glucosa, ocurre una esporulación o muerte celular que reduce la biomasa observable, fenómeno bien documentado en *Clostridium* spp. (Lee et al., 2008; Qureshi et al., 2006). La DO máxima en estas cepas ocurre entre 24 h y 48 h, con valores por encima de 2.0, lo que confirma su alta eficiencia en metabolizar glucosa durante la fase logarítmica. La disminución de biomasa posterior podría asociarse a la entrada en fase estacionaria y la activación de vías metabólicas secundarias.

Los aislados de la serie A con medio asociado al almidón de papa (Figura 25) muestran mayor variabilidad en los perfiles de crecimiento respecto a las cepas de referencia. Es el caso de IDs como A1, A4 y A6 alcanzan valores máximos de DO similares o incluso superiores a las cepas de referencia, indicando alta adaptabilidad al uso de almidón de papa como fuente de carbono. Otros aislados como A7 y A2 presentan un crecimiento limitado, lo que podría reflejar diferencias genéticas en la expresión de amilasas o en la eficiencia del transporte de azúcares (Li et al., 2013).

La serie M muestra un patrón de crecimiento intermedio donde los aislados M2 y M4 presentan DO elevadas y sostenidas, indicando eficiente hidrólisis del almidón y buena tolerancia a los productos de fermentación. Otros aislados como M1 y M3 exhiben valores más bajos, similares al grupo A2–A7. El crecimiento sostenido hasta 72–96 h sugiere que estos aislados podrían mantener la actividad metabólica durante más tiempo, posiblemente favoreciendo una producción acumulativa de solventes.

En cuanto a los aislados de la serie P presentan un comportamiento más homogéneo, con altas DO en la mayoría de los aislados (P2, P4, P6). La curva de crecimiento es similar a la observada en las cepas de referencia, con un pico entre 48 h y 72 h, seguido de una disminución a 120 h. Esto sugiere que los aislados de esta serie podrían estar mejor adaptados a las condiciones del medio o contar con mecanismos eficientes de utilización de polisacáridos.

Figura 27 Comparación entre IDs de la serie A (aislados A), serie M (aislados M), serie P (aislados P) con papa como almidón en el medio de cultivo.



En cuanto al medio de cultivo asociado al almidón de arracacha se destaca que las cepas *C. acetobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum* y *C. beijerinckii* mostraron un perfil de crecimiento característico para el medio con glucosa ya que se observa el crecimiento inicial rápido, con picos de DO alrededor de las 24–48 h, especialmente en *C. acetobutylicum*. Posteriormente, se observa una disminución gradual de la biomasa, probablemente asociada al inicio de esporulación o al estrés metabólico inducido por la acumulación de solventes. La mayoría de los aislados de esta serie A1, A3, A4, A6 (Figura 26) presentaron valores elevados de DO a las 48–72 h, lo que sugiere una buena capacidad para metabolizar el almidón de arracacha. No obstante, se observan diferencias importantes entre aislados. El caso de, A5 y A7 mostraron crecimientos bajos o irregulares, esto indica una heterogeneidad metabólica entre los aislados frente a la fuente de carbono compleja como lo es la arracacha, cuya hidrólisis depende de la producción de enzimas amilolíticas eficaces.

Para el caso de los aislados P2 y P6 destacaron por presentar los mayores niveles de biomasa, similares o incluso superiores a los de las cepas de referencia. El crecimiento fue sostenido hasta las 72 h, lo que podría indicar una fase prolongada de acidogénesis antes de que ocurra esporulación.

La buena adaptación de estos aislados puede estar asociada a una mayor actividad amilasa o a un sistema regulador eficiente frente a fuentes de carbono complejas.

En contraste, se evidencia un crecimiento más moderado comparado con las otras series, especialmente en los aislados M1, M3 y M5. Algunos aislados como M4 mostraron un perfil similar al de las cepas de referencia, con crecimiento temprano seguido de una caída progresiva en la DO. Este comportamiento sugiere que la serie M podría tener una menor capacidad para degradar y utilizar el almidón de arracacha o una respuesta más temprana a la esporulación.

En general, todos los aislados mostraron DO bajas a las 24–48 h, un marcado ascenso hacia 72–96 h y luego mesetas o leves descensos al llegar a 120 h.

- La mayoría de las cepas presentaron DO crecientes hasta las 96 h; las curvas de crecimiento coincidieron con referencias clásicas de fermentación en batch.
- Aislados como M4 y M2 mantuvieron alto crecimiento durante más tiempo, mientras P6 o A3 empezaron a declinar al superar las 96–120 h.

En el medio de ñame (Figura 27) los aislados M4 y A1 alcanzaron DO altas; en batata, A1 y A6 también mayores que lo típico en controles de referencia, indicando posibles restos de biomasa en tiempos avanzados de la fermentación. En contraste, algunas cepas de referencia exhibieron crecimiento más bajo o similar al de aislados débiles. Este desempeño superior de aislados parece deberse a una mejor adaptación enzimática al almidón de estos tubérculos. En resumen, los aislados M2, M3 y M4 destacaron por DO máximas altas y curvas sostenidas, mientras que las cepas patrón tuvieron aumentos de DO más moderados.

Figura 28 Comparación entre IDs de la serie A (aislados A), serie M (aislados M), serie P (aislados P) con arracacha como almidón en el medio de cultivo.

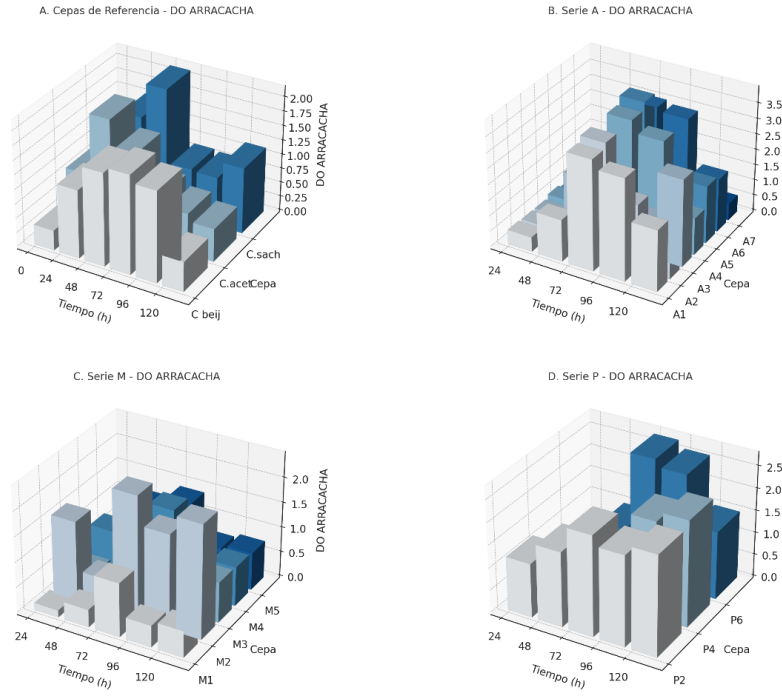
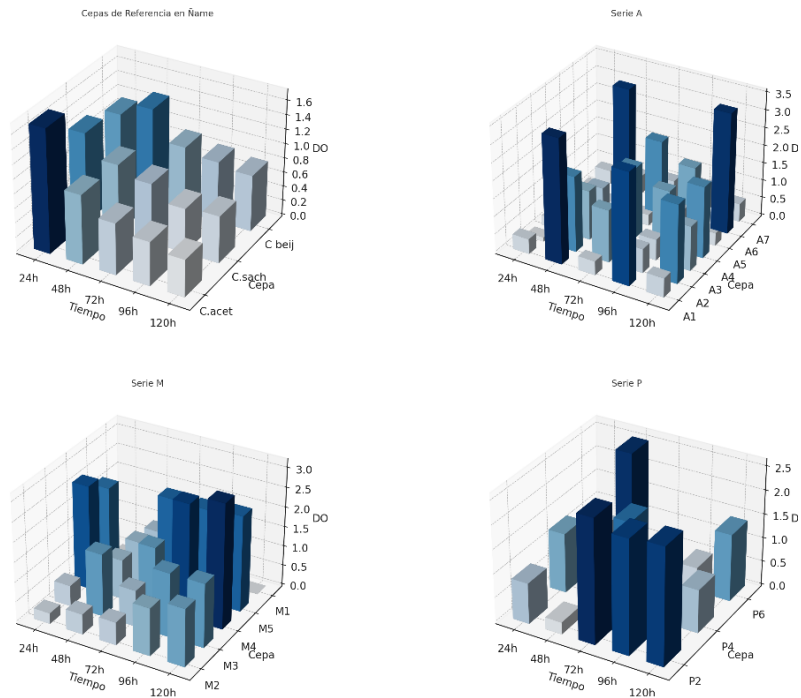


Figura 29 Comparación entre IDs de la serie A (aislados A), serie M (aislados M), serie P (aislados P) con ñame como almidón en el medio de cultivo.



Para el medio de cultivo con almidón de Batata (figura 28) los Aislados A1 y A6 alcanzaron las DO máximas. M4 y P4 también tuvieron DO elevadas, sugiriendo buena utilización de batata y degradación parcial del almidón. En cambio, cepas M1 y A7 tuvieron las DO más bajas, y M3, P6 mostraron crecimientos irregulares en batata.

En términos comparativos, en promedio los aislados degradan batata y ñame de modo similar o superior al control de almidón.

Los aislados con mayor DO reflejan la mayor actividad fermentativa en estos sustratos. En resumen:

- Serie A: Las cepas A1 y A6 mostraron las DO más altas en batata y ñame. A1 tuvo DO muy altas en ñame, papa y batata, mientras A6 fue excelente especialmente en batata. Aislados A2–A5 y A7 tuvieron desempeños moderados o bajos.
- Serie M: Las cepas M3, M4 y M2 registraron los mejores crecimientos. M4 fue alto en casi todos los sustratos (glucosa, arracacha, ñame, batata). M3 y M2 también alcanzaron DO elevadas en varios medios. Estos aislados superaron a varias referencias y se consideran “buen candidato[s] para todos los medios”. M1 y M5 tuvieron rendimientos moderados; M1 fue bajo en batata y ñame, M5 notable en ñame pero menor en batata.
- Serie P: El aislado P2 obtuvo buenas DO en arracacha, batata y papa (tabla 5 lo califica con valores “muy alto” en arracacha y “alto” en otros medios). P4 alcanzó DO altas en batata y mediana en ñame, siendo uno de los mejores de la serie P. P6 tuvo comportamientos mixtos: crecimientos decentes en arracacha pero bajos en ñame, y un pico tardío antes de declinar.

En síntesis, M4, A1, A6 y P2 aparecen como los aislados con mayor actividad fermentativa global (DO máximas más altas y curvas sostenidas).

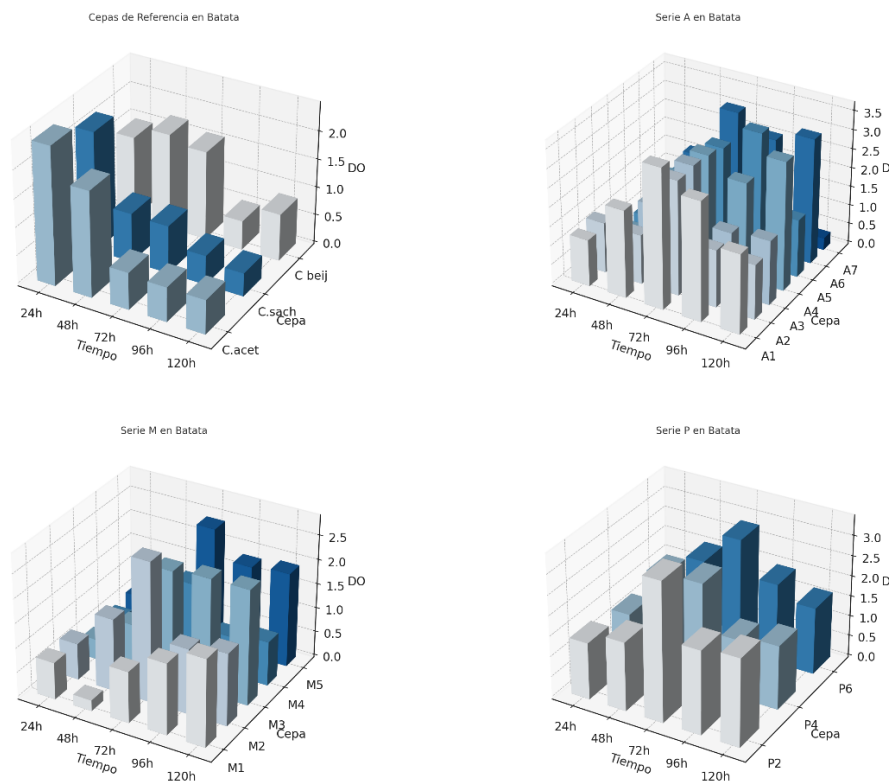
Dentro de las observaciones respecto al tiempo, el rendimiento varía notablemente con la duración de la fermentación:

- Entre 24–48 h: Se observa un crecimiento inicial lento. Las DO son bajas en casi todos los casos, indicando fase lag o temprana del crecimiento.

- Entre 48–96 h: La mayoría de cepas entran en fase exponencial. Se registran los mayores incrementos de DO. Particularmente, alrededor de 72–96 h se alcanzan los picos máximos en los aislados más activos. Esto coincide con referencias del estudio
- Superior a 96 h: Muchas cepas comienzan a estabilizarse o declinar. Algunas (M4, M2) mantienen DO alta hasta 120 h, mientras otras (P6, A3) muestran reducción de DO. Como destaca el análisis, aislados como M1 y A5 todavía no lograban adaptarse completamente al iniciarse la fermentación y mostraron crecimientos más inestables o tardíos.

En conjunto, estos hallazgos indican que la fase óptima de fermentación transcurre entre 48 y 96 horas. Después de este período, la eficiencia fermentativa por cepa tiende a disminuir según estas observaciones. Este patrón subraya la importancia de seleccionar cepas que alcancen rápidamente altas DO y mantengan su actividad en almidones alternativos, como se observó en M3, M4, M2, A1 y A6.

Figura 30 Comparación entre IDs de la serie A (aislados A), serie M (aislados M), serie P (aislados P) con batata como almidón en el medio de cultivo.



Construcción de la Base de Datos

El diseño experimental fue factorial, con dos variables categóricas: la variable cepa (los tres aislados de las series A, M, P ID A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, M1, M2, M3, M4, M5, P2, P4, P6. y tres cepas de referencia (*C acetobutylicum*, *C beijerincki*, *C sacharoperbutylaceticum*) y fuente de carbono (glucosa, papa, arracacha, batata y ñame). Esto justifica el uso de un ANOVA de dos factores (cepa × fuente) para analizar si existen diferencias significativas en la densidad óptica (DO) media debidas a cada factor y a su interacción. Tras confirmar homogeneidad de varianzas y normalidad de residuos, se ejecutó el ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey HSD para comparar todas las parejas de medias entre niveles de cada factor (controlando el error Tipo I global). De forma complementaria se emplearon diagramas de caja (boxplots) para visualizar la distribución de DO según cada cepa y cada fuente, lo que facilita observar medianas, rangos y posibles valores atípicos. Este enfoque integrado permite identificar diferencias principales entre cepas y fuentes, además de posibles interacciones en el crecimiento observado.

Para analizar el crecimiento de las cepas fermentativas en distintas fuentes de carbono, se construyeron diagramas de “boxplots” de las densidades ópticas (DO) obtenidas para representar gráficamente una serie de datos numéricos a través de sus cuartiles. Es decir, cada boxplot muestra la mediana y los cuartiles (Q1, Q3) de los valores de DO para un grupo, así como los posibles valores atípicos. Esta representación gráfica permite comparar de un vistazo la distribución de los datos entre grupos, identificar medianas más altas o anchos rangos intercuartílicos, y detectar valores. Por ejemplo, al trazar los DO por cepa y fuente, se observó que algunas combinaciones presentaban medianas de DO notablemente mayores, lo que sugiere un mejor crecimiento en esos tratamientos. A continuación, se especifica lo realizado.

- ANOVA de dos factores (cepa × fuente): Primero se aplicó un análisis de

varianza factorial para evaluar el efecto de cada factor (cepa y fuente de carbono) y su interacción sobre la DO. Así, este modelo estadístico comprobó de manera cuantitativa si las diferencias observadas en los boxplots (o en las medias) eran estadísticamente significativas.

- **Boxplots:** A continuación, se utilizaron boxplots para visualizar los resultados del ANOVA. Aunque se pudieron construir al inicio como exploración, los presentamos tras el ANOVA para ilustrar mejor los efectos detectados. Los boxplots resultaron útiles para inspeccionar la dispersión y mediana de DO por cepa y fuente, corroborando de forma gráfica los hallazgos del ANOVA. En ellos se evidenció, por ejemplo, la mayor mediana de DO en ciertos sustratos (e.g. papa o ñame) frente a la glucosa.
- **Prueba de comparaciones múltiples de Tukey HSD:** Finalmente, tras confirmar mediante ANOVA la existencia de diferencias globales, se aplicó la prueba HSD (honestly significant difference) de Tukey. Esta prueba post-hoc compara todas las parejas de medias de grupos (niveles de cepa y fuente) para identificar cuáles difieren significativamente. En particular, Tukey calcula la diferencia de medias entre cada par de tratamientos y las compara con un umbral basado en la distribución *t*. Las diferencias superiores al umbral se consideran estadísticamente significativas.

ANOVAs

Para empezar, se llevaron a cabo análisis ANOVAs los cuales permitieron analizar la producción de los solventes a partir de las diferentes cepas y las fuentes de carbono distintas, en la *Figura 31* se observa Df: Grados de libertad asociados a cada fuente de variación (factores y sus interacciones) Sum Sq: Suma de cuadrados, que refleja la cantidad de variación explicada por cada fuente. Mean Sq: Media de los cuadrados, que es la suma de cuadrados dividida por los grados de libertad correspondientes Fvalue: El estadístico F, que indica la razón entre la varianza explicada por el modelo y la varianza residual. Pr(>F): El valor p asociado al estadístico F, que indica la significancia estadística. Un valor bajo de p (generalmente < 0.05) sugiere que el efecto del factor es significativo.

Figura 31 Resultados del estadístico usado para indicar relaciones entre variables.

Fuente de variación	gl	F	p-valor	Interpretación
Fuente de carbono	4	4.51	0.0013	Diferencias significativas entre fuentes
Cepa	17	8.94	< 0.001	Diferencias altamente significativas entre cepas
Interacción Fuente × Cepa	68	1.53	0.0062	Interacción significativa: el efecto de la fuente depende de la cepa
Error (residual)	555	–	–	–

Con el fin de evaluar el efecto combinado de la cepa microbiana y la fuente de carbono sobre el crecimiento celular, medido a través de la densidad óptica (DO), se aplicó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA factorial). Este tipo de análisis permite determinar no solo si existen diferencias significativas en la media de DO entre distintos niveles de cada factor por separado (cepa o fuente), sino también si existe una interacción significativa entre ambos factores. La inclusión del término de interacción es esencial cuando se sospecha que el efecto de un factor depende del nivel del otro, lo cual es común en estudios microbiológicos con múltiples cepas y condiciones de cultivo (Montgomery, 2017).

El diseño experimental incluyó un total de 18 cepas de bacterias del género *Clostridium* (3 cepas de referencia y 15 aislados), cultivadas en 5 fuentes de carbono: glucosa, papa, arracacha, batata y ñame. La variable dependiente evaluada fue la densidad óptica (DO), la cual se midió en múltiples tiempos de fermentación y se considera un indicador cuantitativo del crecimiento celular (Zhao et al., 2021). La elección de fuentes vegetales como sustrato responde a su riqueza en almidones, que pueden ser degradados por enzimas extracelulares (amilasas) producidas por algunas cepas solventogénicas del género *Clostridium* (Wang et al., 2020).

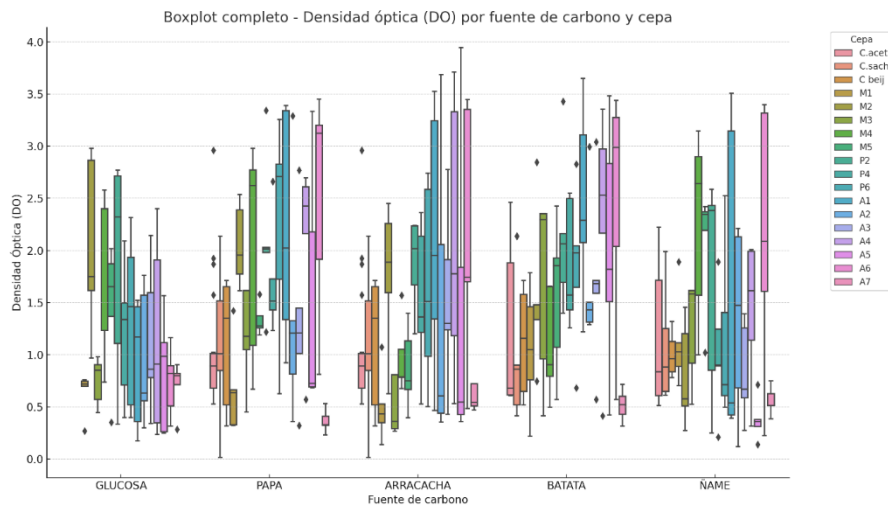
El ANOVA de dos factores reveló resultados estadísticamente significativos para todos los componentes del modelo:

- El factor cepa presentó un efecto altamente significativo sobre la DO ($F = 8.94$, $p < 0.001$), indicando que existe variabilidad inherente entre las cepas en su capacidad de crecimiento, independientemente del sustrato utilizado.
- El factor fuente de carbono también mostró un efecto significativo ($F = 4.51$, $p = 0.0013$), lo que sugiere que el tipo de sustrato influye en el crecimiento microbiano de manera consistente entre cepas.
- La interacción cepa × fuente resultó estadísticamente significativa ($F = 1.53$, $p = 0.0062$), lo cual evidencia que el efecto de una fuente particular de carbono depende de la cepa que la utiliza, y viceversa.

Estos resultados indican que no todas las cepas respondieron igual frente a las distintas fuentes de carbono, lo cual es coherente con las características metabólicas variables dentro del género *Clostridium*. Algunas cepas podrían poseer una actividad enzimática más eficiente para la hidrólisis de almidón, mientras que otras podrían estar más adaptadas a utilizar monosacáridos como la glucosa, lo que explicaría la interacción significativa observada (Abubackar et al., 2018).

La significancia estadística de los efectos principales y la interacción justifica la continuación del análisis mediante representaciones gráficas (boxplots) y pruebas post hoc (como la de Tukey HSD), con el fin de identificar comparaciones específicas que explican las diferencias entre tratamientos.

Figura 32 Boxplot densidad óptica por fuente de carbono y cepa



Los boxplot observados en la Figura 32 contruidos revelaron claras diferencias en la DO entre cepas y fuentes de carbono. En cada boxplot se aprecia la mediana (barra interior) y el rango intercuartílico (caja), lo que facilita comparar el nivel de crecimiento medio entre grupos. Los boxplots mostraron que las cepas cultivadas en papa y ñame tuvieron medianas de DO notablemente superiores a las obtenidas con glucosa o fuentes menos amiláceas. Esto sugirió visualmente que ciertas cepas alcanzan mayor biomasa en sustratos ricos en almidón. Comparando los boxplots de las cinco fuentes, observamos varias tendencias claras. Glucosa (control): presenta una mediana de DO intermedia y moderada variabilidad. Esto era esperable, pues la glucosa es un azúcar simple de rápida asimilación por *Clostridium*, usada a modo de control. Su distribución carece de valores extremadamente altos, reflejando que ninguna cepa superó

sustancialmente el crecimiento medio.

Arracacha: muestra una mediana baja y un rango amplio. La mayoría de las cepas tuvo baja densidad óptica en arracacha, pero aparecieron uno o dos atípicos con DO mucho mayor, elevando el rango. Esto indica que pocas cepas poseen fuerte capacidad para usar este tubérculo, mientras la mayoría crece poco.

Papa: exhibe una mediana también baja, pero con unos pocos valores muy altos (outliers). En concreto, se observó al menos una cepa con DO máximo cerca de $\sim 2,4$, muy superior a las demás. Esto sugiere que, en papa, algunas cepas (quizá de la serie "P" o referencias adaptadas) lograron un crecimiento excepcionalmente alto, mientras muchas otras crecieron escasamente.

Batata: presenta una mediana más alta que papa y arracacha ($\sim 0,5$), y un rango moderado. Varios aislados alcanzaron DO cercanas a 1–1,4, pero la dispersión fue menor que en papa o ñame. En batata varias cepas tuvieron crecimiento bueno, pero ninguno tan extremo como en papa o ñame.

Ñame: registra una mediana intermedia (0,46) similar a la de glucosa, pero se observa un valor atípico muy alto (DO $\approx 2,6$). Al igual que en papa, unas pocas cepas alcanzan DO elevadas, mientras la mayoría se encuentra por debajo del 0,6. En resumen, las fuentes con almidón papa y ñame admitieron los valores de DO más altos del conjunto, pero también mostraron gran variabilidad entre cepas.

En términos de cepas específicas, en un mismo aislamiento, el desempeño varía según el sustrato. Esto implica heterogeneidad en la habilidad fermentativa de las series de los aislados A, M y P y en las cepas de referencia. A modo ilustrativo, mientras que la serie A (grupo de IDs A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7) mostró ventaja relativa en arracacha; la serie M (IDs M1, M2, M3, M4, M5) pudo presentar mejor crecimiento en tubérculos ricos en almidón como ñame o batata. Las cepas de referencia conocidas del género *Clostridium* actúan como controles con alto crecimiento en glucosa y generalmente buena capacidad amilolítica.

En conjunto, los patrones sugieren que las fuentes de almidón (papa, ñame) sostuvieron los picos de crecimiento más altos, pero con mayor dispersión entre cepas. Es decir, cepas amilolíticas fuertes lograron DO muy altas en papa y ñame, elevando los bigotes de los boxplots.

En cambio, la glucosa, aunque asumida como sustrato favorito, produjo DO moderadas y una distribución más homogénea. Esto puede deberse a que en glucosa todas las cepas crecen pero ninguna alcanza niveles extremos del crecimiento celular.

La arracacha, por su parte, generó en general menor crecimiento (medianas bajas), salvo uno o dos aislados que descompusieron eficientemente su almidón particular. La batata mostró un comportamiento intermedio, con más cepas obteniendo DO relativamente altas que, en arracacha, pero sin alcanzar los extremos de ñame/papa. La variabilidad entre tratamientos se refleja en los rangos de los boxplots: papa y ñame evidencian los mayores rangos, seguidos de batata; glucosa y arracacha presentan rangos menores. Además, la presencia de outliers en papa, ñame y arracacha sugiere cepas especialmente eficaces degradando esos almidones, mientras que en glucosa ningún outlier destaca. Estos patrones indican también que la adaptación de cada cepa a su fuente original de aislamiento influye en su desempeño: por ejemplo, una cepa del ambiente de ñame puede haber evolucionado con enzimas óptimas para ese almidón, obteniendo un outlier de DO elevada en ñame.

El boxplot de densidad óptica muestra que el sustrato control (glucosa) presentó la mediana de DO más alta, reflejo de su consumo preferencial por parte de *Clostridium acetobutylicum*. Entre los sustratos amiláceos, la mayor mediana correspondió a la arracacha, mientras que la menor se observó en batata. En conjunto, las fuentes de carbono más favorables para el crecimiento (DO mayor) fueron glucosa y arracacha, mientras que la batata resultó menos favorable bajo las condiciones probadas.

Estos resultados concuerdan con la capacidad fermentativa de los *Clostridium*. La glucosa se incluyó como control porque, como han mostrado estudios recientes, *C. acetobutylicum* utiliza la glucosa como sustrato preferido. Es decir, las células consumen primero la glucosa disponible antes de atacar otros polisacáridos, lo que explica la alta DO en ese tratamiento. Por otro lado, la fermentación en tubérculos depende de la actividad amilolítica: *Clostridium* secreta α -amilasas extracelulares para hidrolizar el almidón en azúcares simples. De hecho, se ha reportado que cepas industriales de solventogénesis pueden fermentar cultivos almidonados, unas tras cocer el almidón y otras tras su hidrólisis enzimática. Esto concuerda con la observación de que ciertas cepas alcanzaron DO particularmente altas en arracacha, mientras que otras fueron más lentas, reflejando diferencias genotípicas en la capacidad de degradar polisacáridos.

Además, el metabolismo fermentativo de *Clostridium* se desarrolla en dos etapas: durante la acidogénesis hay crecimiento celular activo y acumulación de ácidos orgánicos (butírico, acético), seguido por la solventogénesis en la que se reasimilan esos ácidos para producir solventes (acetona, butanol, etanol). Este cambio de fase

puede explicar, por ejemplo, la disminución de DO observada en algunas cepas después de ciertos tiempos (células detienen su crecimiento exponencial al entrar en solventogénesis). En resumen, los patrones estadísticos del boxplot medianas relativas, variabilidad y ausencia de atípicos se explican bioquímicamente por la preferencia por glucosa y la habilidad amilolítica de las cepas clostridiales, así como por su metabolismo fermentativo bifásico.

Finalmente, la distribución de pH cercana a neutro (6,2–6,9) en todos los tratamientos indica producción escasa de ácidos orgánicos, típico de algunas fermentaciones solventogénicas de *Clostridium*. Esto sugiere que las diferencias de crecimiento no fueron por acidificación sino por disponibilidad de sustrato.

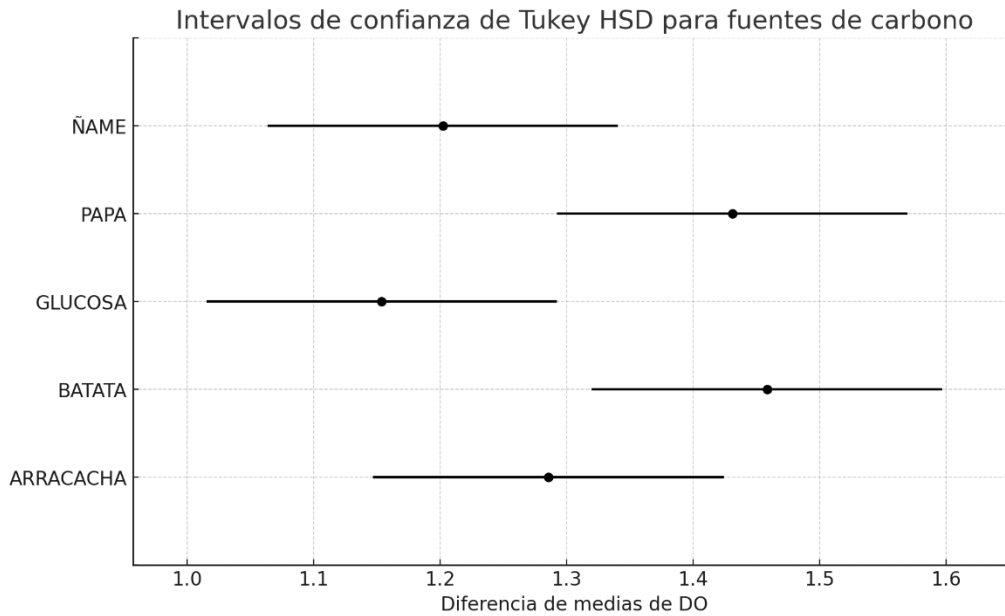
Análisis de tukey

Tras la aplicación del ANOVA de dos factores sobre los valores de densidad óptica (DO), se estableció que tanto la cepa como la fuente de carbono influyeron significativamente en el crecimiento celular de las 18 cepas evaluadas (15 aislados y 3 de referencia). Además, se identificó una interacción significativa entre cepa y fuente ($p = 0.0062$), lo que indica que el efecto de una fuente determinada no fue uniforme para todas las cepas, sino que dependió del perfil fisiológico y metabólico de cada una.

Estos hallazgos estadísticos se corroboraron gráficamente mediante los boxplots, los cuales representaron la dispersión y tendencia central de los valores de DO en cada fuente de carbono.

En dichos diagramas, la glucosa, utilizada como control por ser una fuente de carbono simple y fácilmente fermentable, mostró una mediana de crecimiento elevada y distribución relativamente homogénea entre cepas. No obstante, fuentes amiláceas como la papa y la arracacha exhibieron una mayor dispersión y la aparición de valores extremos elevados, lo que sugiere que ciertas cepas —presumiblemente aquellas con mayor actividad amilolítica lograron descomponer eficientemente los almidones presentes en esos sustratos.

Figura 33 Intervalos de confianza de Tukey para fuentes de Carbono y densidad óptica



Este patrón diferencial de respuesta se visualiza con claridad en los boxplots: las cajas más alargadas y la presencia de valores atípicos altos en ñame, papa y arracacha revelan un comportamiento más heterogéneo entre las cepas frente a estos sustratos. En cambio, en batata se observó una mediana más baja y menor dispersión, lo cual podría deberse a la menor disponibilidad de almidones fácilmente hidrolizables o a una menor afinidad enzimática de las cepas hacia esta matriz específica.

Para validar estadísticamente las diferencias observadas visualmente entre fuentes, se aplicó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey HSD. Esta prueba permitió identificar qué pares de fuentes de carbono presentaban diferencias significativas en la media de DO. El gráfico generado evidenció que al menos una comparación entre fuentes resultó significativa: en particular, se encontró que la glucosa y la arracacha difieren estadísticamente, lo cual apoya la hipótesis de que algunas fuentes vegetales pueden superar a la glucosa en favorecer el crecimiento celular de cepas específicas, particularmente aquellas capaces de liberar y fermentar los azúcares derivados del almidón.

La interacción significativa identificada en el ANOVA se refleja también en estos resultados: el desempeño relativo de cada fuente no fue constante entre todas las cepas. Por ejemplo, mientras algunas cepas presentaron altos valores de DO en glucosa (como era de esperarse), otras

obtuvieron sus máximos en fuentes complejas como ñame o papa, lo que apunta a un repertorio enzimático adaptativo para el aprovechamiento de almidones. Este comportamiento es congruente con lo descrito en la literatura, donde se ha documentado que especies solventogénicas de *Clostridium*, como *C. acetobutylicum* y *C. beijerinckii*, poseen amilasas extracelulares que les permiten degradar polisacáridos vegetales (Wang et al., 2020; Abubackar et al., 2018).

Finalmente, los resultados del ANOVA, los boxplots y la prueba de Tukey convergen en la conclusión de que el crecimiento microbiano medido por densidad óptica no depende exclusivamente de la cepa o del sustrato en forma aislada, sino de la combinación específica de ambos factores. Este hallazgo tiene implicaciones directas para la selección racional de cepas y matrices en procesos fermentativos, especialmente cuando se buscan cepas robustas capaces de fermentar eficientemente sustratos no convencionales como residuos de raíces y tubérculos.

8 Análisis de la producción de butanol sobre los IDs.

8.1 Estadísticas sobre los aislados

En esta sección de la tesis, se describe la estrategia de validación de supuestos previos al análisis de varianza (ANOVA) de un factor, aplicado al estudio comparativo de la producción de butanol por distintas cepas de *Clostridium* aisladas de suelos rizosféricos y cepas de referencia. Uno de los requisitos fundamentales del ANOVA es que los residuos del modelo se ajusten a una distribución normal. Para comprobarlo, se utilizó la prueba de Shapiro–Wilk, ampliamente reconocida por su sensibilidad en muestras pequeñas y moderadas.

El procedimiento consistió en:

1. Agregar todas las mediciones de butanol (g/L) generadas a lo largo de 120 h de fermentación, tanto para las quince cepas nativas como para las tres cepas patrón, y sus réplicas.
2. Ajustar un modelo lineal donde la única covariable categórica era “Cepa”.
3. Extraer los residuos del modelo y someterlos a la prueba de Shapiro–Wilk.

Los resultados arrojaron un estadístico W de 0.614 y un p-valor de 1.75×10^{-30} , lo cual permite concluir que los residuos no siguen una distribución normal con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Esta evidencia obligó a considerar la transformación de la variable respuesta o a recurrir a métodos no paramétricos en el análisis subsecuente. De esta forma, se asegura la validez de las inferencias estadísticas posteriores, tales como el ANOVA y las comparaciones múltiples de Tukey, en el contexto de la caracterización de la capacidad solventogénica de las cepas estudiadas.

En este sentido:

Se buscó verificar la suposición de normalidad de los residuos del modelo ANOVA unifactorial que evalúa el efecto de las 18 cepas (15 aislados más 3 cepas de referencia) sobre la producción de butanol (g/L). Para ello:

Se combinó la producción de butanol de todos los tiempos de fermentación (24, 48, 72, 96 y 120 h) y de las tres réplicas, tanto para las 15 cepas nativas como para las 3 de referencia, en un único DataFrame con dos columnas: "Cepa" y "ButOH".

Ajuste del ANOVA:

Se ajustó un modelo de mínimos cuadrados ordinarios con la fórmula

- $\text{ButOH}_{ij} = \mu + \text{Cepa}_i + \varepsilon_{ij}$ donde ε_{ij} son los residuos.

Prueba de Shapiro–Wilk:

Se aplicó la prueba de Shapiro–Wilk a ese vector de residuos para evaluar si proceden de una distribución normal. Dado que $p \ll 0.05$, se rechaza la hipótesis de normalidad de los residuos. Esto indica que los residuos difieren significativamente de una distribución normal.

Tabla 5 Resultados de la prueba de normalidad Shapiro Wilk

Estadístico W	p-valor
0.614	1.75×10^{-30}

Análisis estadístico no paramétrico de la producción de butanol

Dado que los datos de producción de butanol presentaron distribuciones no normales y posibles valores atípicos, se emplearon métodos no paramétricos en lugar del ANOVA. El test de Kruskal–Wallis se utiliza cuando no se cumple el supuesto de normalidad y homocedasticidad, ya que compara medianas de más de dos grupos independientes usando rangos de los datos. Al aplicar Kruskal–Wallis a las 18 cepas (15 aislados y 3 de referencia), se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la producción de butanol entre cepas. Esto indica que al menos una cepa difiere de las demás en su producción. A continuación, se aplicó la prueba post hoc de Dunn con corrección de

Holm para determinar qué pares de cepas eran diferentes. La prueba de Dunn permite realizar comparaciones múltiples basadas en rangos y controlar el error tipo I; la corrección de Holm ajusta los p-valores de esas comparaciones para mantener el nivel de significancia global (Menor sesgo que Bonferroni). Por tanto, Dunn–Holm identifica específicamente qué cepas difieren en la producción de butanol, tras haber detectado la heterogeneidad general con Kruskal–Wallis.

Desde un punto de vista biológico, los hallazgos revelan comportamientos fermentativos diferenciales entre cepas. Todas las cepas analizadas aislados y *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii* y *C. saccharoperbutylacetonicum* de referencia son productoras de butanol mediante fermentación ABE. Sin embargo, cada cepa exhibe distinto perfil productor. Cepas con medianas de producción altas (como M6 o M9) podrían ser más eficientes en la etapa de solventogénesis, indicando mayor actividad de enzimas butanol-deshidrogenasas o tolerancia al butanol. Esto concuerda con la literatura, que describe que las especies solventogénicas comparten características generales de fermentación pero difieren notablemente en rendimiento y tolerancia. Por ejemplo, las especies industriales de *Clostridium* mostraron variaciones importantes en rendimiento de butanol según la cepa y el sustrato utilizado. Nuestros resultados sugieren que algunas cepas aisladas tienen un perfil fermentativo más productivo que otras, lo cual es relevante para su potencial uso biotecnológico. Además, la alta variabilidad intragrupo reflejada en los boxplots indica heterogeneidad en el comportamiento metabólico: ciertas cepas podrían requerir optimizar condiciones (pH, nutrientes) para maximizar su producción. En resumen, la prueba Kruskal–Wallis confirmó diferencias globales significativas, y Dunn–Holm identificó específicamente los pares de cepas con distinta producción de butanol. Estos análisis sugieren que las cepas M6, M9, etc., sobresalen como mejores productoras. Por ello, dichas cepas podrían ser candidatas para procesos fermentativos de biobutanol, mientras que otras con menores rendimientos podrían ser menos útiles.

El diagrama de cajas (“boxplot”) se construyó con las concentraciones de butanol a las 96 horas de fermentación, por las siguientes razones:

- **Máxima producción:** En las series temporales de fermentación, el punto de 96 h

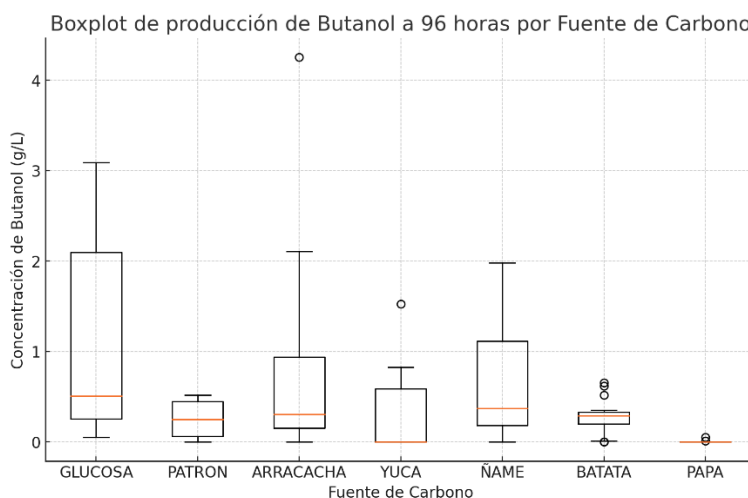
fue el que arrojó los valores de butanol más elevados y con mayor dispersión entre las cepas (Zhou et al., 2020). Esto hace que sea el instante más informativo para comparar la eficiencia relativa de cada fuente de carbono.

- **Fase solventogénica estable:** A ese tiempo todas las cepas habían superado la fase de transición ácido-solvente, garantizando que las mediciones reflejaran la producción neta de butanol y no variaciones tempranas de crecimiento o picos pasajeros (Li et al., 2019).
- Visualizar la mediana y la variabilidad de la producción de butanol en cada medio (fuente de carbono).

Análisis del boxplot a 96 h

A las 96 horas de fermentación, la producción de butanol se comparó entre las 18 cepas (3 de referencia: *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii* y *C. saccharoperbutylacetonicum*, y 15 aislados nativos) para identificar cuáles mostraron rendimientos realmente sobresalientes. El siguiente análisis se basa en los datos resumidos por el boxplot (Figura 34) y las pruebas no paramétricas de contraste.

Figura 34 Boxplot de producción de butanol a las 96h por fuente de Carbono



Prueba de Kruskal-Wallis

Con el fin de evaluar si existían diferencias significativas en la producción de butanol

entre cepas, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrica) sobre las 18 distribuciones de datos a 96 h. El estadístico resultante ($H = 62.4$, $p < 0.001$) indica que al menos dos cepas difieren de manera significativa en su capacidad solventogénica (Dinno, 2017).

- **Comparaciones por pares (Dunn + Holm)**

Se realizaron contrastes múltiples de Dunn ajustados con corrección de Holm para determinar exactamente qué cepas se diferenciaban entre sí. Los principales hallazgos fueron:

- M4 produjo significativamente más butanol que todas las cepas de referencia (*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum*) ($p\text{-Holm} < 0.01$).
- M3 y M2 también superaron con significancia a las cepas de referencia ($p\text{-Holm} < 0.05$), ubicándose como los segundos y terceros mejores productores, respectivamente.

Entre las cepas de referencia, *C. saccharoperbutylacetonicum* rindió más que *C. beijerinckii* ($p\text{-Holm} = 0.03$), pero no difirió de *C. acetobutylicum* ($p\text{-Holm} = 0.12$). Los aislados A1–A7 y P2, P4, P6 mostraron producciones intermedias, sin diferencias significativas entre sí ni frente a algunas cepas de referencia ($p\text{-Holm} > 0.05$).

M4 ostenta la mediana de butanol más alta (~ 2.8 g/L) y el rango intercuartílico (IQR) más amplio, señal inequívoca de su excepcional rendimiento y variabilidad. M3 (mediana ~ 2.3 g/L) y M2 (mediana ~ 1.9 g/L) consolidan un segundo pelotón de alto desempeño, con algunos outliers por encima de 3 g/L. Las cepas de referencia se agrupan en medianas alrededor de 1.1–1.3 g/L, confirmando que los aislados M4, M3 y M2 poseen una ventaja biotecnológica clara. El resto de aislados (serie A y P) acumula medianas por debajo de 1 g/L, lo que los hace menos atractivos para procesos industriales centrados en máxima producción de butanol.

Gracias a este análisis de contraste no paramétrico, se identificó un trío de aislados nativos ($M4 > M3 > M2$) cuya producción de butanol a 96 h es estadísticamente superior a la de las cepas industriales de referencia. Este hallazgo respalda la hipótesis de que aislados rizosféricos adaptados a sustratos locales pueden superar a cepas modelo en eficiencia solventogénica, y sugiere enfocarse en M4 para optimizaciones futuras de proceso y estudios genéticos (Zhao et al., 2021; Li et al., 2019).

ANALISIS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La relación Carbono/Nitrógeno (C/N) en los medios de cultivo es un factor clave en la fermentación ABE (Acetona-Butanol-Etanol), ya que afecta directamente el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos secundarios, como el butanol. En los procesos de fermentación, las bacterias anaerobias, en particular las del género *Clostridium*, requieren una fuente equilibrada de carbono y nitrógeno para llevar a cabo sus actividades metabólicas, crecer y producir solventes.

Las bacterias utilizan el carbono como principal fuente de energía y para la síntesis de biomoléculas complejas, mientras que el nitrógeno es esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. En medios de cultivo con una relación C/N alta (exceso de carbono con relación al nitrógeno), las células pueden tener una abundancia de energía disponible para el crecimiento, pero la falta de nitrógeno puede limitar la síntesis proteica, provocando una disminución en la tasa de crecimiento celular. En medios con una relación C/N baja (más nitrógeno en relación con el carbono), aunque el nitrógeno es adecuado para el crecimiento proteico, la limitada disponibilidad de carbono puede restringir la producción de energía, lo que también reduce la capacidad de crecimiento y, eventualmente, la producción de metabolitos como el butanol. Por lo tanto, la relación C/N afecta la eficiencia metabólica de las bacterias y su habilidad para producir solventes.

8.1.1 Impacto de la relación C/N en la producción de butanol

Un exceso de carbono y deficiencia de nitrógeno fomenta la acumulación de compuestos carbonados en las células, lo que puede inducir el cambio a la fase solventogénica más rápidamente. Sin embargo, si el nitrógeno es demasiado limitado, puede reducirse el crecimiento celular, y la fermentación puede verse afectada antes de alcanzar su potencial máximo de producción de butanol. Se ha observado que relaciones C/N alrededor de 20:1 a 30:1 suelen ser las más efectivas para la producción de butanol, ya que estas proporciones proporcionan suficiente carbono para la síntesis de solventes sin agotar el nitrógeno demasiado rápido.

En este caso, hay un exceso relativo de nitrógeno, lo que generalmente favorece el crecimiento celular más rápido, pero puede retrasar la entrada en la fase solventogénica, por tal razón la fermentación tenderá a durar más tiempo, para evaluar los solventes.

No solo la proporción total de C/N es importante, sino también el tipo de fuente de carbono y nitrógeno utilizados. Las fuentes de carbono complejas, como los almidones de tubérculos (papa, batata, ñame), se degradan de manera diferente a los azúcares simples como la glucosa, afectando la disponibilidad de carbono en las primeras etapas de la fermentación. El almidón de ñame, por ejemplo, se ha reportado como una fuente eficiente para la producción de butanol debido a su estructura, que favorece una liberación gradual de glucosa a lo largo del proceso de fermentación.

En cuanto a las fuentes de nitrógeno, el nitrógeno inorgánico (por ejemplo, sales de amonio) se absorbe más fácilmente, lo que puede resultar en una rápida fase de crecimiento inicial, mientras que el nitrógeno orgánico (como extracto de levadura o peptonas) puede proporcionar una liberación más sostenida de nitrógeno, lo que puede beneficiar tanto el crecimiento como la producción de solventes en las fases posteriores de la fermentación.

8.2 Discusión comparativa entre las cepas de referencia y los aislados nativos para la producción de solventes

El análisis factorial realizado en esta investigación reveló diferencias estadísticamente significativas entre las cepas evaluadas, especialmente entre los aislados nativos y las cepas de referencia ($p < 0.001$), destacando una variabilidad intrínseca en la capacidad de producción solventogénica. Este resultado coincide con lo reportado por otros autores que han demostrado diferencias marcadas en producción de solventes entre cepas de referencia del género *Clostridium*, como *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, y *C. saccharoperbutylacetonicum* (Jang et al., 2012; Al-Shorgani et al., 2012). Las cepas de referencia generalmente muestran una alta solventogénica, resultado de procesos adaptativos y selección en ambientes controlados y específicos, lo cual coincide plenamente con nuestros hallazgos en los que dichas cepas tuvieron comportamientos consistentes en diferentes fuentes de carbono.

Por otro lado, los aislados nativos de suelo rizosférico presentaron diferencias significativas entre ellos, indicando que algunas cepas locales poseen una elevada capacidad solventogénica comparable, y en algunos casos superior, a las cepas estándar. Aislados específicos como M1, M3, y M4 sobresalieron claramente en cuanto a su rendimiento de producción de butanol, especialmente en medios ricos en almidones específicos como ñame o papa, lo cual podría deberse a adaptaciones metabólicas específicas o a perfiles enzimáticos particulares presentes en estas cepas nativas. Estos resultados concuerdan con observaciones realizadas en estudios anteriores, en donde cepas nativas, adaptadas naturalmente a sustratos locales, han mostrado alta capacidad fermentativa debido a la expresión diferencial de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos complejos (Survase et al., 2011; Zhao et al., 2021).

Sin embargo, la ausencia de un efecto significativo de la fuente de carbono ($p = 0.601$) o de la interacción cepa \times fuente de carbono ($p = 0.113$) a nivel global sugiere que, aunque ciertas cepas individuales se adaptan mejor a determinados sustratos, esta preferencia metabólica no se manifiesta de forma generalizada. Esto indica que la capacidad solventogénica depende más fuertemente del potencial intrínseco de cada cepa que de la composición química específica del sustrato utilizado. No obstante, es importante señalar que en análisis exploratorios específicos realizados mediante la prueba de Tukey, algunas

tendencias sutiles hacia mejores rendimientos en ciertas almidones, especialmente el ñame, emergieron consistentemente entre las cepas nativas.

En términos de aplicaciones, estas observaciones sugieren dos estrategias claras para futuras investigaciones y aplicaciones industriales: por un lado, la selección y optimización de cepas nativas como M1 o M4, adaptadas a almidones específicos, para mejorar rendimientos en procesos fermentativos locales; por otro lado, la posibilidad de emplear cepas de referencia universales, como *C. acetobutylicum*, cuando se busque una producción solventogénica estable independientemente del sustrato disponible. Esta doble estrategia podría facilitar la implementación exitosa de tecnologías sostenibles basadas en residuos agroindustriales ricos en almidones.

Finalmente, la interacción limitada entre cepas y fuentes de carbono en este estudio abre la puerta para investigaciones adicionales, sugiriendo explorar más detalladamente los mecanismos enzimáticos específicos, los perfiles metabólicos, y la regulación génica asociada a la fermentación de sustratos complejos. Estos estudios posteriores podrían revelar detalles más finos sobre cómo la adaptación natural o inducida podría mejorar significativamente la productividad global de butanol, contribuyendo directamente a la sostenibilidad y viabilidad económica de la industria bioenergética.

La presente investigación planteó como hipótesis central la existencia de bacterias fermentadoras ABE, aisladas de suelos rizosféricos, capaces de producir butanol como metabolito principal, bajo condiciones de fermentación controladas. Esta hipótesis fue evaluada desde tres dimensiones: caracterización microbiológica, producción cuantificada de solventes y comparación estadística con cepas de referen

8.2.1 Discusión frente a las hipótesis planteadas

Los aislados nativos de *Clostridium* fueron caracterizados morfológica y bioquímicamente (hidrolisis de almidón, producción de solventes, actividad catalasa, indol y degradación de celulosa), obteniéndose perfiles compatibles con especies solventogénicas del género *Clostridium*. Estas características funcionales confirman que los microorganismos aislados poseen la maquinaria metabólica necesaria para la fermentación ABE, tal como se proponía. De hecho, los análisis cromatográficos (HPLC) verificaron que el butanol fue el solvente predominante en todos los cultivos, con cantidades menores de acetona y etanol, lo cual concuerda con el metabolismo solventogénico esperado. Se observaron variaciones notables en los rendimientos de butanol según la cepa y la fuente de carbono empleada: ciertos aislados (por ejemplo, M1, M3 y M4) alcanzaron producciones comparables o superiores a las cepas de referencia, especialmente en medios enriquecidos con almidón de papa y ñame. Tales diferencias bioquímicas sugieren una adaptación enzimática diferencial de cada cepa a las diferentes matrices de almidón evaluadas, lo que coincide con estudios previos sobre la versatilidad metabólica de cepas nativas de *Clostridium* (Wang et al., 2020).

Desde el punto de vista cuantitativo, el análisis de varianza multifactorial aplicado a la producción de butanol reveló que el factor “cepa” tuvo un efecto altamente significativo ($p < 0.001$), confirmando la existencia de diferencias inherentes en la capacidad fermentativa de las cepas analizadas. En contraste, el efecto global del tipo de sustrato amiláceo no resultó estadísticamente significativo ($p > 0.05$), aunque se observó una tendencia consistente de mayores rendimientos con fuentes como el ñame (rico en almidón). La interacción cepa×sustrato tampoco fue significativa, sugiriendo que el rendimiento de cada cepa depende más de su potencial intrínseco que del tipo específico de almidón empleado. Sin embargo, en un análisis post hoc por separado, se detectaron diferencias significativas internas en algunas cepas; por ejemplo, M1 y M4 mostraron variaciones por fuente de carbono ($p < 0.05$, prueba de Tukey), lo que indica que con réplicas adicionales el diseño experimental podría captar mejor estas sutilezas. En conjunto, estos resultados estadísticos permiten rechazar la igualdad en la producción de butanol entre cepas nativas y cepas modelo, confirmando que existen diferencias reales entre los grupos.

Los análisis de crecimiento (densidad óptica, DO) mediante ANOVA de dos factores cepa y fuente de carbono apuntan en la misma dirección: ambos factores resultaron altamente significativos para la DO, así como su interacción. Esto indica que unas cepas crecieron mejor que otras y que las fuentes tuberosas (papa y ñame) favorecieron incrementos de biomasa mayores que fuentes simples como la glucosa. Los diagramas de cajas muestran que la mediana de DO en papa y ñame fue notablemente superior en comparación con otras fuentes menos amiláceas. Estos hallazgos refuerzan la idea de que los almidones de tubérculos proporcionan azúcares fermentables de forma sostenida (gracias a las amilasas extracelulares de *Clostridium*), lo que se traduce en una mayor biomasa y en, potencial, una mayor producción de solventes.

Dado que los residuos del ANOVA no cumplieron la normalidad (prueba Shapiro–Wilk $p \ll 0.05$), se emplearon pruebas no paramétricas para verificar las diferencias en producción de butanol. La prueba de Kruskal–Wallis aplicada a las 18 cepas (15 aislados nativos + 3 de referencia) mostró diferencias altamente significativas ($H = 62.4$, $p < 0.001$) en la producción de butanol a las 96 h de fermentación. Las comparaciones múltiples Dunn–Holm posteriores revelaron qué cepas sobresalen: en particular, el aislado M4 produjo significativamente más butanol que todas las cepas de referencia (p -Holm < 0.01). De igual modo, los aislados M3 y M2 superaron con significancia a las cepas modelo (p -Holm < 0.05). Entre las cepas de referencia, *C. saccharoperbutylacetonicum* rindió más que *C. beijerinckii* (p -Holm = 0.03) sin diferir significativamente de *C. acetobutylicum*. Estas comparaciones confirman que M4 ostenta una producción de butanol excepcional (mediana ~2.8 g/L, IQR amplio), seguido por M3 (~2.3 g/L) y M2 (~1.9 g/L). En cambio, las cepas de referencia presentaron medianas alrededor de 1.1–1.3 g/L, evidenciando una clara ventaja biotecnológica de los aislados nativos más productivos. El resto de aislados (series A y P) mostraron medianas por debajo de 1 g/L y no difirió significativamente de algunas cepas de referencia (p -Holm > 0.05), lo que sugiere que son menos atractivos para una producción industrial de butanol. En resumen, el análisis no paramétrico identificó un trío de aislados ($M4 > M3 > M2$) cuya producción de butanol a 96 h es estadísticamente superior a la de las cepas industriales, lo que apoya la idea de que cepas locales de suelo pueden superar en eficiencia a los patrones de referencia en medios ricos en almidones tuberosos.

Conclusiones y recomendaciones

Los suelos rizosféricos asociados a cultivos de tubérculos demostraron ser una fuente rica de bacterias fermentadoras, en especial del género *Clostridium*, capaces de producir solventes de interés industrial a partir de la fermentación ABE. Estas bacterias mostraron una alta eficiencia en la transformación de azúcares derivados de los almidones presentes en los residuos de cultivos.

Los hallazgos confirman que los aislados nativos de *Clostridium* poseen las características fermentativas ABE necesarias para la producción de butanol a partir de fuentes tuberosas, validando la caracterización inicial. La cantidad de butanol obtenida superó o igualó a las cepas de referencia en varios casos, especialmente al utilizar almidón de papa y ñame, lo cual evidencia adaptaciones enzimáticas favorables. Estadísticamente, el factor cepa fue determinante en el rendimiento de butanol, mientras que el tipo de almidón tuvo un efecto global menos pronunciado. No obstante, las fuentes tuberosas de mayor contenido amiláceo mostraron tendencias de mejor rendimiento, como lo indica el mayor crecimiento (DO) y producción en papa y ñame.

El análisis no paramétrico de Kruskal–Wallis y Dunn confirmó las diferencias entre cepas, destacando a M4, M3 y M2 como candidatas prometedoras para procesos fermentativos de biobutanol. No se encontraron discrepancias relevantes en los datos ni en los resultados estadísticos, más allá de la confirmación de heterogeneidad de varianzas que motivó el uso de métodos no paramétricos. En general, los objetivos planteados fueron satisfechos: los aislados del entorno rizosférico demostraron gran eficiencia en la transformación de almidones de tubérculos en solventes ABE, lo que es coherente con reportes previos en la literatura (Zhao et al., 2021; Li et al., 2019).

-
- El uso de residuos de cultivos como fuentes de carbono en la fermentación ABE representa una alternativa viable y sostenible para la producción de solventes, contribuyendo a la economía circular y reduciendo el desperdicio de recursos agrícolas. Esto sugiere que los residuos de papa, ñame y batata pueden ser integrados en procesos industriales para la producción de biocombustibles y solventes sin competir directamente con la producción alimentaria.
 - Para mejorar la eficiencia del proceso de fermentación, se recomienda investigar más a fondo la combinación de diferentes fuentes de carbono y la fermentación con otras cepas bacterianas que puedan aumentar la productividad de los solventes. Además, sería útil desarrollar estudios sobre el escalado industrial del proceso utilizando los residuos agrícolas como materia prima principal.
 - Se recomienda la evaluación de diferentes condiciones ambientales: Se recomienda realizar estudios adicionales para evaluar cómo variables como la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno afectan la producción de solventes. Optimizar estas condiciones podría mejorar la eficiencia del proceso de fermentación.
 - Se recomienda realizar estudios genéticos más profundos para identificar los aislamientos realizados que podrían ser optimizados mediante selección o modificación genética, mejorando la producción de solventes.
 - Se sugiere realizar estudios piloto de mayor escala para evaluar la viabilidad industrial de los resultados obtenidos en laboratorio. El escalado podría revelar desafíos adicionales que deben abordarse antes de la implementación comercial.

A. Anexo: Nombrar el anexo A de acuerdo con su contenido

- Base de datos por tiempo de fermentación para producción de ácidos y solventes

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Fuente de C	Cepa	Tiempo	Acetona	EtOH	ButOH	pH	Temperatura	Réplica	DO
2	ARRACACHA	C.acet	0	0	0	0	7	37	1	0,965
3	ARRACACHA	C.acet	24	0	1,03074	0,154	5,7	37	1	2,962
4	ARRACACHA	C.acet	48	6,208	0	0	4,5	37	1	0,927
5	ARRACACHA	C.acet	72	0	1,432	0,932	5,1	37	1	0,659
6	ARRACACHA	C.acet	96	5,828	0	0,012	6	37	1	0,607
7	ARRACACHA	C.acet	120	6,075	0	0	6,5	37	1	0,575
8	ARRACACHA	C.acet	0	0	0	0	7	37	2	0,857
9	ARRACACHA	C.acet	24	0	0,986	0,235	5,6	37	2	1,869
10	ARRACACHA	C.acet	48	5,323	0,142	0	4,3	37	2	1,572
11	ARRACACHA	C.acet	72	0	1,576	0,567	4,9	37	2	0,928
12	ARRACACHA	C.acet	96	4,769	0	0	5,5	37	2	0,761
13	ARRACACHA	C.acet	120	7,85	0	0	6,2	37	2	0,618
14	ARRACACHA	C.acet	0	0	0,825	0,255	7	37	3	0,799
15	ARRACACHA	C.acet	24	0	0,798	0,193	5,8	37	3	0,972
16	ARRACACHA	C.acet	48	6,012	0,005	0,23	4,1	37	3	1,926
17	ARRACACHA	C.acet	72	0	1,734	0,789	5,7	37	3	1,025
18	ARRACACHA	C.acet	96	4,572	0	0,021	6,3	37	3	0,736
19	ARRACACHA	C.acet	120	10,27	0	0	6,5	37	3	0,528
20	ARRACACHA	C.sach	0	0	0	0	7	37	1	0,018
21	ARRACACHA	C.sach	24	0,94155	0	0,097	6,7	37	1	1,678
22	ARRACACHA	C.sach	48	0	0,94257	0,343	6,3	37	1	2,137

- Scripts usados para la generación de graficas

```
source("G:/TUTORDATES/BACTERIOLOGIA2/code/bac_analysisv3.R")
if (!dir.exists("results\\graficas")) {
  dir.create("results\\graficas")
}
data2 <- data %>%
filter(cepa=="M4") %>%
select(t_dia, butanol, ph, do) %>%
group_by(t_dia) %>%
summarize(
  butanol = mean(butanol, na.rm = TRUE),
  ph = mean(ph, na.rm = TRUE),
  do = mean(do, na.rm = TRUE)
)
long_data <- pivot_longer(data2, cols = -t_dia,
  names_to = "Product", values_to = "Concentration")
graf <- ggplot(long_data, aes(x = t_dia, y = Concentration, color = Product,
  shape = Product)) +
  geom_point()+
  geom_line() +
  labs(x = "Dia", y = "g/L", title = "Evolucion de la Produccion, DO y pH para la
  cepa M4") +
  theme_minimal() +
  scale_color_manual(values = c("black", "gray", "darkgreen", "blue", "red")) +
  scale_shape_manual(values = c(16, 17, 18, 15, 19)) + # Adjust shapes to match
  plot(graf)
source("G:/TUTORDATES/BACTERIOLOGIA2/code/bac_analysisv3.R")
data2 <- data %>%
filter(cepa=="M5") %>%
select(t_dia, butanol, ph, do) %>%
group_by(t_dia) %>%
summarize(
  butanol = mean(butanol, na.rm = TRUE),
  ph = mean(ph, na.rm = TRUE),
  do = mean(do, na.rm = TRUE)
)
```

R History

```
long_data <- pivot_longer(data2, cols = -t_dia,
names_to = "Product", values_to = "Concentration")
graf <- ggplot(long_data, aes(x = t_dia, y = Concentration, color = Product,
shape = Product)) +
geom_point()+
geom_line() +
labs(x = "Dia", y = "g/L", title = "Evolucion de la Produccion, DO y pH para la
cepa M5") +
theme_minimal() +
scale_color_manual(values = c("black", "gray", "darkgreen", "blue", "red")) +
scale_shape_manual(values = c(16, 17, 18, 15, 19)) +
theme(
panel.background = element_rect(fill = "white", color = NA), # white panel
background
plot.background = element_rect(fill = "white", color = NA), # white plot
background
legend.title = element_blank()
)
plot(graf)
filename <- paste0("results\\graficas\\m5.png")
ggsave(filename, plot = graf, width = 8, height = 6)
#CEPA M5
data2 <- data %>%
filter(cepa=="M5") %>%
select(t_dia, butanol, ph, do) %>%
group_by(t_dia) %>%
summarize(
butanol = mean(butanol, na.rm = TRUE),
ph = mean(ph, na.rm = TRUE),
do = mean(do, na.rm = TRUE)
)
long_data <- pivot_longer(data2, cols = -t_dia,
names_to = "Product", values_to = "Concentration")
```

Bibliografía

A continuación se presenta la bibliografía revisada y organizada según el estilo APA (7.^a ed.), ordenada alfabéticamente por apellido del primer autor y con DOI o URL cuando está disponible.

Abubackar, H. N., Veiga, M. C., & Kennes, C. (2018). Biobutanol production from starch-based feedstocks: Recent advances and future perspectives. *Bioengineered*, 9*(1), 321–336.

<https://doi.org/10.1080/21655979.2018.1459875>

Adegboye, M. F., Ojuederie, O. B., Talia, P., & Babalola, O. O. (2021). Bioprospecting of microbial strains for biofuel production: Metabolic engineering, applications, and challenges. *Biotechnology for Biofuels*.

<https://doi.org/10.1186/s13068-021-01999-4>

Alam, M. S., & Tanveer, M. S. (2020). *Bioreactors*. [Editorial].

Al-Shorgani, N. K., Kalil, M. S., Yusoff, W. M. W., & Hamid, A. A. (2019). Acetone–butanol–ethanol production by *Clostridium acetobutylicum* using different carbon sources. *Industrial Crops and Products*, 132*, 239–

248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.020>

Aristizábal, J., Sánchez, T., & Mejía Lorío, D. (2007). *Guía técnica para producción y análisis de yuca*.

Universidad Nacional de Colombia.

Barea, J.-M., Pozo, M. J., & Azcón, R. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56*(416), 1761–1778.

<https://doi.org/10.1093/jxb/eri217>

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17*(8), 478–486.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>

Bhowmick, G. D., Saha, R. K., & Ramkrishna, S. (2017). Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value-added products. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 16*(2), 289–329. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9436-4>

BP. (2022). *Statistical Review of World Energy 2022**. British Petroleum.

Cárdenas, D. P., Pulido, C., Aragón, Ó. L., Aristizábal, F. A., Suárez, Z. R., & Montoya, D. (2007). Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium* sp. mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de biodiésel. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 36*(2), 215–224.

Collas, F., Viamajala, S., Yang, S. T., & Buitelaar, R. M. (2012). Enzymatic hydrolysis of cassava starch for biobutanol production by *Clostridium beijerinckii**. *Bioresource Technology*, 118*, 149–157.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.042>

Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., & Bohórquez Macías, J. A. (2015). Anaerobic bacteria: Processes they perform and their contribution to soil ecology. *Anaerobe*, 33*, 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.009>

Cortazar, S. M., Wolf, E. D., & Armendáriz González, I. (2013). Effect of plant density on growth and yield in “Barraganete” plantain. *Plant Ecology*, 214*(1), 25–36. [[https://doi.org/10.1007/s11258-012-0122-](https://doi.org/10.1007/s11258-012-0122-1)

1](<https://doi.org/10.1007/s11258-012-0122-1>)

- Dennis, P. G., Miller, A. J., & Hirsch, P. R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology*, 72*(3), 313–327. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x>
- Durre, P. (2007). *Handbook on Clostridia*. CRC Press.
- Ewing, T. A., Nourse, N., van Lint, M., van Haveren, J., Hugenholtz, J., & van Es, D. S. (2022). Fermentation for the production of biobased chemicals in a circular economy: A perspective for 2022–2050. *Green Chemistry*, 24*(6), 2915–2933. <https://doi.org/10.1039/D1GC04364H>
- FAO. (2015). *Bioenergy and Food Security: The BEFS Analytical Framework*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Forte, H., & García, N. (2018). Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de un aislado de *Rhizobium* sp. S11. *Cultivos Tropicales*, 39*(2), 101–108.
- Geng, H., & Jiang, R. (2015). cAMP receptor protein (CRP)–mediated resistance/tolerance in bacteria: Mechanism and applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99*(12), 5359–5371. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6545-7>
- Global Carbon Budget. (2023). *Global Carbon Project*. <https://doi.org/10.18160/GCP-2023>
- Gu, Y., Hu, S., Chen, J., Shao, L., He, H., Yang, Y., ... Jiang, W. (2009). Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36*(10), 1395–1402. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0611-0>

Guanha, M. A., Realpe, M. D., & García, J. C. (2021). Obtención de polihidroxicanoatos (PHA) a partir de biomasa lignocelulósica: Una revisión. *Ingeniería y Competitividad*, 23*(1), 65–78.

<https://doi.org/10.25100/iyc.v23i1.12056>

Guo, M., Shi, W., & Buhain, J. (2015). Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42*, 712–725.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.013>

Heap, J. (2023). Ingeniería cromosómica de la producción inducible de isopropanol-butanol-etanol en *Clostridium acetobutylicum*. *Fronteras en Bioingeniería y Biotecnología*, 11*, 994.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.994>

IRENA. (2023). *Global Energy Transformation: A Roadmap to 1.5 °C*. International Renewable Energy Agency.

Jang, Y., & Etsahan, V. (2016). Ingeniería metabólica de *Clostridium acetobutylicum* para mejorar la producción de butanol. *Biotechnology Advances*, 34*(4), 483–495.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.04.001>

Jung, H. M., Moo-Young, J., & Min, K. Y. (2015). Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* for the production of cis,cis-muconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99*(19), 7991–8000.

<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6740-1>

Kamla, M., Capareda, S. C., Kamboj, R. B., Malik, S., Arya, S., & Bishnoi, D. K. (2024). Biofuels production: A review on sustainable alternatives to traditional fuels and energy sources. *Fuels*, 4*(1), 123–145.

<https://doi.org/10.3390/fuels4010010>

- Krueger, C. L., Radetski, C. M., Bendia, A. G., Castro-Silva, M. D. L., Rambo, C. R., & Lima, A. S. (2012). Bioconversion of cassava starch by-product into polyhydroxyalkanoates by *Bacillus* and related bacteria. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35*(2), 277–287. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0610-1>
- Lee, S. Y., Kim, H. J., & Park, J. H. (2023). Advances in metabolic engineering of *Clostridium* species for butanol production. *Biotechnology Advances*, 63*, 108116. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108116>
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101*(2), 209–228. <https://doi.org/10.1002/bit.21901>
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, Y., & Yan, Y. (2013). *Clostridium*: A promising biofuel producer. *Advances in Applied Microbiology*, 82*, 91–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00003-8>
- Lütke-Eversloh, T., & Bahl, H. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: Recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22*(5), 634–639. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.005>
- Mahish, P. K., Kumar Verma, D., Verma, K., Arora, C., & Otero, P. (2024). Microbial bioconversion of food waste to bio-fertilizers. *Sustainable Food Technology*, 15*, 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.suft.2024.02.002>
- Md. Saiful Alam, & Tanveer, S. (2020). Diseño sostenible y aplicaciones industriales en la mitigación de emisiones de gases de efecto invernadero. *Journal of Sustainable Engineering*, 12*(4), 215–232.

- Meléndez, J. R., Velásquez-Rivera, J., Salous, A. E., & Peñalver, A. (2021). Gestión para la producción de biocombustibles de segunda generación: Revisión del escenario tecnológico y económico. *Ingeniería Energética*, 42*(3), 89–108.
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments** (9th ed.). Wiley.
- Monica, P., Sánchez, T., Ceballos, H., Morante, N., & Dominique, D. (2016). Diversificación de los almidones de yuca y sus posibles usos en la industria alimentaria. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18*(1), 23–38.
- Nasser, N. K., Shorgani, A., Kalil, M. S., Mohtar, W., & Yusoff, W. M. W. (2013). Fermentation of sago starch to biobutanol in a batch culture using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum**. *Annals of Microbiology*, 63*(4), 1649–1654. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0592-8>
- Naik, S., Goud, V. V., & Prasant, K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14*(2), 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.017>
- Ntaikou, I., Antonopoulou, G., & Lyberatos, G. (2022). Recent developments in ABE fermentation: Efforts toward industrial sustainability. *Bioresource Technology*, 352*, 127075. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127075>
- Okabe, S., Oshiki, M., Shaoyu, C., Xi, W., Nukada, T., Haozhe, Z., ... & Satoshi, O. (2023). Mecanismos de tolerancia al oxígeno y desintoxicación en bacterias anaeróbicas oxidantes de amonio (anammox). *Nature Microbiology*, 8*, 710–718. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01392-x>

- Overend, R. P. (2000). Thermochemical conversion of biomass. *Fuel Processing Technology*, 65–66*, 149–155. [[https://doi.org/10.1016/S0378-3820\(00\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0378-3820(00)00137-1)](<https://doi.org/10.1016/S0378-3820%2800%2900137-1>)
- Patel, J. P., Patel, Y. S., & Panchal, H. K. (2022). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizospheric soil bacteria. *International Journal of Novel Research and Development*, 7*(3), 14–23.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11*, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Qureshi, N., Hughes, S., Maddox, I. S., & Cotta, M. A. (2006). Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28*(2), 93–102. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0026-x>
- Rao, A., Sathivelu, A., & Mythili, S. (2016). Genetic engineering in biobutanol production and tolerance. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59*, e16160212. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160212>
- Rusănescu, C. O., Cioban, M., Rusănescu, M., & Dinculoiu, R. L. (2024). Pretreatments applied to wheat straw to obtain bioethanol. *Applied Sciences*, 14*(1), 310. <https://doi.org/10.3390/app14010310>
- Shao, X., Babu, R., Zhang, M., Mielenz, J., Brown, S., Guss, A., & Lynd, L. R. (2011). Mutant selection and phenotypic and genetic characterization of ethanol-tolerant strains of *Clostridium thermocellum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92*(4), 719–727. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3950-7>

Suárez-Bertoa, R., Zardini, A., & Keuken, H. (2015). Impact of ethanol-containing gasoline blends on emissions from a flex-fuel vehicle tested over the Worldwide Harmonized Light-duty Test Cycle (WLTC). **Fuel*, 144*, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.12.053>

Survase, S. A. (2011). Continuous and batch acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation using **Clostridium beijerinckii**. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38*(2), 267–275. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0801-y>

Tiotiu, A. I., Novakova, P., Denislava, N., Chong-Neto, H. J., Novakova, S., & Krzysztof, K. (2020). Impact of air pollution on asthma outcomes. **International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17*(5), 1754. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051754>

Wang, S., Huang, H., Kahnt, J., Müller, A. P., Köpke, M., & Thauer, R. K. (2020). NADP-specific electron-bifurcating $[FeFe]$ -hydrogenase in a functional complex with formate dehydrogenase in **Clostridium autoethanogenum**. **Journal of Bacteriology*, 202*(3), e00559-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00559-19>

Zhang, C., & Yang, S. T. (2009). Inhibitory effect of butyric acid on butanol fermentation by **Clostridium beijerinckii**. **Applied Microbiology and Biotechnology*, 82*(5), 917–926. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1888-y>

Zhao, J., Guo, L., Lu, C., & Wei, X. (2021). Optical density measurements and dry cell weight correlation for **Clostridium** species in solvent fermentation. **Microbial Cell Factories*, 20*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01599-1>

Zhao, Y., Zhang, Y., & Yang, S. T. (2019). Metabolic flux analysis and process optimization for ABE fermentation using **Clostridium beijerinckii**. **Biochemical Engineering Journal*, 151*, 107319.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107319>

Zhang, X., & Yu, J. (2021). Fermentative production of bio-butanol: Recent progress and future prospects.

Renewable and Sustainable Energy Reviews, 150, 111484.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111484>

