



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.



**PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y METANO Y SU RELACIÓN CON
POBLACIONES MICROBIANAS EN UN SISTEMA ANAEROBIO
SERIADO A PARTIR DE VINAZAS TEQUILERAS CRUDAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA

PRESENTA

IB JESÚS ROBERTO MUÑOZ ESTRADA

COMITÉ TUTORIAL

DR. OSCAR AGUILAR JUÁREZ

DR. JESÚS BERNARDINO VELÁZQUEZ FERNÁNDEZ

DRA. ERIKA NAHOMY MARINO MARMOLEJO

DR. EDÉN OCEGUERA CONTRERAS

GUADALAJARA, JALISCO. MARZO 2021



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 12 de marzo de 2021

CP/231/2021

JESÚS ROBERTO MUÑOZ ESTRADA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1803CA6406
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Producción de hidrógeno y metano y su relación con poblaciones microbianas en un sistema anaerobio seriado a partir de vinazas tequileras crudas**" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dr. Oscar Aguilar Juárez Director de tesis
Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández. Co-director de tesis
Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo. Asesora de tesis
Dr. Edén Ocegueda Contreras. Asesor de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordiñadora de Posgrados



Guadalajara, Jalisco a 25 de febrero de 2021

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Jesús Roberto Muñoz Estrada**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y METANO Y SU RELACIÓN CON POBLACIONES MICROBIANAS EN UN SISTEMA ANAEROBIO SERIADO A PARTIR DE VINAZAS TEQUILERAS CRUDAS” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Ciencias Ambientales durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 25 del mes de febrero del año dos mil veintiuno.

Director de tesis



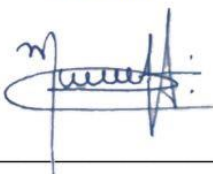
Oscar Aguilar Juárez

Co-director de tesis



Jesús Bernardino Velázquez Fernández

Asesora



Erika Nahomy Marino Marmolejo

Asesor



Edén Ocegüera Contreras

Comité tutorial

El comité tutorial consta de los siguientes integrantes:

Director de tesis: Dr. Oscar Aguilar: Unidad de Tecnología Ambiental, CIATEJ.

Codirector de tesis: Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández: Unidad de Biotecnología Ambiental, CIATEJ.

Asesora: Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo: Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, CIATEJ.

Asesor: Dr. Edén Ocegüera Contreras: Profesor investigador, UdG

Financiamiento

La presente tesis fue financiada por el proyecto “Clúster Biocombustibles Gaseosos” bajo la propuesta 247006 del Fondo Sectorial CONACyT y Secretaría de Energía-Sustentabilidad Energética.

Agradecimientos

A CIATEJ, por permitirme laborar en la institución y ser parte de mi formación como profesionista.

A CONACyT, por otorgarme la beca con CVU 913709 y su apoyo en general a la ciencia en México.

Al Clúster Biocombustibles Gaseosos, fondo SENER-CONACYT Sustentabilidad Energética, proyecto 247006, por permitirme colaborar y financiar el proyecto, así como el apoyo económico que me fue otorgado para concluir el presente trabajo.

Al Dr. Oscar Aguilar Juárez, por asegurar todos los recursos materiales que se requirieron para el desarrollo experimental, así como al Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández, por su profundo conocimiento y asesoría integral. El comité directivo fue un pilar fundamental para la investigación y desarrollo.

A la Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo, y al Dr. Edén Ocegüera Contreras, por complementar con su conocimiento y evaluar críticamente, construyendo y ampliando el presente trabajo.

A Alexandra Elbakyan, por su aportación y dedicación al conocimiento libre, eliminando barreras en el camino de la ciencia.

Finalmente, pero no menos importante, a mi equipo de trabajo de laboratorio, cuyas aportaciones fueron críticas para que se cumplieran los propósitos de la presente investigación, al cual pertenecen, pero no están limitados a: IBT Yeranny Govea, IQ Luis Ábrego, MC Roberto Bolaños y MC Manuel García. Algunos pusieron cimientos fuertes en la investigación y otros me acompañaron durante el proceso, guiándome y construyendo a mi par.

Dedicatoria

Debo mi eterna gratitud a aquellos quienes me acompañaron durante todo este proceso, apoyándome de manera incondicional y sobre todo a quienes nunca se ausentaron por más difícil que fuese.

Al Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández, el cual no sólo me apoyó en los análisis, sino también me brindó asesoría sin importar día u hora, sin falta. Por aguantar mi manera de ser y a la vez ayudar en mi formación, no sólo en cuanto a lo profesional, sino también de manera interpersonal. De la misma manera, agradezco a la Dra. Cristina Torres Duarte por su apoyo en etapas críticas.

Asimismo, las aportaciones de muchos integrantes de la unidad que fueron sumamente valiosas, los cuales incluyen, pero no están limitados a: IQ Marcos Macías, a MC Moisés Mendiola, a MC Sara Sánchez, a MC Estela Valdez, a MC Diego Tuesta y a muchos otros.

Además, me encuentro muy grato ante todos mis amigos de la unidad y mis compañeros de CIATEJ en general, pero mencionando a algunos: Enrique Campos, Vanessa, Marcela, Andrés, Iliany, David, Roger, Israel, Vasti, entre otros. Agradezco especialmente a IQ Luis Ábrego por comprenderme, ayudarme, ser mi compañero incondicional en CIATEJ pero también mi amigo fuera de la institución, por atravesar junto conmigo situaciones de muchísimo estrés y ayudarme a manejarlas.

Resumen

Uno de los retos actuales es encontrar y generar fuentes de energía eficientes y menos dañinas para el medio ambiente. El hidrógeno es un gas acarreador de energía eficaz y limpia, que se genera de manera mayoritaria en el proceso de la fermentación oscura de vinazas. Es posible enfocar la producción hacia este gas, mediante pretratamientos al inóculo o manipulación de variables operativas. El efluente de este proceso es rico en ácidos grasos, aprovechable en un paso consecuente para la producción de metano, el cual es un acarreador energético gaseoso comparable y con mucho potencial, al poderse emplear técnicas para comprimirlo y facilitar su uso y distribución. En la primera etapa del presente trabajo, se evaluaron las poblaciones microbianas en ausencia o adición de nutrientes extra en fermentaciones mesofílicas de vinazas tequileras en lote. Se encontró que, las poblaciones microbianas son principalmente anaerobias estrictas, productoras de hidrógeno y de ácidos grasos volátiles tales como *Klebsiella* o *Clostridium*, siendo estos géneros los más abundantes en todas las muestras durante la fermentación.

En la segunda etapa experimental, se evaluó el desempeño de un sistema anaerobio en serie AMBBR-UASB (reactor de biopelícula de lecho móvil anaerobio y reactor anaerobio de manto de lodo con flujo ascendente) operando en condiciones de mesofilia empleando como influente vinazas tequileras crudas. Se incrementó gradualmente la carga orgánica en 6 fases hasta llegar a vinaza sin dilución a una concentración de 32.01 g DQO L⁻¹ y carga orgánica volumétrica hasta de 174.63 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Se analizó la microbiota planctónica en el AMBBR, en las biopelículas de los soportes del AMBBR y el lodo anaerobio granular (LAG) del UASB. La productividad de gas más alta obtenida en el AMBBR fue de 3.72 NL Lr⁻¹ d⁻¹ en la fase 2, mientras que en el UASB fue de 0.5483 NL Lr⁻¹ d⁻¹ en la fase 5 (30 g DQO L⁻¹). La producción de hidrógeno en el AMBBR fue constante a lo largo del experimento (oscilando alrededor de 85% en abundancia relativa). Mientras tanto, la composición del gas en el *headspace* del UASB fue altamente variable, obteniendo la mayor proporción de hidrógeno (80.53%) en la fase 4 (25 g DQO L⁻¹), y la mayor, de metano

(53.93%) en la fase 2 (15 g DQO L⁻¹). En la fase 5, la remoción estable de DQO fue la mayor en el AMBBR (alrededor de 26%) y de manera global (alrededor de 46%).

En el AMBBR, *Sporolactobacillus* y *Clostridium* fueron los prevalentes de manera planctónica. *Prevotella* aumentó a partir de la fase 3 conforme progresaba el experimento, de manera concomitante a la disminución de *Acetobacter*. De manera similar, *Sporolactobacillus* y *Prevotella* fueron las más abundantes en los soportes del AMBBR (más del 40% de manera conjunta) junto con, aunque en menor abundancia, *Bifidobacterium* y *Clostridium*. De las muestras de LAG, el taxón más abundante fue *Prevotella*, seguido por *Sporolactobacillus*. La abundancia de *Methanobacterium* disminuyó a partir de la fase 3, reflejado en la disminución de producción de CH₄. *Clostridium* y *Acetobacter* no sufrieron cambios notables a lo largo de todo el proceso.

Los resultados sugieren que *Clostridium* y *Sporolactobacillus* están presentes y mantienen su abundancia a lo largo del proceso fermentativo, independientemente de la carga orgánica o dilución de las vinazas. La abundancia relativa de otros géneros varía notablemente en función de la concentración de carga orgánica, como por ejemplo, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* o *Prevotella*. Ya que la composición microbiana es altamente sensible a la configuración del reactor y otras variables operativas, se recomienda estudiar a profundidad los sistemas en serie y evaluar la producción de gas en función de la dinámica poblacional y su correlación con otras variables, así como futuros estudios dedicados a analizar los perfiles de transcriptómica, proteómica y metabolómica.

Abstract

Currently, one of the challenges is to find and generate energy sources that are efficient and less harmful to the environment. Hydrogen is a promising energy carrier gas which meets the previous criteria and is one of the main gaseous products in a process called dark fermentation. It is possible to shift the production towards this gas by means of inoculum pretreatment or manipulation of operational parameters. The effluent resulting from this process is rich in volatile fatty acids, which can be used in a subsequent step for the production of methane, which is a comparable gas energy carrier with great potential, since its compression facilitates its use and distribution. In the first stage of the present work, the microbial populations were evaluated in the absence or addition of extra nutrients in mesophilic batch fermentations using tequila vinasses as substrate. The resulting microbial populations were detected to be mainly hydrogen- and volatile fatty acid-producing strict anaerobes, such as the genera *Klebsiella* or *Clostridium*, these being the most abundant in all samples during fermentation.

In the second experimental stage, the performance of an anaerobic two reactor in series system AMBBR-UASB (Anaerobic Moving Bed Biofilm Reactor-Upflow Anaerobic Sludge Blanket) was evaluated, working under mesophilic conditions and using raw tequila vinasses as substrate. The organic loading rate (OLR) was increased stepwise in 6 phases until reaching a state in which undiluted vinasse was being fed, corresponding to a COD of 32.01 g L⁻¹ and an OLR of 174.63 g L⁻¹ d⁻¹. The microbiota of planctonic cells in the AMBBR, biofilm on the carriers in the AMBBR and the anaerobic granular sludge (AGS) in the UASB was analyzed. The highest gaseous productivity achieved in the AMBBR was 3.72 NL Lr⁻¹ d⁻¹ in phase 2, while in the UASB the highest was 0.5483 NL Lr⁻¹ d⁻¹ in phase 5 (30 g COD L⁻¹). Hydrogen production in the AMBBR was constant throughout the experiment (oscillating around 85%, relative abundance). Meanwhile, gas composition in the UASB headspace was highly variable, reaching a peak in hydrogen relative abundance (80.53%) in phase 4 (25 g COD L⁻¹) and methane relative abundance (53.93%) in phase 2 (15 g COD L⁻¹). In phase 5, a

relatively stable COD removal of around 26% in the AMBBR and around 46% globally was the highest attained.

In the AMBBR, *Sporolactobacillus* and *Clostridium* were the most prevalent genera as planktonic cells throughout the experiment. *Prevotella* increased its relative abundance as of phase 3, concomitantly with the decrease of *Acetobacter*. Similarly, *Sporolactobacillus* and *Prevotella* were the most relatively abundant in biofilm samples (over 40%, added together) along with, although less abundant, *Bifidobacterium* and *Clostridium*. Regarding AGS samples, the most abundant taxon was *Prevotella*, followed by *Sporolactobacillus*. *Methanobacterium*'s relative abundance decreased as of phase 3, reflected in a decrease in CH₄ production. *Clostridium* and *Acetobacter* didn't undergo any noticeable changes throughout the whole process.

These results suggest that *Clostridium* and *Sporolactobacillus* are present and quite relatively abundant throughout the fermentative process, regardless of the OLR or vinasses dilution. The relative abundance of other genera vary greatly as a function of the concentration of the organic load, such as *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* or *Prevotella*. Given that the microbial composition is highly sensible to the reactor configuration and other operational parameters, it is recommended to study in depth other systems consisting of multiple reactors in series and analyze gas production as a function of microbial dynamics and its correlation with other variables, along with further studies to analyze the transcriptomic, proteomic and metabolomic profiles.

Índice de contenido

Comité tutorial	i
Financiamiento	ii
Agradecimientos.....	iii
Dedicatoria	iv
Resumen.....	v
Abstract	vii
Índice de contenido	ix
Índice de tablas	xiii
Índice de figuras	xiv
Glosario de siglas y terminología	xvi
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes	4
2.1. Producción biológica de gases acarreadores de energía a partir de efluentes industriales	4
2.1.1. La digestión anaerobia.....	5
2.1.2. La fermentación oscura.....	7
2.2. La metagenómica y su aportación a las ciencias ambientales	11
2.2.1. Metagenómica de <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i> mediante el análisis del gen <i>ARNr 16S</i>	12
2.2.2. Análisis de <i>ADNr 16S</i> en biorreactores anaerobios	14
2.3. Antecedentes directos	16
III. Planteamiento del problema	21
IV. Justificación	22

V. Hipótesis	23
VI. Objetivos	24
6.1. General.....	24
6.2. Específicos	24
VII. Metodología.....	25
7.1. Aprovechamiento de vinazas tequileras en lote	25
7.1.1. Estrategia experimental	25
7.1.1.1. Diseño del sistema y distribución	27
7.1.1.2. Monitoreo y muestreo.....	28
7.1.2. Métodos analíticos	29
7.1.2.1. Caracterización fisicoquímica del influente.....	29
7.2. Extracción de ADN de muestras del reactor en lote	29
7.2.1. Estandarización de tiempos de lisis	30
7.2.2. Pretratamiento y extracción	30
7.2.3. Pruebas de calidad	31
7.3. Secuenciación y análisis de las comunidades microbianas presentes en el reactor en lote	31
7.3.1. Características de la secuenciación.....	32
7.3.2. Procesamiento de secuencias	32
7.3.3. Análisis de comunidades microbianas	33
7.4. Producción de hidrógeno y biogás en serie.....	33
7.4.1. Estrategia experimental	33
7.4.1.1. Diseño del sistema y distribución	35
7.4.1.2. Monitoreo y control del sistema.....	36
7.4.1.3. Muestreo de líquido para caracterización fisicoquímica	36

7.4.1.4.	Toma de muestras biológicas.....	37
7.4.1.5.	Monitoreo y muestreo de gas producido	37
7.4.2.	Métodos analíticos	37
7.4.2.1.	Caracterización fisicoquímica del influente.....	37
7.4.2.2.	Composición gaseosa	38
7.4.2.3.	Caracterización fisicoquímica de muestras líquidas	38
7.5.	Extracción de ADN	38
7.6.	Secuenciación y análisis metagenómico	39
VIII.	Resultados y discusión	42
8.1.	Aprovechamiento de vinazas tequileras en lote y composición poblacional de los microorganismos presentes	42
8.1.1.	Características fisicoquímicas del sustrato	42
8.1.2.	Calidad de ADN de las muestras extraídas	43
8.1.3.	Composición microbiana presente en el reactor	43
8.2.	Rendimiento del sistema en serie AMBBR-UASB	48
8.2.1.	Características fisicoquímicas del sustrato	48
8.2.2.	Desempeño del AMBBR	49
8.2.2.1.	Producción de gas.....	49
8.2.2.2.	Remoción de carga orgánica.....	53
8.2.3.	Desempeño del UASB	54
8.2.3.1.	Producción de gas.....	54
8.2.4.	Desempeño global	58
8.2.4.1.	Remoción de carga orgánica global	58
8.3.	Estructura de las comunidades de microorganismos presentes en el sistema	59
8.3.1.	Composición de los microorganismos planctónicos en el AMBBR	60

8.3.2. Poblaciones presentes en las muestras de soportes para biopelícula del AMBBR64	
8.3.3. Composición de los microorganismos que forman parte del LAG en el UASB	68
8.4. Principales microorganismos del sistema y su relación.....	71
IX. Conclusiones.....	76
X. Prospectivas y limitaciones	78
XI. Bibliografía.....	79
XII. Anexos	89

Índice de tablas

Tabla 1. Reacciones químicas comunes de la digestión anaerobia.....	6
Tabla 2. Antecedentes del trabajo	17
Tabla 3. Variables operativas de los experimentos en lote	25
Tabla 4. Diseño de las fermentaciones en lote	26
Tabla 5. Composición del medio nutricional empleado.....	26
Tabla 6. Métodos empleados para la caracterización de las vinazas tequileras.....	29
Tabla 7. Descripción de muestras del reactor en lote	31
Tabla 8. Fases del experimento en continuo y cargas orgánicas empleadas.....	34
Tabla 9. Variables operativas del sistema en serie empleado para el experimento..	34
Tabla 10. Características del método de medición de gases.....	38
Tabla 11. Muestras del sistema AMBBR-UASB enviadas a secuenciar	40
Tabla 12. Caracterización fisicoquímica de vinazas tequileras con cocción	42
Tabla 13. Características fisicoquímicas de vinazas tequileras sin cocción.....	48
Tabla 14. Muestras de ADN extraídas del líquido del AMBBR	60
Tabla 15. Muestras de ADN extraídas de los soportes de biopelícula del AMBBR ..	64
Tabla 16. Muestras de ADN extraídas del sedimento del UASB	68

Índice de figuras

Figura 1. La digestión anaerobia	6
Figura 2. Variabilidad en las bases en función de la posición en el gen ADNr 16S..	14
Figura 3. Sistema empleado para las fermentaciones en lote	28
Figura 4. Sistema AMBBR-UASB.....	36
Figura 5. Abundancia relativa de OTUs identificados en el reactor en lote a nivel dominio.....	44
Figura 6. Abundancia relativa de OTUs identificados en el reactor en lote a nivel de filo.....	45
Figura 7. Abundancia relativa de OTUs identificados en el reactor en lote a nivel de género	47
Figura 8. Productividad gaseosa del AMBBR.....	50
Figura 9. Composición de los gases en el espacio de cabeza del AMBBR.....	51
Figura 10. Productividad de hidrógeno del AMBBR	52
Figura 11. Eficiencia de remoción de de carga orgánica del AMBBR	54
Figura 12. Productividad gaseosa del UASB.....	55
Figura 13. Composición de los gases en el espacio de cabeza del UASB.....	57
Figura 14. Productividad de metano e hidrógeno del UASB	58
Figura 15. Eficiencia de remoción de carga orgánica del sistema AMBBR-UASB ...	59
Figura 16. Abundancias relativas de los OTUs presentes en el AMBBR a nivel de filo de manera planctónica	61
Figura 17. Abundancias relativas de los OTUs presentes en el AMBBR a nivel de género de manera planctónica	63
Figura 18. Abundancias relativas de los OTUs presentes en la biopelícula de los soportes dentro del AMBBR a nivel de filo	65
Figura 19. Abundancias relativas de los OTUs presentes en la biopelícula de los soportes dentro del AMBBR a nivel de género.....	67
Figura 20. Abundancias relativas de los OTUs presentes en el sedimento del UASB a nivel de filo	70

Figura 21. Abundancias relativas de los OTUs presentes en el sedimento del UASB a nivel de género.....	71
Figura 22. Abundancias relativas de microorganismos productores y no productores de gas con contenido energético presentes de manera planctónica en el AMBBR ..	73
Figura 23. Abundancias relativas de microorganismos productores y no productores de gas con contenido energético presentes en la biopelícula de los soportes dentro del AMBBR	74
Figura 24. Abundancias relativas de microorganismos productores y no productores de gas con contenido energético presentes en el sedimento del UASB	75

Glosario de siglas y terminología

260/280	Relación entre la absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm con respecto a la absorbancia a 280 nm de una muestra. Es una medida de pureza del extracto de ADN.
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGE	<i>Agarose Gel Electrophoresis</i> ; electroforesis en gel de agarosa
AGV	Ácidos grasos volátiles
AMBBR	<i>Anaerobic Moving Bed Biofilm Reactor</i> ; reactor de biopelícula de lecho móvil anaerobio
Amplicón	Producto de PCR de una secuencia genética
<i>ARNr 16S</i>	Ácido ribonucleico ribosomal 16S. Gen presente en los dominios <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i> que al transcribirse da lugar a la subunidad ribosomal menor
B	Tipo de muestra biológica del líquido del AMBBR
C	Tipo de muestra biológica de los soportes con biopelícula del AMBBR
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de carbono
COD	<i>Chemical Oxygen Demand</i>
<i>Contig</i>	Fragmento de ADN formado <i>in silico</i> por la unión de dos secuencias con una región solapante
COT	Carbono orgánico total
CSTR	<i>Continuous Stirred Tank Reactor</i> ; reactor de tanque agitado continuo
COV	Carga orgánica volumétrica
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
Espacio de cabeza	Volumen dentro del reactor libre de líquido; fase gaseosa
H ₂	Hidrógeno
<i>Headspace</i>	Espacio de cabeza del reactor

<i>HPB</i>	<i>Hydrogen-producing bacteria</i> ; bacterias productoras de hidrógeno
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; cromatografía líquida de alta resolución.
L	Tipo de muestra biológica del LAG del UASB
Lr	Litro de reactor
LAG	Lodo anaerobio granular
MPA	<i>Methane-producing archaea</i> ; arqueas productoras de metano
N ₂	Nitrógeno
NGPB	<i>Not gas producing bacteria</i> ; bacterias no productoras de gas con contenido energético
NLH ₂	Litros de H ₂ normalizados a 0 °C, 1 atm
NT	Nitrógeno total
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i> ; unidad taxonómica operativa.
pH	Potencial de hidrógeno
<i>Singleton</i>	Clúster que consta de 1 sola secuencia al agrupar mediante bioinformática
SS	Solución salina
TRH	Tiempo de residencia hidráulico
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> ; reactor anaerobio de manto de lodo con flujo ascendente
Vinaza cruda	Efluente industrial al cual no se le ha suplementado nutrientes ni recibido tratamiento
V3-4	Región comprendida entre la región 3 y 4 del gen <i>ADNr 16S</i>

I. Introducción

En México, la tendencia energética permanece siendo aquella obtenida a partir de combustibles fósiles (gas, carbón, petróleo), lo que representa un promedio de 91.72% del consumo de energía total en los años 2018-2019 (BP, 2020). Desde el año 2010 al 2018, se ha detectado un aumento neto de 1.46% desde 8,271 PJ (petajoules) hasta 9,236 PJ (SENER, s.f.). En caso de seguir con esta tendencia, para el año 2025, el consumo nacional de energía estimado es alrededor de 10,279.21 PJ. El uso de combustibles fósiles, además de ser un recurso no renovable, genera emisiones de gases efecto invernadero. De acuerdo al Inventario Nacional de Emisiones de Gases y Compuestos de Efecto Invernadero, del total de las emisiones en el 2015 el 64% correspondieron al consumo de combustibles fósiles, señalando que la composición gaseosa promedio de las emisiones suele estar abundante en CO₂ (dióxido de carbono, 71% de las emisiones) y CH₄ (metano, 21% de las emisiones) (INECC & SEMARNAT, 2015), por lo que surge la necesidad de buscar y emplear energía a partir de fuentes renovables la cual genere la menor contaminación posible.

El biohidrógeno es un gas acarreador de energía con una capacidad calorífica de 143 kJ/g. Es generado por seres vivos a partir de diversos procesos, tales como fermentación oscura o la fotofermentación (también llamada fermentación luminosa). Su combustión genera sólo agua. Contribuye a la generación de energía limpia y sostenible al emplear comúnmente fuentes orgánicas consideradas desechos, por ejemplo, aguas residuales (Preethi *et al.*, 2019). Asimismo, el biometano es un acarreador energético comparable y es uno de los últimos productos de la digestión anaerobia. Su combustión genera energía comparable a la del hidrógeno, cuyo valor es de 55.5 kJ/g (Haynes *et al.*, 2014), así como agua y dióxido de carbono. A pesar de crear gases de efecto invernadero, se considera que produce menos a comparación del uso de combustibles fósiles (Chynoweth *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2015). El hecho de que el metano se pueda comprimir hasta menos de 1% del volumen original lo vuelve muy atractivo y competitivo para su uso en el sector transporte (Khan *et al.*, 2015).

Los procesos biológicos mediante los cuales se generan los gases anteriormente mencionados se pueden englobar en uno solo, llamado digestión anaerobia. A través de cuatro etapas, el sustrato es reducido principalmente a metano por acción de arqueas metanogénicas, las cuales forman una relación sintrópica con bacterias acidogénicas, disminuyendo el efecto contaminante de diversos tipos de efluentes al consumir los nutrientes presentes en este. La selección de bacterias (productoras de H₂) sobre arqueas mediante estrategias como pretratamiento al inóculo o con bajos tiempo de residencia hidráulico, se limita la producción de CH₄, y se genera preferencialmente H₂. Sin embargo, es posible que las mismas bacterias consuman este gas en su metabolismo, y generen ácido propiónico, valérico y caprónico. Por otro lado, es posible la generación de ácido láctico a partir de carbohidratos, que normalmente se utilizarían para hidrogenogénesis, sin que haya producción o consumo de este gas, por lo que podría interpretarse como una competición por sustrato. Los microorganismos que realizan las actividades ya mencionadas se encuentran dentro de algunos géneros de bacterias tales como *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Acetobacter* y *Bifidobacterium* (Ferreira-Rosa *et al.*, 2017).

Las vinazas tequileras son un efluente industrial de la región de Jalisco, México, característico por tener alcalinidad despreciable, pH ácido, así como una alta carga orgánica. Es la fracción líquida del desecho de producción de tequila y se estima que se producen 10-12 L de efluente por cada litro de tequila producido (López-López *et al.*, 2010). En los años recientes, la producción total de tequila se ha mantenido al alza, aumentando aproximadamente 64% del periodo 2015-2020, de 228.5 a 374 millones de litros (CRT, s.f.), equivalentes a una descarga de más de 1,300 millones de litros de vinazas tequileras. Dado su alto volumen de desecho y a las características que presentan, resulta ser candidato perfecto para los procesos anaerobios, ya que suelen presentar una carga orgánica mucho mayor a 1000 mg DQO L⁻¹, lo cual la convierte en agua residual de alta carga, para el cual el tratamiento anaerobio es óptimo (Anijiofor *et al.*, 2017).

La generación de los acarreadores de energía gaseosos y su uso, por lo tanto, se vuelve sostenible al emplearse desechos, cuya carga orgánica puede aprovecharse mediante procesos biológicos. Sin embargo, ha sido poca la investigación acerca del uso de reactores en serie empleando vinazas tequileras sin adición de nutrientes, así como los microorganismos presentes y su relación con la producción. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es evaluar la relación de la comunidad microbiana con el desempeño de producción de biogases de un sistema en serie optimizado que emplea vinazas tequileras crudas. La aportación de esta investigación es el uso de carga orgánica muy alta respecto a lo reportado (hasta $172 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), y el análisis del desempeño del sistema con respecto a la dinámica poblacional de los microorganismos más abundantes.

II. Antecedentes

2.1. Producción biológica de gases acarreadores de energía a partir de efluentes industriales

Debido a lo anteriormente mencionado, se ha desarrollado mucha investigación acerca de la obtención de gases con alto contenido energético por medio de microorganismos. Los principales procesos biológicos que se emplean actualmente son 3: La digestión anaerobia, la fermentación oscura y la fotofermentación (llamada así por la necesidad de incluir fuente de luz en el proceso, diferenciándola de la fermentación oscura). Además de estos métodos, existe otro proceso en el cual se aplica cierto voltaje a una celda (MEC; celda de electrólisis microbiana) para hidrólisis de agua en el ánodo en presencia de ácido acético (producido por acidogénesis/acetogénesis), mientras que en el cátodo se genera hidrógeno a partir de protones hidronio y electrones (Logan *et al.*, 2008).

La digestión anaerobia, detallado en la siguiente sección, es un proceso complejo en el cual participa una comunidad de microorganismos diversos. Estos actúan de manera sintrófica para la generación de CH₄ e H₂. Sin embargo, este último es intermediario y es usualmente consumido en el proceso. La fermentación oscura es un proceso trunco de la digestión anaerobia en la cual se limita el paso hacia metanogénesis. Los productos principales AGV y gas. En la fotofermentación, los principales productores son algas fotosintéticas, las cuales emplean CO₂ y H₂O en condiciones de anaerobiosis, mientras que algunas bacterias fotoheterótrofas consumen a su vez AGV para la generación de H₂ (Kapdan *et al.* 2006). Ya que este trabajo no abarca la fotofermentación ni celdas microbianas, en las secciones siguientes, se profundizará más en los procesos de digestión anaerobia y fermentación oscura.

Ya que este trabajo no abarca la fotofermentación ni celdas microbianas, en las secciones siguientes no se tratará el tema y, a su vez, se ahondará más en los procesos de digestión anaerobia y fermentación oscura.

2.1.1. La digestión anaerobia

Es un proceso microbiano capaz de convertir materia orgánica biodegradable, en ausencia de oxígeno, en biogás y biomasa. Este es ampliamente empleado para tratamiento de residuos como, por ejemplo, desechos de agricultura, digestores de lodo y aguas residuales. Consta de 4 etapas principales (Rajin, 2018), como se señala esquemáticamente en la Figura 1, las cuales se resumen a continuación:

- Hidrólisis. Los biopolímeros como polisacáridos, lípidos y proteínas se biotransforman a sus respectivos monómeros: aminoácidos, ácidos grasos y azúcares a través de enzimas microbianas extracelulares. Por ello, se necesita una comunidad robusta de microorganismos. Este paso es reconocido como limitante.
- Acidogénesis. Los monómeros de la etapa anterior son convertidos principalmente a ácidos grasos volátiles (AGV) y alcoholes por microorganismos acidogénicos. Hay formación de H_2 y CO_2 en este paso.
- Acetogénesis. La mayoría de los ácidos orgánicos son convertidos a acetato, CO_2 e H_2 por microorganismos acetogénicos.
- Metanogénesis. Organismos metanogénicos consumen acetato, CO_2 e H_2 , y generan principalmente CH_4 y CO_2 .

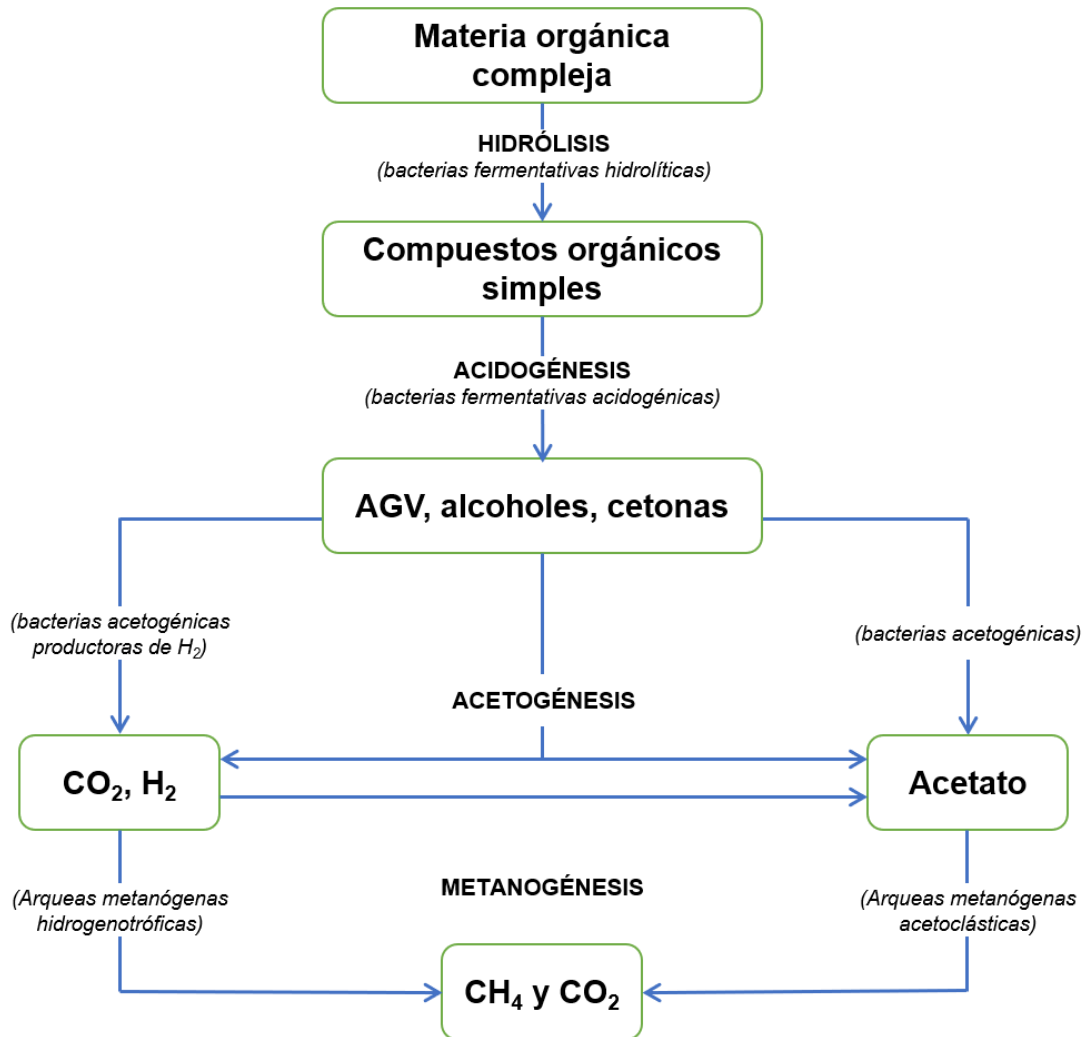


Figura 1. La digestión anaerobia. Adaptado de Moraes et al. (2015).

Algunas de las posibles reacciones químicas que ocurren en la digestión anaerobia, en las tres últimas etapas, se señalan en la Tabla 1. Como se mencionó arriba, las reacciones de la etapa de hidrólisis consisten en convertir polímeros a sus unidades fundamentales, por lo que es redundante incluirlo. En las reacciones de la última etapa, AGV, acetato (CH_3COO^-) o formato (HCOO^-) sirven como sustrato para ser transformados a moléculas de metano (CH_4), agua (H_2O), H_2 y bicarbonato (HCO_3^-) (Moraes et al., 2015).

Tabla 1. Reacciones químicas comunes de la digestión anaerobia. Adaptado de Moraes et al. (2015)

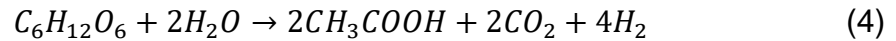
Etapa	Reacción química
Acidogénesis	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2CO_2 + 2H^+ + 4H_2$
	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$
	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2CO_2 + H^+ + 2H_2$
Acetogénesis	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$
	$CH_3CH_2COO^- + 2HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 3HCOO^-$
	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$
Metanogénesis	$CH_3COO^- + 2H^+ + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^- + H_2$
	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$
	$4HCOO^- + H_2O + H^+ \rightarrow CH_4 + 3HCO_3^-$

El costo-beneficio de este proceso puede ser substancial para desechos con una carga de DQO mayor a 500 mg L⁻¹, ya que el costo disminuye mientras la carga aumente. Esto es incluso menor a procesos aerobios. Por ejemplo, a una concentración de 2,000 mg DQO L⁻¹, el tratamiento anaerobio se vuelve tres veces más barato, mientras que si la carga orgánica aumenta a 12,000 mg L⁻¹ se vuelve diez veces más barato. Una de las desventajas de la digestión anaerobia es que, si se emplea para el tratamiento de aguas residuales, es común que no cumpla con la normativa para descarga en cuerpos hídricos. En particular, la remoción de DBO, nitrógeno y fósforo es limitada (Dinsdale *et al.*, 2007). Asimismo, es difícil de implementar adecuadamente, ya que el sistema puede devenir inestable, acumular de productos, pH inestable, falta de nutrientes, sobrecarga, entre otros (Harun *et al.*, 2018).

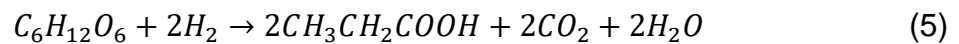
2.1.2. La fermentación oscura

Como se mencionó anteriormente, la fermentación oscura se logra limitando la etapa de la metanogénesis, en cuyo caso los principales metabolitos son H₂, CO₂, AGV y H₂O. Las principales rutas que puede llevar a cabo el proceso se indican a

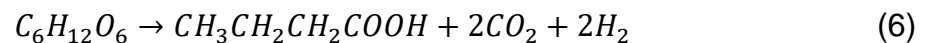
continuación en las ecuaciones (4) a (6) y (7) a (8), correspondientes a generación de AGV y solventogénesis, respectivamente.



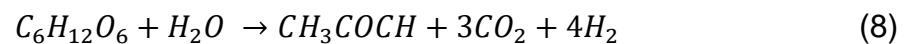
En (4), la glucosa se metaboliza a ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno. Es la principal reacción llevada a cabo en la ruta del ácido acético y es también la de mayor rendimiento. Teóricamente, cada mol de hexosa da lugar a cuatro moles de hidrógeno. Sin embargo, parte de los electrones se van a biomasa, además de que no suele ser la única reacción de acidogénesis, por lo que el rendimiento obtenido siempre estará por debajo de este valor teórico.



En (5), el hidrógeno se consume junto con glucosa para generar ácido propiónico, agua y dióxido de carbono. Es la principal reacción llevada a cabo en la ruta del ácido propiónico y es perjudicial porque usa como sustrato H_2 .



La ruta del ácido butírico se muestra en (6). Un mol de glucosa da lugar a un mol de ácido butírico, dos moles de hidrógeno y dióxido de carbono en proporciones iguales.



La solventogénesis se lleva a cabo como se muestra en (7) y (8), correspondientes a la ruta del etanol y acetona. Se destaca que la generación de acetona genera también cuatro moles de H_2 . Sin embargo, la calidad del gas resultante es ligeramente peor que en (4) por la generación de un mol adicional de CO_2 (Ding *et al.*, 2016).

Sin embargo, cabe resaltar que la producción de acetato no necesariamente tiene correlación con alta producción de hidrógeno. En el proceso de la homoacetogénesis, el H₂ reacciona con CO₂ en una proporción 4:1 para la generación de un mol de acetato. A pesar de que el género *Clostridium* ha sido ampliamente estudiado como productor de H₂, especies como *C. coccus* son capaces de realizar esta reacción (estudiado a pH neutro), posiblemente limitando la concentración de los gases ya mencionados en el tracto intestinal humano (Kamlage *et al.*, 1997).

Algunas de las ventajas de la fermentación oscura con respecto a otras de producción de H₂ son la nula necesidad de incluir luz en el proceso, no limitación por O₂ y productividad (L H₂ L⁻¹ d⁻¹) más alta que en los demás procesos usualmente. Sin embargo, entre las desventajas se encuentra el bajo rendimiento en base a sustrato (Rittmann *et al.*, 2012; Karthic *et al.*, 2012)

Las estrategias de selección de microorganismos en los biorreactores para mejorar la producción de H₂ son realmente variadas, pero se dividen en dos tipos: el pretratamiento a inóculo o control del sistema manipulando variables operativas. Los pretratamientos consisten en esterilización, sonicación, calentamiento por microondas (Guo *et al.*, 2008), radiación ionizante, mediante álcali o ácido (Yin *et al.*, 2014), aireación, cloroformo (Wang *et al.*, 2008) u otras sustancias como iodopropano o ácido 2-bromoetanosulfónico (Zhu *et al.*, 2006) y otros. Entre los más empleados, se encuentra el pretratamiento de choque térmico, el cual no sólo ha sido evaluado en lote en un periodo corto (Wang *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2006; Baghchehsaraee *et al.*, 2008), sino también en continuo en diversos sistemas (García-Becerra *et al.*, 2019; Cisneros-Pérez *et al.*, 2017). Entre las estrategias para controlar organismos metanogénicos o incrementar hidrogenogénesis han sido, entre otros, control por salinidad, pH ácido (Li *et al.*, 2020), disminución de TRH (tiempo de residencia hidráulico) (Romero-Aguilar, M. A. *et al.*, 2013; Elreedy *et al.*, 2015), siendo estos dos últimos los más destacados y empleados en la literatura.

En la fermentación oscura, se han reportado previamente desempeños variados en cultivos axénicos, es decir, de un solo microorganismo. *Clostridium* es uno de los más estudiados, ya que produce una alta calidad de gas con rendimientos buenos. Por ejemplo, en 2013, Jiang *et al.* reportaron que una cepa mutada de *C. tyrobutyricum* capaz de degradar almidón más eficientemente generó biohidrógeno con un rendimiento de 3.2 mol H₂ (mol glucosa)⁻¹. Por otro lado, empleando glucosa como único sustrato, *C. acetobutylicum* tuvo un rendimiento de 2.39 mol H₂ (mol glucosa)⁻¹ (Guerrero *et al.*, 2021). Otros géneros que se han investigado han sido *Ruminococcus*, *Thermoanaerobacterium*, entre otros (Ntaikou *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2008). Sin embargo, al ser cultivos axénicos, corren el grande riesgo de contaminación, por lo que el método pierde viabilidad para tratamiento de aguas y generación de energía. Por otro lado, hay muchos reportes de cultivos mixtos, es decir, comunidades de microorganismos que cumplen varios fines y poseen diversas interacciones. Uno de ellos, identificó por DGGE (electroforesis de gel de gradiente desnaturalizante) a algunas bacterias productoras de H₂ a partir de agua residual sintética (sacarosa o xilosa como única fuente de carbono) y detectaron presencia de *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, entre otros. Después las aislaron y determinaron sus rendimientos. Entre todas, *C. pasteurianum* obtuvo la mejor velocidad de producción (Lo *et al.*, 2008).

En cuanto a tiempos más largos de producción, las comunidades microbianas se pueden ver afectadas. Por ejemplo, Ahn *et al.*, en 2005, emplearon un TBR (reactor de lecho percolador) en condiciones asépticas (alimentación esterilizada por filtración), en termofilia (55-64 °C) y pH de 5.5 por 234 d. Después de extraer ADN (ácido desoxiribonucleico) de las biopelículas del filtro, lo amplificaron con cebadores para *Bacteria* y *Archaea*. Su análisis de DGGE consistió en escindir bandas y reamplificar para su secuenciación. Por un lado, se detectó H₂ y CO₂ prácticamente a concentraciones 1:1, mientras que no fue detectado CH₄. Por otro lado, no se detectó presencia de metanógenos, los más abundantes detectados fueron del filo *Firmicutes*, particularmente la banda con mayor fluorescencia fue relacionada con la bacteria *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. Posiblemente esto se deba a las

medidas asépticas manejadas o al pH. Por otro lado, en 2011, Luo *et al.* reportaron los microorganismos presentes en un sistema a través de repetidas fermentaciones en lote empleando inóculo pretratado de varias formas (ácido, choque térmico). Se demostró que el pretratamiento no afecta la prevalencia de los microorganismos dominantes (*Clostridium*, *Thermoanaerobacterium*). Los factores decisivos para el control de la metanogénesis y generación de acetato, a partir de H₂ (homoacetogénesis), son en realidad el pH y la temperatura, respectivamente.

En un sistema en continuo, Si *et al.* en 2015 determinaron el efecto del TRH en la metanogénesis y homoacetogénesis. Estas reacciones se suprimieron de TRH 24 a 4 h y hasta 2 h. Se llegó al valor más bajo y luego se aumentó. Es destacable que hubo presencia de homoacetógenos, por ejemplo, *Clostridium ljungdahlii*. Este hallazgo parece fortalecer la teoría de que los parámetros operativos son los factores decisivos para enfocar el proceso hacia la óptima producción de H₂. Además, al aumentar nuevamente el TRH de 4 a 8-12 h, la velocidad de producción disminuye, y regresa a valores similares a los obtenidos previamente a los TRH similares. De forma interesante, estos autores reportan que a los valores más bajos de TRH, la familia *Clostridiaceae* disminuye en abundancia, mientras que otros competidores no hidrogenogénicos, como *Ruminococcaceae* o *Leuconostocaceae* proliferan.

2.2. La metagenómica y su aportación a las ciencias ambientales

El conocimiento de muchas de las especies bacterianas identificadas hoy en día no sería posible mediante el sistema antiguo de identificación fenotípica por pruebas bioquímicas, ya que cultivarlos puede ser muy difícil. Asimismo, la asignación taxonómica actual descarta características fenotípicas, en favor de las genotípicas. La metagenómica se define como el análisis de ADN obtenido directamente de un ambiente, dado que requiere el muestreo de una comunidad de organismos que habitan un territorio común, sin necesidad de cultivo. En este sentido, provee, con menor sesgo, un acercamiento a la estructura de esa comunidad y a su potencial metabólico. Esta técnica permite el análisis de los tres dominios de la vida: *Eukarya*,

Bacteria y *Archaea*, incluso fagos (virus antagonistas de bacterias) (Yang *et al.*, 2018) pero principalmente se ha dedicado al estudio de microorganismos. Es muy importante en el ámbito biotecnológico debido a los avances que ha generado. Por ejemplo, al descubrir que las arqueas son capaces de oxidar amoníaco y que ahora se consideren una de las fuentes de su oxidación en muchos ecosistemas terrestres y marinos (Hugenholtz *et al.*, 2008).

Los análisis metagenómicos más realizados hoy en día para organismos procariotas son *Whole Genome Shotgun Sequencing* (secuenciación de escopeta del genoma entero) y el estudio del gen codificante del *ADNr 16S* (Ácido ribonucléico ribosomal; 16S es la subunidad menor del ribosoma). El primero consiste en obtener secuencias del genoma entero y luego ensamblarlas. El segundo consiste en el estudio de una región del ADN ribosomal que muestra cierto grado de conservación y variabilidad, lo cual permite la diferenciación a distintos niveles taxonómicos (Shah *et al.*, 2010). Ambas técnicas tienen sus ventajas y desventajas. *Shotgun Sequencing* es capaz de analizar múltiples fragmentos del ADN, por lo que se puede indagar en la funcionalidad del microorganismo sin tener que amplificar sólo una región en especial. Sin embargo, tiene la desventaja de presentar ambigüedades al momento de solapar fragmentos, provocadas por repeticiones en otras partes del genoma, o tamaños demasiado pequeños. La secuenciación parcial o total del gen *ARNr 16S* prácticamente solo da información para la diferenciación a distintos grados taxonómicos. Por otro lado, conocer la identidad de los microorganismos ya provee una ventaja, ya que en las bases de datos se suele tener el genoma completo secuenciado y, entonces, se puede inferir la funcionalidad (metabolismo) de la comunidad. Esta inferencia se limita al conocimiento que se tiene en las bases de datos, basadas en la funcionalidad de origen cromosómico.

2.2.1. Metagenómica de *Bacteria* y *Archaea* mediante el análisis del gen *ADNr 16S*

El análisis del *ADNr 16S* es una de las técnicas más empleadas para la identificación taxonómica de microorganismos no cultivables, así como del estudio metagenómico de nichos en ecosistemas o sistemas biotecnológicos, como el presente, para producción de energía. Actualmente, los costos de secuenciación han disminuido. Previamente se empleaba secuenciación Sanger, la cual generaba amplicones mucho más grandes. Hoy en día, con la plataforma Illumina® es posible obtener amplicones que, aunque presentan menor longitud (≤ 300 nucleótidos) tiene mejor rendimiento al generar mayor cantidad y disminuir precios (Johnson *et al.*, 2019).

En 1978, Brosius *et al.* lograron determinar por primera vez la secuencia completa de del gen codificante de la subunidad ribosomal menor (16S) de *Escherichia coli*. A partir de este logro, han sido innumerables los trabajos que se han realizado para detectar similitudes y variaciones a diferentes niveles taxonómicos interespecies o intraespecies. En la Figura 2, se observan las diversas regiones de este gen. Cada con una región relativamente conservada (valle). La alta variabilidad de las regiones permite discriminar, a distintos niveles, a un microorganismo del dominio *Archaea* o *Bacteria* (ya que ambos presentan el gen).

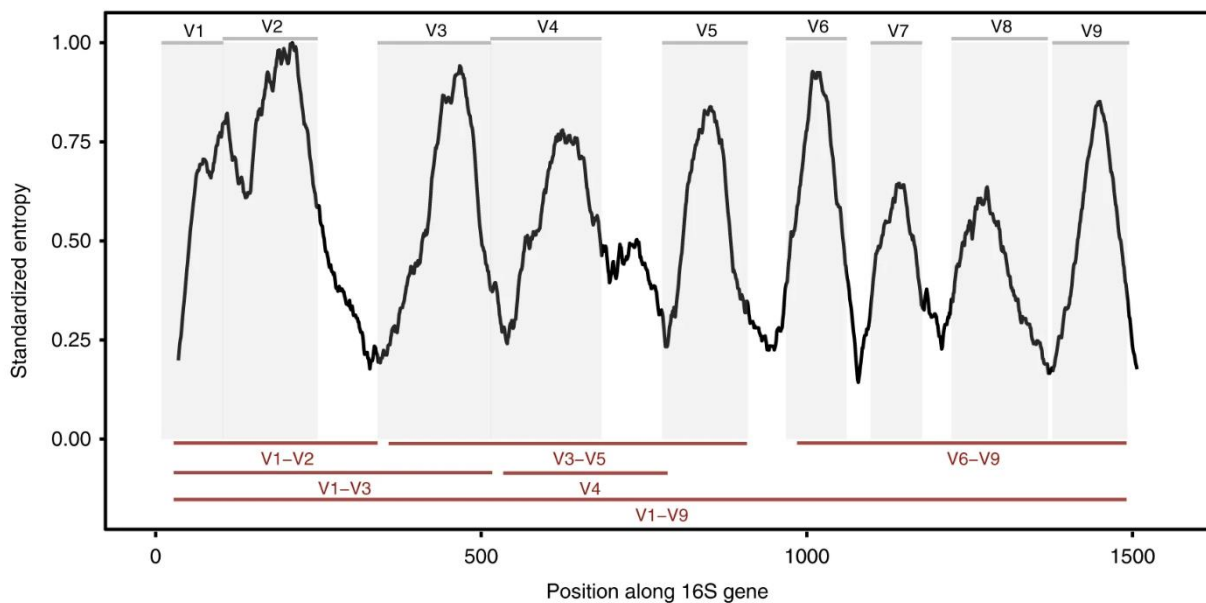


Figura 2. Variabilidad en las bases en función de la posición en el gen *ADNr 16S*. Se indica la entropía de Shannon del alineamiento de la secuencia de *E. coli* K-12 MG1655 contra la de cada especie presente en la base de datos de Greengenes. Imagen original de Johnson *et al.* (2019)

En el 2006, Mignard *et al.*, identificaron en al menos el 83.1% de cepas a nivel de especie. En 15.8% de los casos sólo fue posible la identificación hasta nivel de género, y en sólo 1% no se pudo identificar mediante esta herramienta. Amplificaron la región V6-V8, desde la posición 930 hasta la 1370. Este trabajo de investigación ayudó a la identificación de varias bacterias presentes en especímenes clínicos aislados que era imposible determinar su taxonomía por métodos fenotípicos rutinarios y da una idea de la capacidad de la técnica para discriminar taxonómicamente una unidad taxonómica operativa (OTU) a distintos niveles.

La limitación por longitud de la región a amplificar hace que sea necesario evaluar, en base a necesidades varias, cuál fragmento del gen *ADNr 16S* es óptimo secuenciar. Bukin *et al.* en 2019, tras analizar muestras de sedimento y agua marina, encontraron más claras diferencias usando la región V2-3 con respecto a la V3-4, esto es, la primera opción presenta mejor resolución a nivel de especie con respecto a la última debido al grado de conservación distinto de las regiones. Esto concuerda con lo reportado por Campanaro *et al.* en 2018, quienes demostraron que la región V1-2 permite una mayor discriminación a niveles taxonómicos bajos (especie, género, familia). Pese a ello, hay bacterias cuya región óptima para identificación es otra. Por ejemplo, para distinguir especies de *Clostridium*, es mejor la región V6 que la V3-4 (Cassir *et al.*, 2016). A pesar de todo esto, los análisis del gen *ADNr 16S* en biorreactores suelen ser en la región V3-4 (Fuess *et al.*, 2018; Iltchenko *et al.*, 2019).

2.2.2. Análisis de *ADNr 16S* en biorreactores anaerobios

Para conocer las poblaciones microbianas e indagar su posible efecto en el rendimiento de producción de gas en biorreactores, es relativamente sencillo y barato emplear la técnica ya mencionada y discutida. En estos biorreactores se emplean residuos agroindustriales para obtener energía y disminuir la carga orgánica. Para esto,

es necesario extraer el ADN de la biomasa de la manera óptima posible. Con el fin de lograr este objetivo, se emplean kits comerciales para ayudar a la repetitividad de los métodos. Se han realizado estudios para analizar el efecto de la selección del kit sobre la calidad del ADN obtenida, así como su influencia en la detección de comunidades bacterianas. Se determinó que el kit FastDNA™ Spin Kit for Soil presenta robustez comparable o superior (Corcoll *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2018) a los otros kits.

Dado todo esto, la composición poblacional de microorganismos en reactores anaerobios varía dependiendo de muchos factores, como la carga orgánica, el tipo de reactor y tipo de muestra (biopelícula, muestra de sedimento). En 2016, Yun *et al.* determinaron la respuesta microbiana ante concentraciones cada vez más grandes de carga orgánica (de 3.6 a 9.7 g DQO L⁻¹ d⁻¹) empleando agua residual de melazas como sustrato en un UASB con TRH variados (24-120 h). Emplearon los cebadores 340F y 805R para amplificar la región V3-4 del ADNr 16S transcrito. De las *Archaea*, el género *Methanosarcina* fue uno de los más abundantes (68-94%) seguido por *Methanosaeta* (4-30.5%). De la comunidad de bacterias, el filo *Firmicutes* fue uno de los más abundantes (27-64.5%). La presencia de *Methanosarcina* y algunas bacterias ácido-lácticas se relacionó con mayor producción de CH₄.

En contraste, se ha reportado predominancia de otro tipo de microorganismos a diferentes condiciones en el mismo tipo de reactor. En 2015, Marino-Marmolejo *et al.* reportaron la dominancia de *Clostridium* al final del proceso de acidogénesis en un UASB, empleando primero TRH de 36 h y bajándolo hasta 6 h. Después de esto, aumentaron la carga orgánica hasta 20 g DQO L⁻¹ d⁻¹ y, al final del experimento, analizaron la población de microorganismos resultantes. Cabe destacar que el inóculo empleado fue LAG (lodo anaerobio granular) sin algún tipo de pretratamiento. Mediante DGGE de fragmentos amplificados con los cebadores C356F y 517R, encontraron exclusivamente especies de *Clostridium*, del filo *Firmicutes*.

A continuación, se hablará acerca de trabajos similares a la presente investigación.

2.3. Antecedentes directos

En la Tabla 2 se muestran algunos estudios previos, en los que se reportan los resultados más relevantes para este trabajo:

Tabla 2. Antecedentes del trabajo.

Sistema	Sustrato	Variables operativas	Desempeño	Método de caracterización	Principales microorganismos	Referencia
Lote; inóculo pretratado	Glucosa (10 g L ⁻¹) suplementada con nutrientes varios	35 °C	100% H ₂ con pretratamiento térmico	Mediante DGGE de amplicones de 338F, 534R	<i>Clostridium tycobutyricum</i> , <i>C. vincentii</i> , <i>C. longisporum</i>	Ren <i>et al.</i> , 2008
Lote; inóculo pretratado y sin pretratar	Glucosa (5 g L ⁻¹) suplementada con nutrientes varios	37 °C, pH 4.5-6 para hidrogénicos y 7-8 para metanógenos	100% H ₂ con pretratamiento térmico	Cepas aisladas en placas. Amplificación de 63F, 1389R y secuenciación	Sin pretratar: Filos <i>Proteobacteria</i> (58%), <i>Firmicutes</i> (41%) Con pretratamiento a inóculo: Filo <i>Firmicutes</i> (más del 90%)	Alibardi <i>et al.</i> , 2012

APBR (reactor de lecho empacado)	Vinazas de caña de azúcar	55 °C, pH 5.1. COV de 84.2 g DQO L ⁻¹ d ⁻¹ .	Alrededor de 1.1 LH ₂ L ⁻¹ d ⁻¹ al inicio y al final del experimento	Extracción: FastDNA Spin Kit for Soil. Amplificación con 515F y 806R.	Géneros <i>Lactobacillus</i> (21-24%) y <i>Clostridium</i> (14-19%). <i>Thermoanaerobacterium</i> asociado a las altas producciones	Fuess <i>et al.</i> , 2018
Lote, LAG de inóculo	Vinazas de caña de azúcar	Mesofilia, pH 7.	Calidad de gas no reportada	Amplificación con 515F y 806R.	Desde inóculo: Filos <i>Proteobacteria</i> (26%), <i>Bacteroidota</i> (18%), <i>Euryarchaeota</i> (17%). Muestra de la mejor producción de CH ₄ : Filos <i>Bacteroidota</i> (58%), <i>Firmicutes</i> (14%), <i>Proteobacteria</i> (13%)	Itchenco <i>et al.</i> , 2019
2 PBR en serie	Vinazas tequileras diluidas.	35 °C, pH 5 y 7.7. 7-29 y 2.7-12 g	Reactor acidogénico: de 31 a 7.2%	Amplificación de <i>ARNr 16S</i> (cebadores no reportados) y q-	Primer reactor: Sólo 3% <i>Archaea</i> , resto <i>Bacteria</i> . Género <i>Prevotella</i> a relativamente baja COV	Toledo- Cervantes <i>et al.</i> , 2018

DQO L ⁻¹ d ⁻¹ de COV	remoción de DQO. Reactor metanogénico: Composición estable de CH ₄ de alrededor de 81%. Productividad de 1.06 a 4.1 LCH ₄ L ⁻¹ d ⁻¹ . Global: Remoción de DQO de 96% a 76%	PCR de <i>Archaea</i> , <i>Bacteria</i>	y nula presencia a la máxima COV estudiada. Segundo reactor: Géneros <i>Methanosarcina</i> , <i>Methanobacterium</i> a mínima COV estudiada; <i>Methanobacterium</i> prevalente (más del 90%) a la máxima. De <i>Bacteria</i> , género <i>Prevotella</i> dominante en la máxima COV estudiada
---	---	---	--

Previamente, García-Becerra *et al.* en 2019 reportaron una producción de H₂ a partir de vinazas tequileras (hasta 60 g DQO L⁻¹ d⁻¹) sin adición de nutrientes. Esta fue comparable a la de previos autores (Buitrón *et al.*, 2010) los cuales optaron por adicionar fuente de nitrógeno y sales en un reactor diferente (SBR en vez de CSTR) pero a condiciones similares de mesofilia y pH. Cabe destacar que, los autores mencionados no reportan microorganismos presentes o su dinámica poblacional. Puesto que para optimizar se emplean la menor cantidad de recursos, es importante escalar el proceso, volverlo viable para generar energía de forma industrial, y aprovechar las vinazas en volumen y carga orgánica. En este sentido, es importante evaluar el impacto en la producción de los microorganismos empleados como inóculo.

III. Planteamiento del problema

Con el fin de generar gases acarreadores de energía de manera viable, es necesario evaluar el uso de sustratos lo más crudos posibles. Se aumentaría la rentabilidad del proceso, si se pueden usar los residuos agroindustriales sin adición de otras sustancias, o con condiciones cercanas a temperatura ambiente, es decir, mesofílicas.

Trabajos previos se han enfocado a la producción óptima de biogás a partir de sustratos simples y con cultivos axénicos. Hoy en día, se emplean cultivos mixtos en sustratos complejos, como las aguas residuales agroindustriales, para disminuir la contaminación por el efluente, generar energía más limpia, y disminuir el uso de combustibles fósiles. La mayoría de los trabajos analizan sistemas de una sola etapa o, en el caso de dos o más reactores son analizados en discontinuo, esto es, el efluente del primero se conserva, se modifica y luego se alimenta al segundo. Asimismo, siendo fundamentalmente un proceso biológico, depende completamente de los microorganismos presentes y sus facultades. A pesar de ello, no todos los trabajos reportan composición microbiana.

El presente trabajo pretende generar conocimiento acerca de la producción de gases acarreadores de energía a partir de vinazas tequileras sin adición de nutrientes en un sistema en continuo de dos etapas. Asimismo, evaluar la posible relación entre los microorganismos presentes de forma planctónica, biopelícula o gránulos y la productividad gaseosa, para contribuir a la viabilidad del proceso.

IV. Justificación

El gran volumen de producción de vinazas tequileras y sus características permiten la valorización de este residuo líquido para emplearse como sustrato en digestión anaerobia o fermentación oscura. Es crítico el tratamiento a este efluente industrial, ya que algunos de sus usos (por ejemplo, como agua de riego) son perjudiciales. Por el contrario, su aprovechamiento representa varias ventajas, como la extracción de elementos de alto valor agregado (fenoles), y la generación de gases con alto contenido energético. Asimismo, el análisis metagenómico, como el análisis del gen *ADNr 16S*, permite conocer la composición microbiana presente en el proceso. Este es de gran utilidad, ya que un amplio porcentaje de microorganismos presentan dificultades para ser cultivables.

Es necesario evaluar la posible relación o efecto de dinámica poblacional microbiana sobre la producción de hidrógeno y/o metano en sistemas a altas cargas orgánica. Esto, ya que los estudios a la fecha, rara vez emplean el sustrato sin adición de agua (dilución) o diversos nutrientes, los cuales afectan la viabilidad y escalabilidad del proceso.

V. Hipótesis

La composición poblacional presente en un sistema de generación de acarreadores de energía gaseosos empleando vinazas tequileras fluctúa en función de la carga orgánica volumétrica y estos cambios impactan a la producción gaseosa.

VI. Objetivos

6.1. General

- Estudiar la dinámica poblacional en un sistema en serie optimizado para la producción de biohidrógeno y biogás en el que se emplean vinazas tequileras sin nutrientes como sustrato.

6.2. Específicos

- Determinar los microorganismos presentes en el proceso de aprovechamiento de vinazas con y sin adición de nutrientes en un reactor en lote empleando inóculo pretratado.
- En un sistema en serie de dos etapas (AMBBR-UASB) con vinazas tequileras crudas sin adición de nutrientes extra como insumo:
 - Evaluar el desempeño en términos de productividad gaseosa y consumo de carga orgánica a estadios de diferentes cargas orgánicas volumétricas.
 - Estimar la composición poblacional de los microorganismos presentes a altas cargas orgánicas, y su relación con el desempeño del sistema.

VII. Metodología

En la presente sección se describen los métodos y estrategias empleadas para cumplir con el objetivo general de investigación. El estudio es experimental longitudinal.

7.1. Aprovechamiento de vinazas tequileras en lote

Con la finalidad de cumplir el primer objetivo específico, se llevó a cabo el experimento como se describe a continuación.

7.1.1. Estrategia experimental

Para la fermentación de vinazas en configuración en lote, se empleó un CSTR de acrílico, cuyo interior fue homogeneizado con agitación magnético. Previo a cada corrida, el líquido se gaseó con N₂ para propiciar condiciones anaerobias. La temperatura fue mantenida con ayuda de una chaqueta térmica y las variables operativas son las que se muestran en la Tabla 3, de acuerdo con previos estudios (García-Becerra *et al.*, 2019).

Tabla 3. Variables operativas de los experimentos en lote.

Parámetro	Valor
Volumen operacional (L)	2.5
Volumen nominal (L)	3
Carga orgánica (g DQO L⁻¹)	20
Temperatura (°C)	37.5 ± 1
pH	7.5*-5.5
Oxígeno disuelto (%)	< 1

*pH al que se arrancó el experimento, se permitió su descenso hasta el valor óptimo de 5.5

Para poder evaluar las diferencias en poblaciones, se diseñaron 3 experimentos con diferencias nutrimentales, así como la procedencia del inóculo. En todos los casos, el

inóculo fue lodo anaerobio granular (LAG) procedente de plantas de tratamiento de aguas residuales industriales, el cual fue pretratado térmicamente en horno a 105 °C por 24 h para eliminar microorganismos metanogénicos (Buitrón *et al.*, 2010). Posteriormente se pulverizó y se conservó a temperatura ambiente en un frasco sellado previo a inoculación. En cada experimento se inocularon 6 g STV L⁻¹. En la Tabla 4 se muestran las características de las fermentaciones realizadas. Para los primeros dos tipos de fermentaciones, la única diferencia fue la adición de nutrientes (medio mineral, fuente de nitrógeno, buffer de fosfatos) (Dávila-Vázquez *et al.*, 2009) mostrados en la Tabla 5. La única diferencia entre las últimas dos fermentaciones fue la procedencia del inóculo. Se alimentó el reactor con vinazas con cocción procedentes de una tequilera ubicada en Tequila, Jalisco, las cuales se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Tabla 4. *Diseño de las fermentaciones en lote.*

ID de experimento	Inóculo tipo 1	Inóculo tipo 2	¿Adición de nutrientes?
a	X		No
b	X		Sí
c		X	Sí

Tabla 5. *Composición del medio nutricional empleado.*

Compuesto	Concentración final (mg L⁻¹)
NH₄Cl	3000
Na₂HPO₄	2885
NaH₂PO₄	650
MgCl₂ · 6H₂O	10
FeSO₄ · 7H₂O	2.5
MnSO₄ · 6H₂O	1.5
Na₂MoO₄ · 2H₂O	1.25
CuSO₄ · 5H₂O	0.5
CoCl₂	0.3

El pH de la alimentación fue ajustado al valor superior (Tabla 3) al inicio de la fermentación y se permitió su descenso hasta el valor inferior.

7.1.1.1. Diseño del sistema y distribución

El sistema empleado en los experimentos previamente detallados se muestra en la Figura 3. Los módulos de los cuales consiste se muestran a continuación:

[1]: Reactor de acrílico tipo CSTR en lote, homogeneizado mediante un agitador magnético y calentado con ayuda de una chaqueta térmica.

[2]: Sensores de medición de temperatura, pH y oxígeno disuelto ajustados mediante conexiones glandulares de diámetro acorde con los tamaños de los sensores. En las conexiones glandulares restantes, mangueras las cuales servían como 1) salida de gas hacia [5], 2) entrada de álcali y 3) toma de muestra.

[3]: LabQuest Mini; permite la conexión entre sensores hacia el equipo.

[4]: Equipo de registro de mediciones mediante el software Logger Pro[®].

[5]: Salida de gas del *headspace* (espacio de cabeza del reactor) y sensor μFlow , el cual normaliza la salida de gas a condiciones estándar y cuantifica volumen.

[6]: Equipo de registro de volumen de gas producido conectado a Wi-Fi. Ya que la finalidad no es evaluar la producción de gas, este resultado no se reporta en el presente trabajo.

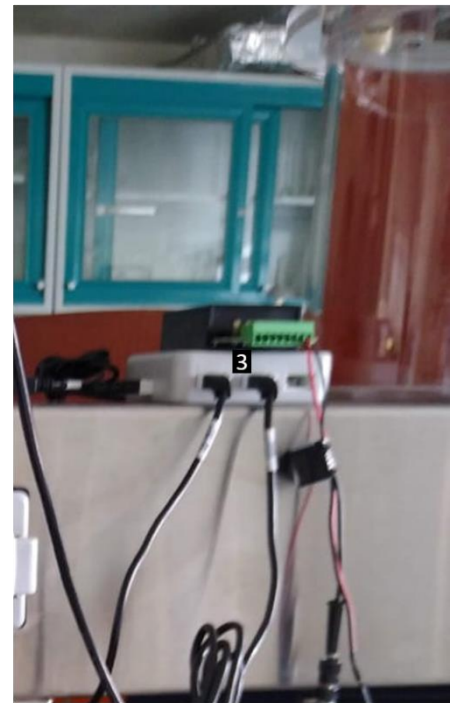


Figura 3. Sistema empleado para las fermentaciones en lote (ver texto para la especificación de los números).

7.1.1.2. Monitoreo y muestreo

Los sensores utilizados para llevar a cabo el monitoreo continuo fueron:

- Sensor de pH (pH-BTA, Vernier, Portland, OR)
- Sensor de oxígeno disuelto (ODO-BTA, Vernier, Portland, OR)
- Sensor de temperatura (TMP-BTA, Vernier, Portland, OR)

Los dispositivos antes mencionados permanecieron conectados a la interfaz LabQuest Mini (LQ-MINI, Vernier, Portland, OR) para poder conectarse al equipo, mediante el cual se llevaba a cabo el registro del valor de las variables operativas mediante el software Logger Pro®. El control de pH del sistema se dio con la adición de NaOH (hidróxido de sodio) 4 M. Se tomaron muestras del interior del reactor a lo largo del proceso de producción de H₂, distinguiendo cada una por la fase (exponencial o estacionaria, por ejemplo). Todas las muestras fueron conservadas a -20 °C previo a procesamiento, en tubos nuevos, libres de pirógenos y nucleasas.

7.1.2. Métodos analíticos

7.1.2.1. Caracterización fisicoquímica del influente

Se determinaron los siguientes parámetros de las vinazas tequileras con cocción empleadas como alimentación para las fermentaciones:

Tabla 6. Métodos empleados para la caracterización de las vinazas tequileras.

Parámetro/unidades	Método
DQO (g·L⁻¹ DQO)	10212 TNTplus 823 HACH
Carbono Orgánico Total (g·L⁻¹)	Combustión a 680 °C ¹
pH	Potenciómetro (HI-3512)
Fenoles totales (g·L⁻¹)	4-Aminoantipirina ²
Fósforo total (g·L⁻¹)	10127 TNT HACH
Nitrógeno total (g·L⁻¹)	10072 TNT HR HACH
Nitritos (mg·L⁻¹)	10237 TNTplus 840 HACH
Nitratos (g·L⁻¹)	10206 TNTplus 836 HACH
Azúcares totales (g·L⁻¹)	Fenol-Ácido Sulfúrico ³
Sólidos totales (g·L⁻¹)	NMX-AA-034-SCFI-2015
Sólidos totales volátiles (g·L⁻¹)	NMX-AA-034-SCFI-2015
Nitrógeno amoniacal (mg·L⁻¹)	10205 HACH TNTplus 832

¹ 5310 B (APHA, 2017)

² 5530 D (APHA, 2017)

³ Dubois *et al.*, 1956

7.2. Extracción de ADN de muestras del reactor en lote

El método de procesamiento de las muestras obtenidas de los experimentos previo a envío para secuenciación se detalla en los apartados siguientes.

7.2.1. Estandarización de tiempos de lisis

Para poder obtener ADN íntegro mediante el proceso de extracción, se estandarizó el tiempo de vórtex para cada tipo de muestras: 1) lodo pretratado a condiciones estándar y 2) sedimento del reactor. Se empleó el kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA). Tras agregar el buffer de lisis se agitó por vórtex a diferentes tiempos (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY) para determinar el óptimo. Este se evaluó visualmente con la mejor fluorescencia de banda (ADN íntegro) y el menor degradado posible en electroforesis en gel de agarosa (AGE) a 100 V, 40 min. Las bandas íntegras se observaron en una posición de más de 10 kb, mientras que el degradado se observó a un tamaño inferior a 1 kb. Cada carril fue cargado con 5 µL de muestra, 2 µL búfer de carga LB 6X, 2 µL de Gel Red 100X. Se contrastó contra el marcador de peso molecular de 1 kb (350 ng). Se determinó que el mejor tiempo de lisis en vórtex para muestras de lodo pretratado (a0, c0) es de 4 min, mientras que para las muestras del sedimento del reactor (a6, a7, b1, b2, b3, c1) es mejor emplear 3 min. Los electrogramas se muestran en el anexo A.

7.2.2. Pretratamiento y extracción

Las muestras líquidas del interior del reactor se centrifugaron a 10,000 x g por 7 min para sedimentar la biomasa y retirar el sobrenadante en condiciones estériles. Se empleó solución salina (SS) 0.85% NaCl estéril para homogeneizar el sedimento y conservarlo previo a extracción.

El ADN se extrajo de la biomasa de las muestras empleando el kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Irvine, CA) con ligeras modificaciones para mejorar la calidad de acuerdo con el manual del kit:

- Tiempos óptimos de lisis celular para cada tipo de muestra
- Doble lavado con PPS; incubación en hielo por 5 min posterior a homogeneización

- Mayor tiempo de contacto (15 min) con solución de *Binding Matrix*
- Mayor tiempo de evaporación de etanol residual (alrededor de 40 min)
- Incubación de resina en agua grado biología molecular (DES) por 3 min a 55 °C

Cada muestra fue eluida con 100 µL DES. El extracto fue preservado en congelación (-20 °C).

7.2.3. Pruebas de calidad

Se realizaron pruebas de calidad a los extractos para determinar concentración, integridad y pureza.

La integridad fue evaluada en AGE (Lee *et al.*, 2012) a condiciones estándar de la misma manera que se describió en el apartado anterior. La concentración y pureza fueron medidas y evaluadas en NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) de acuerdo con bibliografía (Philippe *et al.*, 2010). En resumen, la concentración se midió mediante absorbancia de la muestra a 260 nm considerando una constante de absortividad 50 ng/mlA de acuerdo con el programa para ADN de doble cadena. La pureza se evaluó mediante la relación 260/280. Las muestras se alicuotaron en tubos diferentes para servicio de secuenciación. El volumen total transferido fue de 30 µL.

7.3. Secuenciación y análisis de las comunidades microbianas presentes en el reactor en lote

Con el fin de conocer las poblaciones microbianas presentes en las muestras, se utilizó el servicio de secuenciación como se detalla:

Las muestras seleccionadas y su descripción se muestran en la Tabla 7. Cabe destacar que las fases a las que se refiere su descripción tienen que ver con la cinética de producción de H₂ y no hacen referencia a la fase de crecimiento bacteriano.

Tabla 7. Descripción de muestras del reactor en lote.

ID	Tiempo (h)	Nota
a0	0	Inóculo tipo 1
a6	48	Inicio de fase exponencial
a7	96	Inicio de fase estacionaria
b1	17	Inicio de fase exponencial
b2	26	Intermedio de fase exponencial
b3	49	Inicio de fase estacionaria
c0	0	Inóculo tipo 2
c1	18	Inicio de fase exponencial

7.3.1. Características de la secuenciación

Los extractos fueron enviados a la empresa RTL Genomics (Lubbock, TX) para secuenciación de la región V3-4 del *ADNr 16S* de los dominios *Bacteria* y *Archaea* (Qin *et al.*, 2020), empleando la plataforma Illumina Miseq PE 2x300 bp mediante los cebadores 357wF-CCTACGGGNGGCWGCAG y 806R-GACTACHVGGGTWTCTAAT (tamaño esperado del *contig* (solapando *Forward* con *Reverse*): alrededor de 450 bp), solicitando al menos 100,000 hits por muestra (Campanaro *et al.*, 2018).

7.3.2. Procesamiento de secuencias

Los archivos en formato fastq, productos de secuenciación, se procesaron en el sistema operativo Linux empleando vsearch (Bailén *et al.*, 2019), el cual es una herramienta bioinformática de libre uso (Rognes *et al.*, 2016) de la forma que se describe en el anexo D. En resumen, las secuencias brutas obtenidas fueron sometidas a análisis de calidad y depuración (teniendo en cuenta el tamaño de amplicón de alrededor de 300), empleando el script *flash* para formar *contigs*, *vsearch derep_fulllength* para desreplicar, *uchime_denovo* para eliminar quimeras, *singletons_filter.pl* para remover secuencias únicas (singletons) para posteriormente

agrupar OTUs a un nivel de similitud del 97%, finalmente se contrastaron contra la base de datos SILVA versión 138 (2019, Yilmaz *et al.*, 2014).

7.3.3. Análisis de comunidades microbianas

La matriz de OTUs, resultado del procesamiento ya mencionado, fue graficada empleando MATLAB® versión 2018a a los niveles taxonómicos de dominio, filo y género para verificar predominancia del dominio *Bacteria*, así como identificar los taxones más abundantes. El script empleado, como ejemplo, se muestra en el anexo E.

7.4. Producción de hidrógeno y biogás en serie

Para cumplir con el segundo y tercer objetivo del presente proyecto, se decidió emplear un sistema en serie optimizado el cual fuera capaz de aprovechar la materia orgánica presente en las vinazas tequileras para la producción. Fue aclimatado desde una carga relativamente pequeña (alrededor de 1/3 de la carga orgánica total del promedio de las vinazas tequileras muestreadas) hasta la carga completa (100% de la carga orgánica). Así, se dividió en varias fases para evaluar la producción de gases y su calidad, así como la composición poblacional de los microorganismos. El experimento se detalla en los apartados a continuación.

7.4.1. Estrategia experimental

Se utilizó un sistema de reactores en serie AMBBR-UASB (reactor de biopelícula de lecho móvil anaerobio-reactor de manto de lodo de flujo ascendente) de material de acrílico previamente diseñado por el equipo de trabajo. El experimento se llevó a cabo en un periodo de 3 meses, dividido en 6 fases totales, en donde la primera fase fue de aclimatación del inóculo, alimentando con vinaza diluida. En las fases siguientes se incrementó la carga orgánica volumétrica (COV) en intervalos regulares, de manera que la dilución disminuyó hasta la última fase, en donde se alimentó con vinaza

alcalinizada sin diluir y sin adición de nutrientes. El resumen de las fases del experimento se muestra en la Tabla 8. Cabe destacar que la COV calculada fue tomando en consideración solo la primera etapa del sistema (AMBBR), ya que el influente de la segunda está en función de la remoción de la anterior.

Tabla 8. Fases del experimento en continuo y cargas orgánicas empleadas.

Fase	1	2	3	4	5	6
[] DQO sustrato (g L⁻¹)	10	15	20	25	30	28.78-32.01
COV (g DQO L⁻¹ d⁻¹)	54.54	81.81	109.09	136.36	163.63	157.01-174.63

Las variables operacionales con las que se trabajó se señalan en la Tabla 9. Ambos reactores trabajaron en régimen en continuo y en serie, es decir, el efluente del AMBBR alimentó al UASB directamente.

Tabla 9. Variables operativas del sistema en serie empleado para el experimento.

Reactor	AMBBR	UASB
Volumen operacional (L)	0.74	9.1
Volumen nominal (L)	1	10
Temperatura (°C)	37.36 ± 0.65	37.36 ± 0.65
pH	5.62 ± 0.23	6.5 – 7.5*
Oxígeno disuelto (%)	< 3	< 3
TRH (h)	4.23	52

*Se midió al efluente

Se emplearon vinazas tequileras sin cocción para alimentar el sistema (de la manera descrita en la presente sección) con las características como se muestran en el apartado 8.2.1. Se optó por emplear este tipo de vinaza ya que, por su proceso, contiene menos sólidos los cuales pueden obstruir las mangueras del sistema. El inóculo empleado para el AMBBR (4.5 g STV L⁻¹) (Corona *et al.*, 2018) fue LAG pretratado (tipo 2) como se señaló en la sección 7.1.1, mientras que el inóculo empleado para el UASB fue LAG (20 g STV L⁻¹) (Corona *et al.*, 2018) sin pretratamiento,

obtenido de una planta de tratamiento de vinazas tequileras. Asimismo, se colocaron 150 soportes para biopelícula tipo Kaldnes K1 (9.1 mm diámetro; área específica de $500 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$) (Rusten *et al.*, 2006) ya que previamente se ha demostrado que este es capaz de generar una biopelícula gruesa, favoreciendo aún más las condiciones anóxicas (Bassin *et al.*, 2016), llegando a una densidad de soportes de 200 unidades L^{-1} .

7.4.1.1. Diseño del sistema y distribución

El sistema AMBBR-UASB se muestra en la Figura 4. La descripción de cada una de las unidades que lo componen se muestra a continuación:

[1]: Recipiente de alimentación. Contiene la vinaza tequilera influente al sistema, enfriada con ayuda de hielo en la parte exterior del recipiente interior.

[2]: Bombas peristálticas. Trabajando a 3.7 RPM, alimentan al AMBBR y bombean desde este al UASB.

[3]: AMBBR; reactor de biopelícula de lecho móvil anaerobio. Homogeneizado mediante un agitador magnético y calentado por una chaqueta de agua.

[4]: UASB; reactor de manto de lodo de flujo ascendente. La manguera que conecta ambos reactores se utilizó como punto de muestreo de líquido del AMBBR. Cuenta con puertos de muestreo, uno de los cuales fue empleado para la obtención de LAG del manto.

[5]: Salida hacia bidón de efluente. Punto de muestreo para análisis.

[6]: Sensores, entradas y salidas del AMBBR. Punto de muestreo del espacio de cabeza para composición gaseosa.

[7]: LabQuest Mini; permite la conexión entre los sensores y el equipo.

[8]: Equipo de registro de mediciones hechas por los sensores, mediante el software Logger Pro[®].

[9]: Sistema de medición de producción volumétrica de gases. Los 2 μFlow normalizan a condiciones estándar la salida de gas de ambos reactores y la cámara registra los valores obtenidos.

[10]: Termocirculador a 40 ± 0.5 °C. Bomba agua a través de la chaqueta de los reactores para mantener la temperatura.

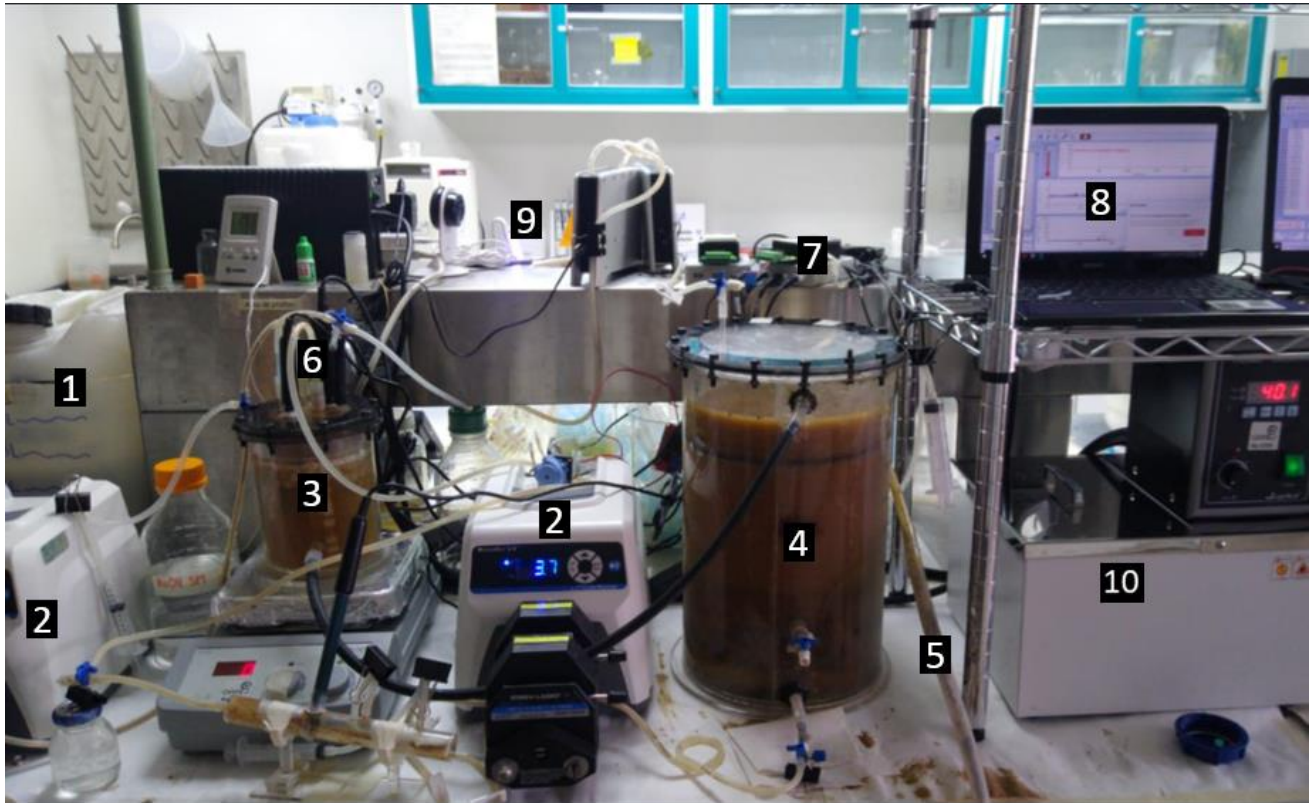


Figura 4. Sistema AMBBR-UASB.

7.4.1.2. Monitoreo y control del sistema

Los sensores, equipo y software utilizados para el monitoreo del sistema son los que se describen en el apartado 7.1.1.2. El control de pH en el AMBBR fue similar que en el sistema empleado para el experimento anterior. Sin embargo, en el caso del UASB se introdujo una cantidad variable de NaOH para que la medición del pH del efluente resultara lo más cercano a 7.

7.4.1.3. Muestreo de líquido para caracterización fisicoquímica

Los puntos de muestreo de líquido del sistema fueron a la salida del AMBBR y a la salida del UASB, particularmente, en el bidón de desecho. Ya que el AMBBR se mantuvo en constante agitación, se considera que el efluente del reactor es una muestra representativa de todo el líquido al interior de este. Se analizaron las muestras de cada dos días a partir de la fase 2 del experimento.

7.4.1.4. Toma de muestras biológicas

Con la finalidad de conocer la composición microbiana del sistema se tomó líquido del AMBBR (correspondiente a muestras tipo B) como se señala en el apartado anterior. Asimismo, se tomó muestra del LAG presente en el UASB (correspondiente a muestras tipo L) a través del puerto más próximo al manto de lodo. Se analizaron las muestras de estos dos tipos de muestra por dos veces cada semana. Por otro lado, se tomaron 20 soportes de biopelícula (correspondiente a muestras tipo C) al final de cada fase y se repusieron con soportes nuevos. De la misma manera, se tomó muestra de cada lote de vinaza (correspondiente a muestras tipo V). Todas las muestras fueron conservadas a -20 °C posterior a su obtención, en tubos nuevos, libres de pirógenos y nucleasas. Las muestras tipo B y L se tomaron desde la fase 1.

7.4.1.5. Monitoreo y muestreo de gas producido

Se registró el gas producido por ambos reactores por medio de $\mu Flow$ (Bioprocess Control, Lund, Suecia). Asimismo, se obtuvieron muestras del gas presente en el espacio de cabeza de ambos reactores para medir cada día la composición gaseosa. Este proceso se realizó con una frecuencia diaria a partir del inicio de la fase 2.

7.4.2. Métodos analíticos

7.4.2.1. Caracterización fisicoquímica del influente

Para la caracterización fisicoquímica de las vinazas tequileras sin cocción empleadas como sustrato para el sistema se emplearon los mismos métodos que se señalaron en la Tabla 6, sección 7.1.2.1.

7.4.2.2. Composición gaseosa

Se evaluó la calidad del gas generado por el sistema inyectando 100 μL del gas presente en el espacio de cabeza de ambos reactores en un cromatógrafo de gas Clarus 580 Perkin Elmer acoplado a un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna empacada de 10' x 1/8" SS HayeSep D 100/120. Las características del método se muestran en la Tabla 10. Este proceso tuvo como mínimo una réplica para aminorar el error estándar. Se generaron reportes de abundancias diariamente.

Tabla 10. Características del método de medición de gases.

Parámetro	Valor
Temperatura del horno ($^{\circ}\text{C}$)	40
Temperatura del inyector ($^{\circ}\text{C}$)	75
Temperatura del detector ($^{\circ}\text{C}$)	110
Gas acarreador	N_2
Flujo de gas acarreador (mL min^{-1})	30

7.4.2.3. Caracterización fisicoquímica de muestras líquidas

Se evaluó la remoción de DQO mediante la diferencia de la carga orgánica medida y la alimentada después de la primera etapa (AMBBR) y global (AMBBR-UASB). Se determinó mediante el método 10212 de HACH. La eficiencia global fue el resultado de la diferencia entre la concentración de DQO medida a la salida del sistema y la alimentada.

7.5. Extracción de ADN

A las muestras biológicas obtenidas de acuerdo con el apartado 7.4.1.4 se les realizaron 3 lavados con SS como fue mencionado para las muestras del reactor en lote, previo a extracción. En el caso de las muestras tipo V, se realizaron lavados adicionales (alrededor de 5). En el caso de las muestras tipo C, los soportes se resuspendieron en SS y luego se desprendió la biomasa con ayuda de vórtex (Kobayashi *et al.*, 2009) por 10 s. Los soportes se retiraron asépticamente y el líquido se centrifugó, luego, el sedimento se lavó con SS.

Asimismo, para cada tipo de muestra se estandarizó el tiempo de lisis celular de la misma manera que en la sección 7.2.1. En resumen, se corrió AGE de la muestra a varios tiempos de lisis en vórtex. Se determinó que para todas las muestras es óptimo lisar las células por 3 min, excepto para las muestras tipo L, cuyo tiempo óptimo fueron 4 min. Los electrogramas se muestran en el anexo A.

Se verificó la calidad de ADN de la misma manera que se detalló en 7.2.3. Brevemente, se corrió AGE en condiciones estándar para comprobar integridad, se cuantificó espectrofotométricamente y se verificó pureza. Los electrogramas se muestran en el anexo C.

7.6. Secuenciación y análisis metagenómico

Con el fin de conocer las poblaciones de microorganismos presentes en las muestras y poder relacionarlas con el desempeño del sistema AMMBR-UASB, se enviaron a servicio de secuenciación (Tabla 11).

Tabla 11. Muestras del sistema AMBBR-UASB enviadas a secuenciar.

Fase	B (sedimento del AMBBR)	C (soportes del AMBBR)	L (LAG del UASB)
1	B1	C1	L1
	B2		L2
	B3		L3
	B4		L4
	B5		L5
	B6		L6
2	B7	C2	L7
	B8		L8
	B9		L9
	B10		L10
3	B11	C3	L11
	B12		L12
	B13		L13
	B14		L14
4	B15	C4	L15
	B16		L16
	B17		L17
	B18		L18
5	B19	C5	L19
	B20		L20
	B21		L21
	B22		L22
6	B23	N/A	L23

Cabe destacar que ninguno de los extractos de ADN obtenidos a partir de muestras de vinaza logró superar los parámetros de calidad. Fue imposible confirmar integridad, por lo que se decidió no enviar ninguna muestra de este tipo a secuenciación.

En el anexo **Error! Reference source not found.** se encuentra un compendio de las muestras señalando el día de su muestreo.

Los extractos fueron enviados a la empresa Novogene (Novogene Corporation, USA) para secuenciación de la región V3-4 del gen *ADNr 16S* de *Bacteria* y *Archaea* (Qin *et al.*, 2020), empleando la plataforma Illumina Miseq PE 2x250 bp mediante los cebadores 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') y 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') teniendo un tamaño de *contig* esperado de alrededor de 460 bp. Se solicitó un mínimo de 100,000 hits por muestra (Campanaro *et al.*, 2018).

Las secuencias recibidas fueron sometidas al mismo proceso que en la sección 7.3.2. En resumen, se sometieron a análisis de calidad y depuración (teniendo en cuenta el tamaño de amplicón de alrededor de 250 bp), empleando el script *flash* para formar *contigs*, *vsearch derep_fulllength* para desreplicar, *uchime_denovo* para eliminar quimeras, *singletons_filter.pl* para remover secuencias únicas (*singletons*) para posteriormente agrupar OTUs a un nivel de similitud del 97%, luego se contrastaron contra la base de datos SILVA versión 138 (2019, Yilmaz *et al.*, 2014).

La matriz de OTU se procesó de la misma forma que en el apartado 7.3.3. Las abundancias relativas de cada OTU fueron graficadas en MATLAB® versión 2018a a los niveles taxonómicos de filo y género. Esto para identificar los taxones más abundantes e indagar sobre la relación entre sus abundancias y el desempeño del sistema.

VIII. Resultados y discusión

8.1. Aprovechamiento de vinazas tequileras en lote y composición poblacional de los microorganismos presentes

8.1.1. Características fisicoquímicas del sustrato

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la caracterización de la vinaza empleada.

Tabla 12. Caracterización fisicoquímica de vinazas tequileras con cocción empleadas en los experimentos en lote.

Parámetro	Concentración
DQO (g·L⁻¹ DQO)	33.35 ± 1.22
Carbono Orgánico Total (g·L⁻¹)	20.41 ± 0.13
pH	3.63 ± 0.07
Fenoles totales (g·L⁻¹)	0.07 ± 0.018
Fósforo total (g·L⁻¹)	0.23 ± 0.02
Nitrógeno total (g·L⁻¹)	0.135 ± 0.022
Nitritos (mg·L⁻¹)	0.055 ± 0.0004
Nitratos (g·L⁻¹)	0.136 ± 0.003
Azúcares totales (g·L⁻¹)	11.69 ± 0.39
Sólidos totales (g·L⁻¹)	32.22 ± 0.98
Sólidos totales volátiles (g·L⁻¹)	28.73 ± 0.97
Nitrógeno amoniacal (mg·L⁻¹)	< 2 (debajo de rango medible)

Estos resultados son comparables a los obtenidos por García-Becerra *et al.* en 2019, respecto a las características fisicoquímicas de vinaza cruda y detoxificada, aunque la cantidad de fenoles totales en nuestro caso fue mucho menor. Por otro lado, en comparación a los obtenidos por López-López *et al.* en 2010, la carga orgánica es mucho menor. Esto puede explicarse por la heterogeneidad entre procesos, ya que

esto afecta directamente las características del efluente de la industria tequilera (Rivera-Tostado, 2018).

8.1.2. Calidad de ADN de las muestras extraídas

Se extrajo ADN de las muestras de la Tabla 7 como fue descrito en la metodología. En general, el ADN presente en las muestras mostró integridad aceptable, excepto por aquellas extraídas de inóculo seco (a0, c0). Esto puede deberse al propio tratamiento térmico y el efecto que tiene sobre el ADN, a pesar de que el bacteriano podría ser más resistente a tratamiento por calor seco (Tung *et al.*, 2012). Sin embargo, el método de lisis empleado (disrupción mecánica con perlas) se considera el más adecuado para la extracción de ADN de esporas bacterianas (Knüpfer *et al.*, 2020). En cuanto a concentración, se obtuvo un promedio de $89.85 \pm 41.90 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y de pureza medida como la relación 260/280 se obtuvo un valor de 1.64 ± 0.09 . De acuerdo con autores (Philippe *et al.*, 2010), las soluciones acídicas pueden subestimar la pureza por 0.2 – 0.3. Es posible que, en nuestro caso, al tratarse de muestras de origen ácido, algún remanente haya interferido con el valor medido. Asimismo, se utilizó un kit relativamente viejo, por lo que la vigencia de este pudo haber interferido en la calidad de los extractos. Debido a este acontecimiento, se solicitaron kits completamente nuevos y la calidad del ADN presente en los extractos de muestras posteriores mejoró. A pesar de la calidad de los extractos obtenidos a partir de las muestras, se optó por enviarlas a servicio de secuenciación.

8.1.3. Composición microbiana presente en el reactor

Al procesar las secuencias, se encontró que en promedio más del 97% de estas solaparon correctamente mediante el script *flash*. Al desreplicarlas con *vsearch*, se encontraron en promedio alrededor de 52,000 secuencias únicas por muestra. Utilizando el comando *uchime_denovo* se encontraron un promedio de alrededor de 30% secuencias quiméricas del total de secuencias únicas. Filtrando los singletons del resto de las secuencias mediante el programa *singletons_filter.pl*, se encontró que el

6.7% de estas correspondían a secuencias únicas. Finalmente, el número de OTUs con el que se trabajó fue de 260. A pesar de la baja integridad de a0 y c0, su secuenciación fue posible.

En la Figura 5 se observa, a nivel de dominio, que *Bacteria* domina en abundancia a *Archaea* en todas las muestras, ya que su abundancia relativa es mayor del 99%. Esto indica que el método de secuenciación fue dirigido principalmente a este dominio y que los cebadores utilizados aparean poco con arqueas.

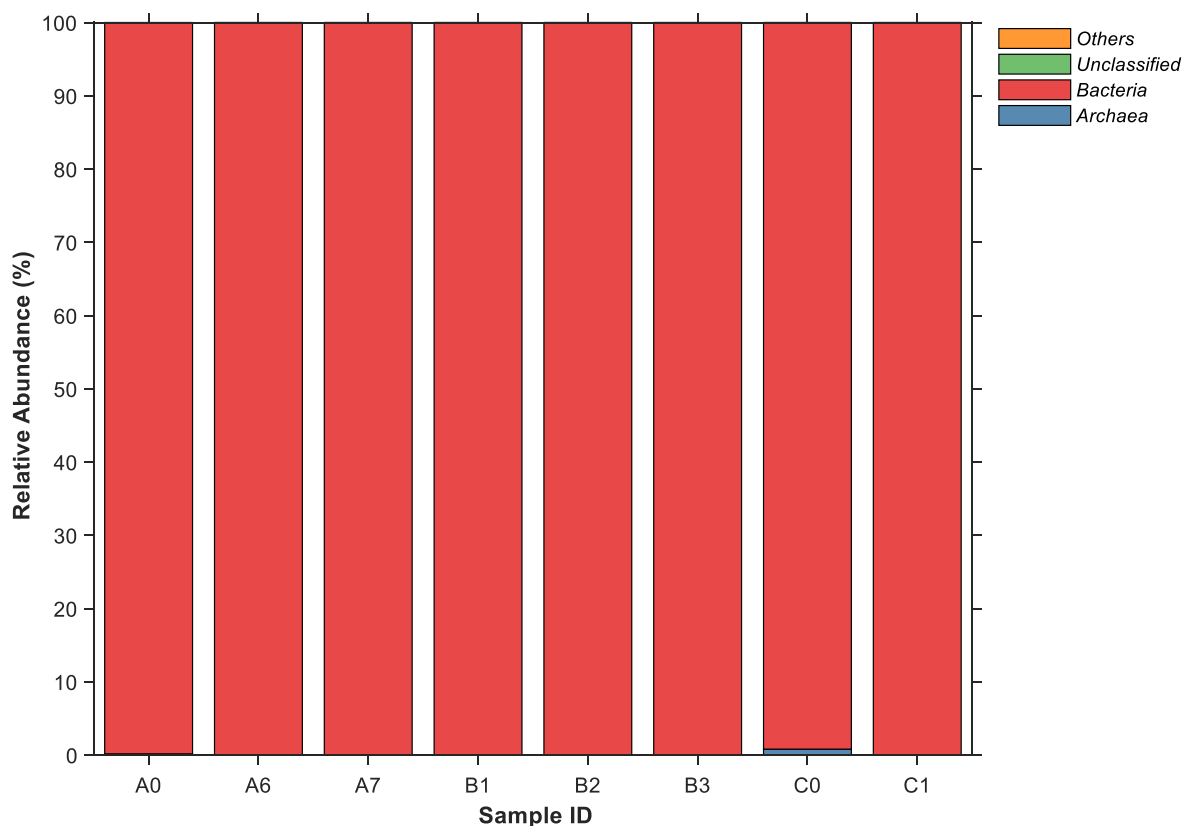


Figura 5. Abundancia relativa de OTUs identificados en el reactor en lote a nivel dominio.

En la Figura 6 se muestra a nivel filo que, en el caso de las corridas A y C, mayormente predominaron *Firmicutes* (69-92.7%). En el caso B, el más abundante es *Proteobacteria* (47.4-68.4%) seguido por *Firmicutes*. Sin embargo, la fermentación tiende a albergar una mayor cantidad de este último taxón. Se distingue que desde el

inóculo (a0, c0), la abundancia relativa de *Firmicutes* es superior a las demás (más del 85%). En contraste, a lo largo del proceso fermentativo varía la abundancia de *Proteobacteria* en todos los casos. Presenta una tendencia a proliferar en las primeras horas, pero luego a disminuir su abundancia conforme progresa el tiempo. Existe presencia de otros taxones mucho menos abundantes tales como *Chloroflexi*, presente en el inóculo tipo 2, el cual no se detectó en el proceso fermentativo (c1).

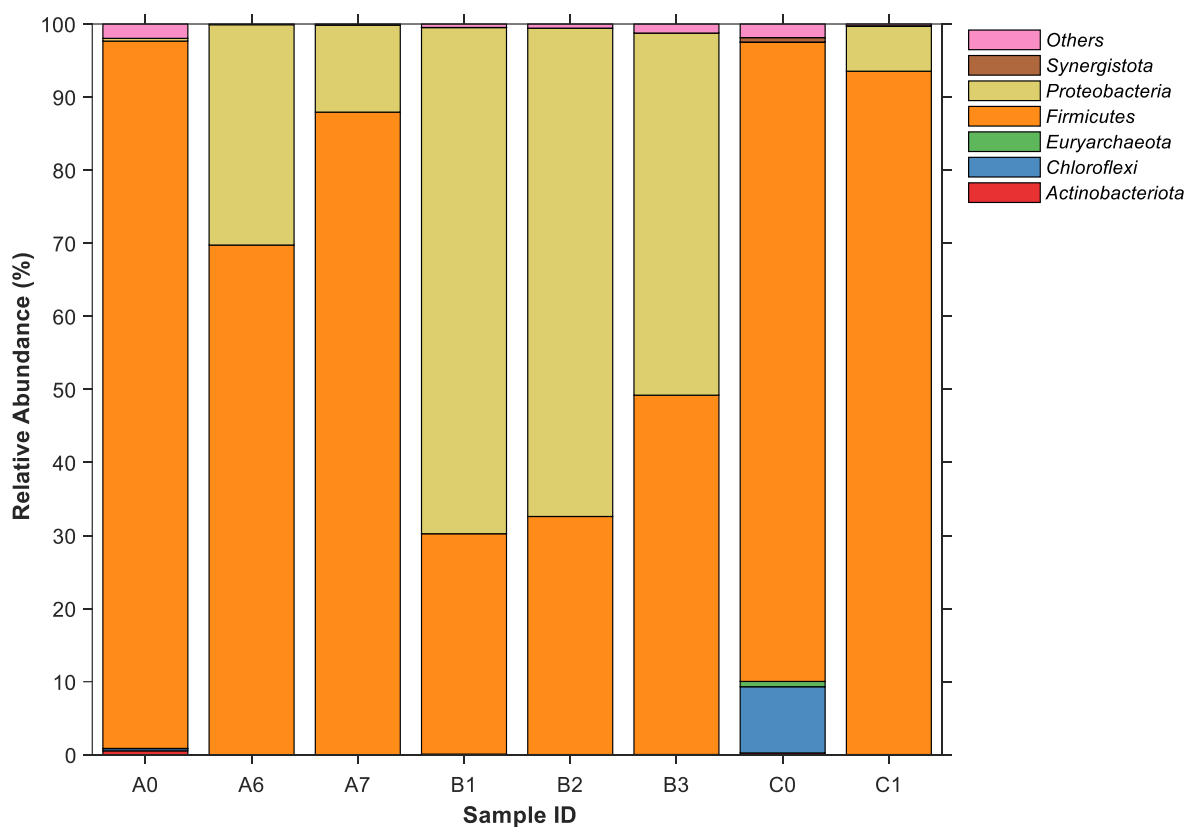


Figura 6. Abundancia relativa de OTUs identificados en el reactor en lote a nivel de filo. Se realizó un corte al 0.2%.

En la Figura 7 se observan los géneros de bacterias con mayor abundancia en las muestras. Se distingue que en las muestras a6, a7 y c1 se encuentra con gran abundancia *Clostridium* (69.3-87.1%), género caracterizado por ser mayormente anaerobio, formador de endosporas y presente en el tracto gastrointestinal de mamíferos. Algunas de sus especies son capaces de excretar enzimas degradadoras

de polisacáridos, lo que sería útil en el proceso de aprovechamiento de bagazo u otros desechos lignocelulósicos, así como también para la producción de hidrógeno (Kim *et al.*, 2019).

En el caso de las muestras b1, b2 y b3 se puede distinguir que el taxón más abundante es *Klebsiella* (42.6-66.1%), género característico por ser anaerobio facultativo, ubicuo en la naturaleza, pero también presente en el tracto gastrointestinal (Bagley, 1985) cuyas condiciones óptimas de desarrollo son similares a las condiciones de operación iniciales ya descritas. Su abundancia disminuye y esto puede ser atribuido a la acidificación del medio, ya que a pH menor de 6 su proliferación desacelera (Xiao *et al.*, 2013). Dado que forma parte mayoritaria del filo *Proteobacteria* (91-97%), no sorprende que su abundancia haya decaído (Fig. 6). Conforme avanzó el tiempo, la uniformidad bacteriana se incrementó (más notorio en b1-b2-b3), aumento de la abundancia relativa de *Otros*, lo que indica el desarrollo de otros taxones que inicialmente eran menos abundantes pero que las nuevas condiciones (el pH del medio, la presencia de ácidos, la disminución de nutrientes conforme avanza la fermentación) lo propician. Asimismo, la mayoría de las bacterias presentes son capaces de producir ácidos grasos volátiles, intermediarios que normalmente se emplearían para la producción de CH₄.

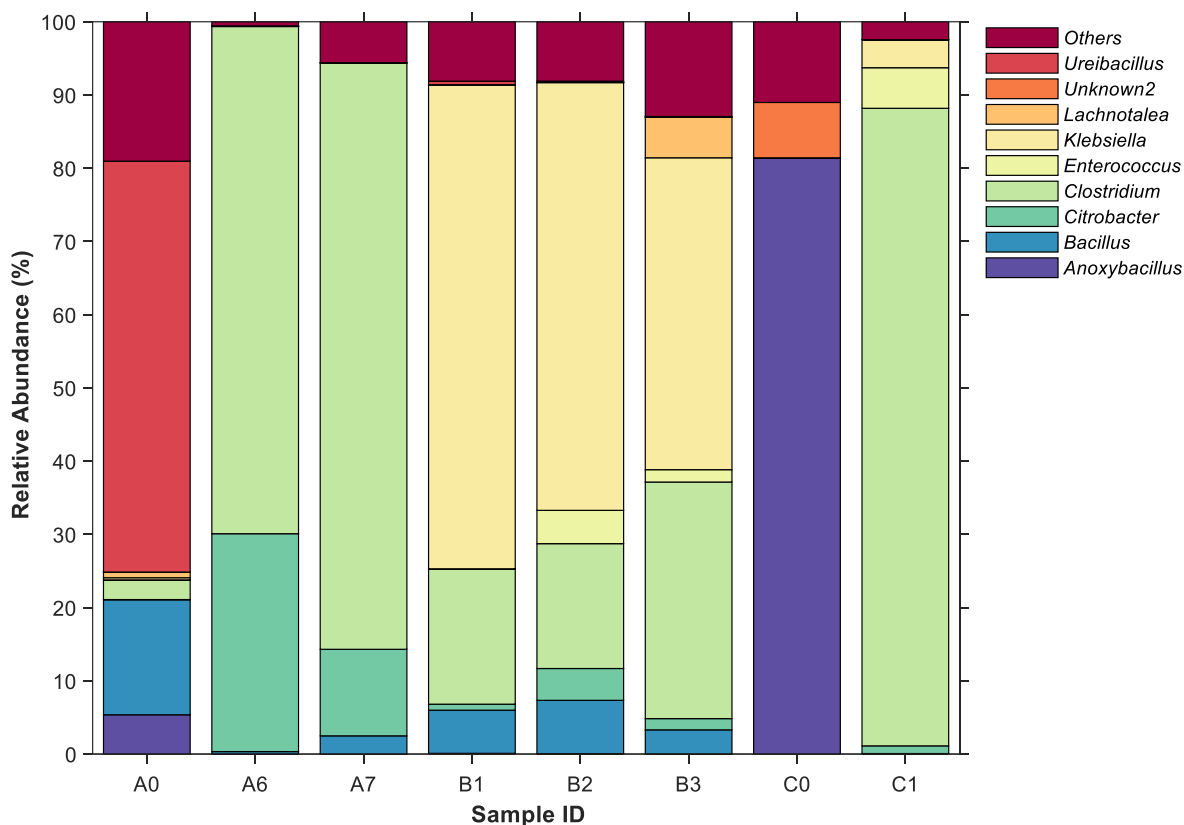


Figura 7. Abundancia relativa de OTUs identificados en el reactor en lote a nivel de género. Se realizó un corte al 3.0%.

En el inóculo, se aprecia la abundancia de *Ureibacillus* y de *Anoxybacillus*; esto puede ser debido a su capacidad esporulante (Fortina *et al.*, 2001; Goh *et al.*, 2014). La presencia de *Klebsiella*, un género no esporulante, a pesar del pretratamiento térmico al inóculo, se puede atribuir a su resistencia a choques térmicos (Jørgensen *et al.*, 2016). Además, este género se ha reportado en otros sistemas biológicos productores de H₂ en lote asociado a *Clostridium* en donde emplean similares condiciones (Maintinguer *et al.*, 2011)

Así pues, se distingue la prevalencia de *Clostridium* y/o de *Klebsiella* en los experimentos, independientemente del origen del inóculo o de la adición de nutrientes exógenos a la alimentación. Estas bacterias son seleccionadas gracias a su

resistencia a choques térmicos y a condiciones de crecimiento similares a las empleadas en el experimento, como ha sido previamente discutido.

En los apartados a continuación se evalúa la predominancia de los microorganismos presentes y su posible efecto en el desempeño de un sistema en continuo seriado.

8.2. Rendimiento del sistema en serie AMBBR-UASB

8.2.1. Características fisicoquímicas del sustrato

En la Tabla 13 se observan las características principales de la vinaza sin cocción que se utilizó para alimentar el sistema. La mayor varianza de los datos, a comparación de la Tabla 12, se debe a las disparidades entre lotes muestreados (dos vinazas sin cocción y una vinaza con cocción) ya que las vinazas en general suelen presentar características relativamente heterogéneas. Sin embargo, y a pesar de esto, se destacan las características principales similares (bajo pH, alta carga orgánica, concentración de azúcares elevada y alta concentración de fenoles totales (López-López *et al.*, 2010).

Tabla 13. Características fisicoquímicas de vinazas tequileras sin cocción empleadas para el sistema en serie.

Parámetro	Concentración
DQO (g·L ⁻¹ DQO)	35.45 ± 5.07
Carbono Orgánico Total (g·L ⁻¹)	12.50 ± 2.87
pH	3.51 ± 0.32
Fenoles totales (g·L ⁻¹)	0.14 ± 0.04
Fósforo total (g·L ⁻¹)	1.17 ± 0.43
Nitrógeno total (g·L ⁻¹)	0.11 ± 0.03
Nitritos (mg·L ⁻¹)	0.99 ± 0.25
Nitratos (g·L ⁻¹)	0.09 ± 0.02
Azúcares totales (g·L ⁻¹)	8.25 ± 2.01

Sólidos totales (g·L⁻¹)	23.50 ± 4.23
Sólidos totales volátiles (g·L⁻¹)	21.64 ± 4.48
Nitrógeno amoniacal (mg·L⁻¹)	< 2 (debajo de rango medible)

8.2.2. Desempeño del AMBBR

8.2.2.1. Producción de gas

En la Figura 8, se señala la productividad del AMBBR en cuanto a gas producido. A altas cargas orgánicas (fase 6, COV 174.63 g DQO L⁻¹ d⁻¹) no se inhibió por completo la producción de gas, aunque sí se vio afectada negativamente de manera notoria (llegando a un mínimo de 0.17 NL Lr⁻¹ d⁻¹). El mayor valor de productividad (3.7 NL Lr⁻¹ d⁻¹) se obtuvo en la 2^o fase. Sin embargo, al aumentar la carga de 81.81 a 109.09 g DQO L⁻¹ d⁻¹, la producción decayó y en el resto de las fases se mantuvo relativamente inestable, disminuyendo a finales de la 4 y luego aumentando a finales de la 5.

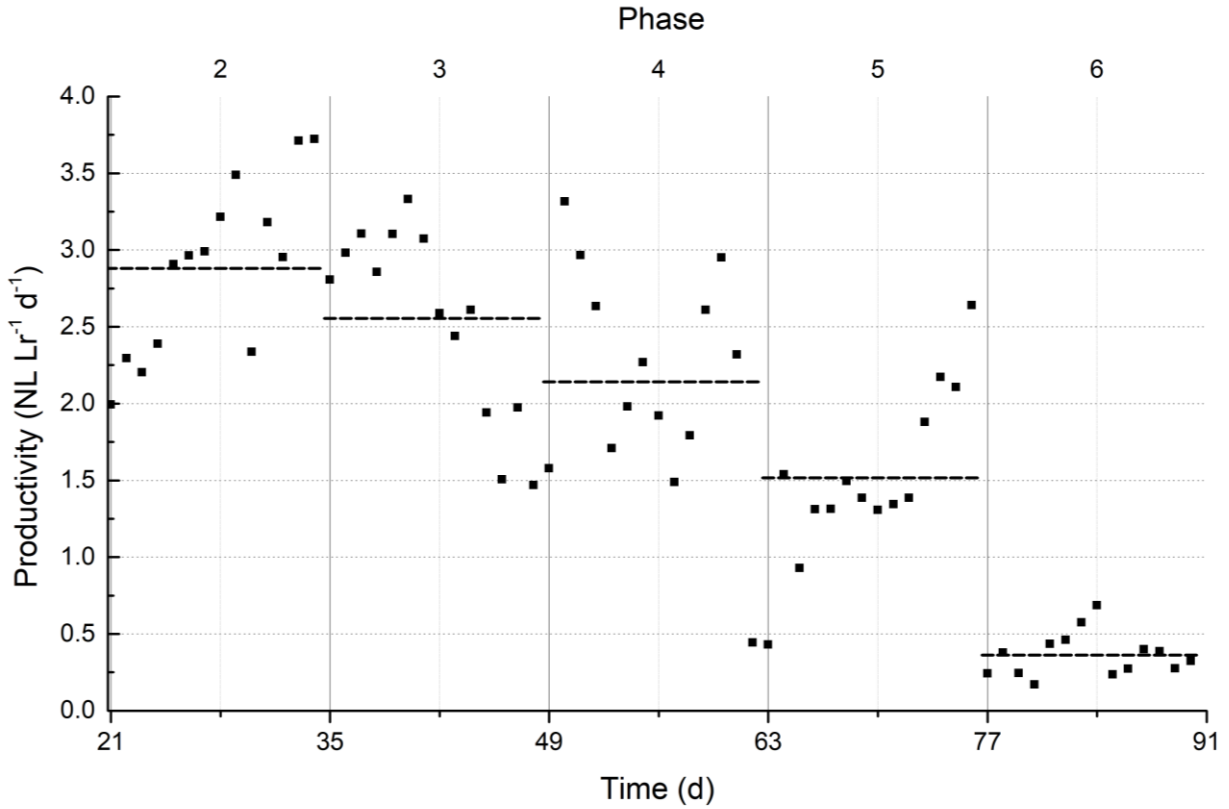


Figura 8. Productividad gaseosa del AMBBR.

En la Figura 9 se observa la calidad del gas obtenido por el reactor. Se distingue que la calidad fue relativamente homogénea a lo largo de las fases. Se consiguió producir $85.29 \pm 2.72\%$ de H_2 en composición. No se muestra el CH_4 , así como el resto de los gases ya que su abundancia acumulada fue virtualmente despreciable ($0.7 \pm 1.1\%$). Se destaca la estabilidad de la composición de gas a través del tiempo, indicando posible independencia sobre la carga orgánica aplicada.

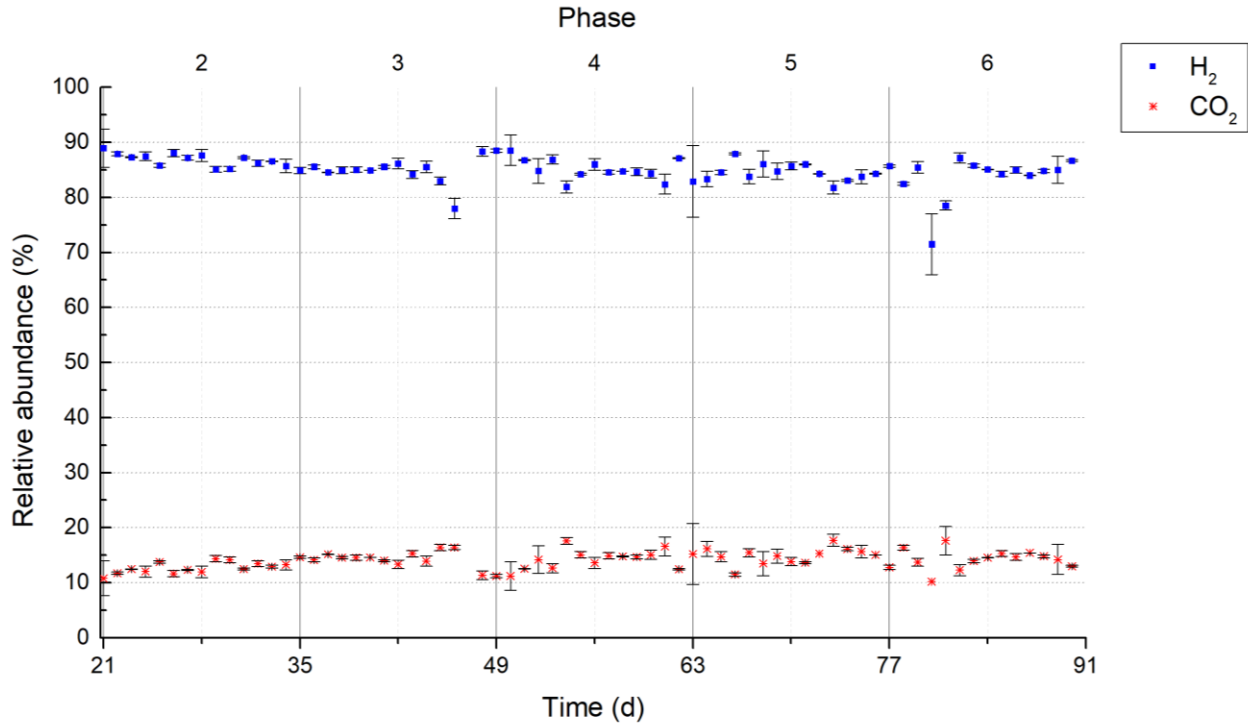


Figura 9. Composición de los gases en el espacio de cabeza del AMBBR.

En otro trabajo, Toledo-Cervantes *et al.* en el 2020 evaluaron el desempeño de dos AnSBR, uno en mesofilia (37° C) y otro en termofilia (55 °C), a concentraciones menores (20 g DQO L⁻¹ d⁻¹) pero a un pH similar (5.5) con vinazas tequileras crudas. En contraste con el presente trabajo, la calidad del biogas obtenido por ellos contenía mayor concentración de H₂ en el reactor termófilo al llegar a fase estacionaria, con respecto al producido por el mesófilo (86% y 42%, respectivamente). De la misma manera, Buitrón *et al.* en 2014, reportaron un porcentaje de hasta 64% en un AFBR trabajando en mesofilia, alimentado por el mismo sustrato, sin adición extra de nutrientes y a una carga similar (21 g DQO L⁻¹ d⁻¹) pero con un pH distinto (4.7). De Amorim *et al.*, en 2012, obtuvieron valores mayores conforme disminuían el TRH en su experimento. Detectaron muy poca variación al evaluar con una alimentación de 4 g DQO L⁻¹, independientemente de la carga orgánica, con una abundancia relativa de H₂ de 50-60%. Este rango equivale a una COV estudiada de 12 a 96 g DQO L⁻¹ d⁻¹. Reportaron la ausencia de metano en la mezcla gaseosa, por lo que se asume que la gran mayoría del resto del gas estaba compuesto de CO₂.

Finalmente, en la Figura 10 se muestra la productividad de hidrógeno considerando la abundancia de este gas en el reactor. Las líneas indican el promedio de cada fase. Dado a que la composición de H_2 permaneció relativamente estable, el comportamiento de productividad observado es muy similar al de la Figura 8. El valor más alto obtenido fue de $3.21 \text{ NLH}_2 \text{ Lr}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en la fase 2, mientras que el más bajo fue de $0.12 \text{ NLH}_2 \text{ Lr}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en la fase 6.

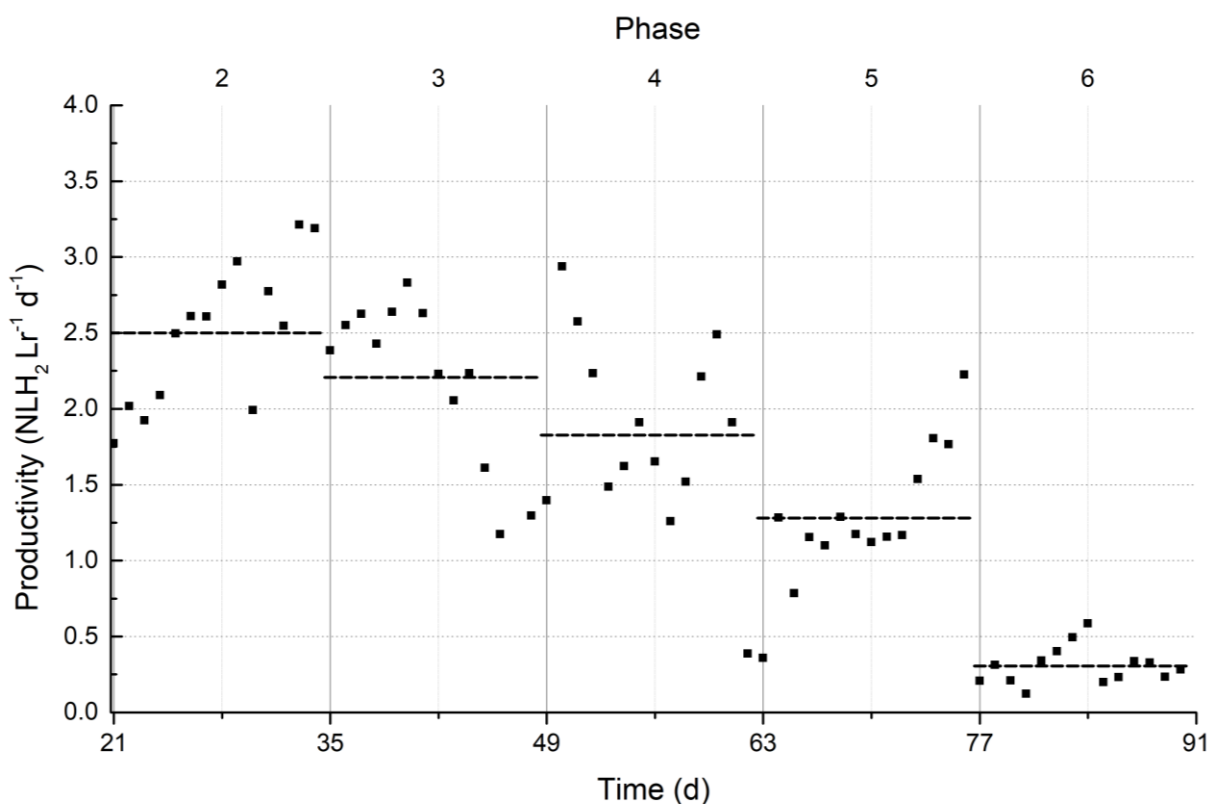


Figura 10. Productividad de hidrógeno del AMBBR.

Los resultados son comparables con otros trabajos en México donde generan energía empleando biorreactores. En 2017, Cisneros-Pérez *et al.* evaluaron el desempeño de un AFBR (reactor de lecho fluidizado anaerobio, con biopelícula) a varios TRH (10-1 h) y COV ($24\text{-}60 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) empleando glucosa como sustrato (suplementada con nutrientes) e inóculo pretratado. Sus condiciones de operación fueron mesofílicas ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) a pH ácido (5.5). A TRH de 4 h y carga orgánica máxima estudiada (la condición

más cercana a la fase 2 del presente trabajo), su máximo de productividad fue de $3.4 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, aunque su promedio fue de $2.4 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. En su estudio, determinaron la mayor productividad a TRH 6 h y a la mayor carga orgánica estudiada. Este trabajo previo contrasta con otro reporte en 2012 por De Amorim *et al.*, en donde, empleando el mismo tipo de reactor (AFBR), mismo sustrato (también adicionado con nutrientes), y misma temperatura y pH, lograron la mejor productividad ($1.5 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) al más bajo valor de TRH estudiado (1 h) y a una COV de $264 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Sin embargo, comparando al TRH (4.23 h) y COV empleado en el presente trabajo (entre fase 4 y 5; $136\text{-}163 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), la productividad obtenida por ellos es menor ($0.6 \text{ LH}_2 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). A pesar de esto, los autores reportan prácticamente esa misma productividad a cargas mucho más altas ($672 \text{ g DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a TRH de 1h).

8.2.2.2. Remoción de carga orgánica

A continuación, en la Figura 11, se observa la eficiencia de remoción de carga orgánica por el reactor. La mayor y más estable eficiencia de remoción ($26.03 \pm 2.24\%$) se consiguió en la fase 5, mientras que, en el resto de las fases, en promedio, fue de 8.31% .

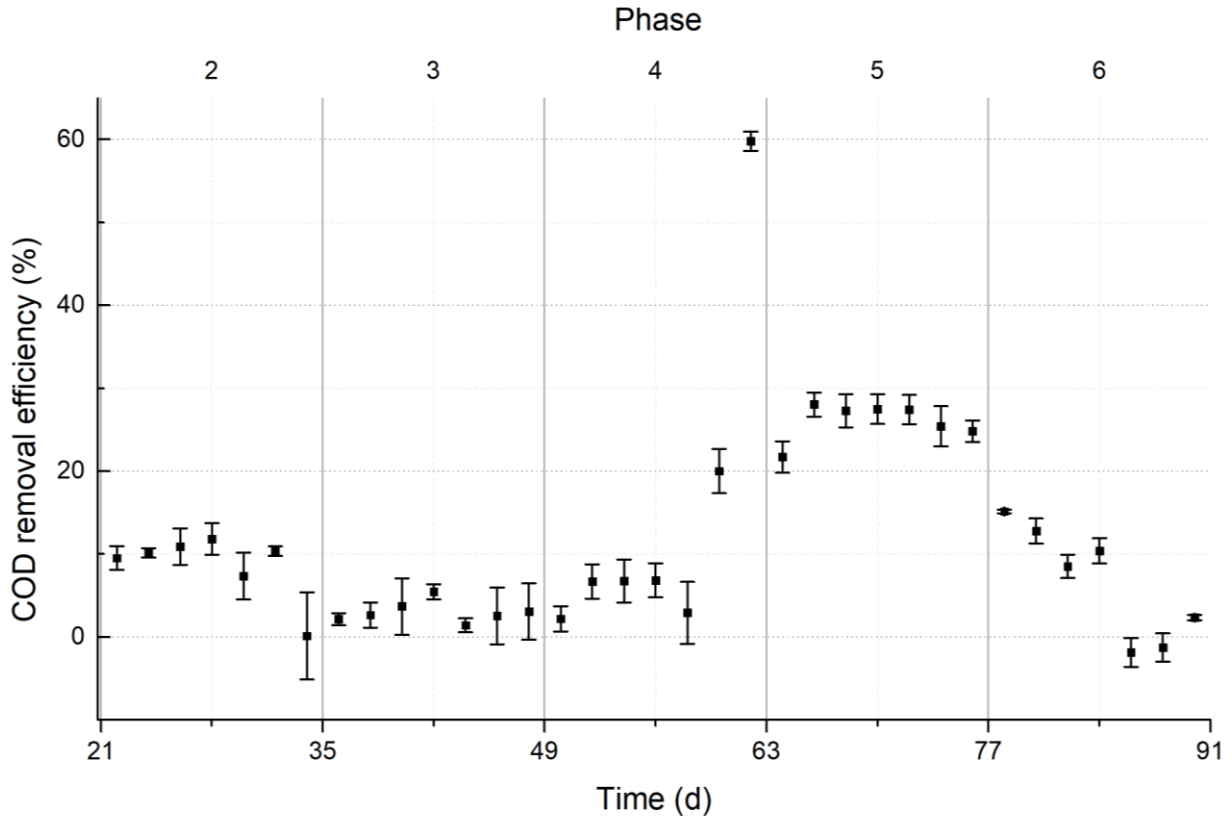


Figura 11. Eficiencia de remoción de de carga orgánica del AMBBR.

La baja remoción se puede deber a elementos que contribuyen a la DQO de manera significativa, por ejemplo, sustrato residual, AGVs, biomasa, H₂ disuelto, entre otros, la cual es comparable a previos trabajos (De Amorim *et al.*, 2012). Por otro lado, en cuanto a la producción de hidrógeno, significa que en las fases en las que hubo menor remoción de DQO, existió una óptima producción de gas por gramo de DQO removido del sistema, es decir, se tiene un mejor rendimiento gaseoso.

8.2.3. Desempeño del UASB

8.2.3.1. Producción de gas

En general, se detectaron altas variaciones en la productividad gaseosa, así como en la calidad. Cabe destacar que en el intermedio del experimento se presentaron problemas técnicos de diversa índole. Hubo un rearranque el día 71 del reactor UASB. En la Figura 12, se observa la productividad del UASB en cuanto a gas producido. Las líneas son el promedio de cada fase. La producción más estable de gas ($0.34 \text{ NL Lr}^{-1} \text{ d}^{-1}$) se obtuvo entre las fases 2 y 3. Se puede apreciar una alta variabilidad en las productividades obtenidas a partir de un decaimiento en la producción de la fase 3.

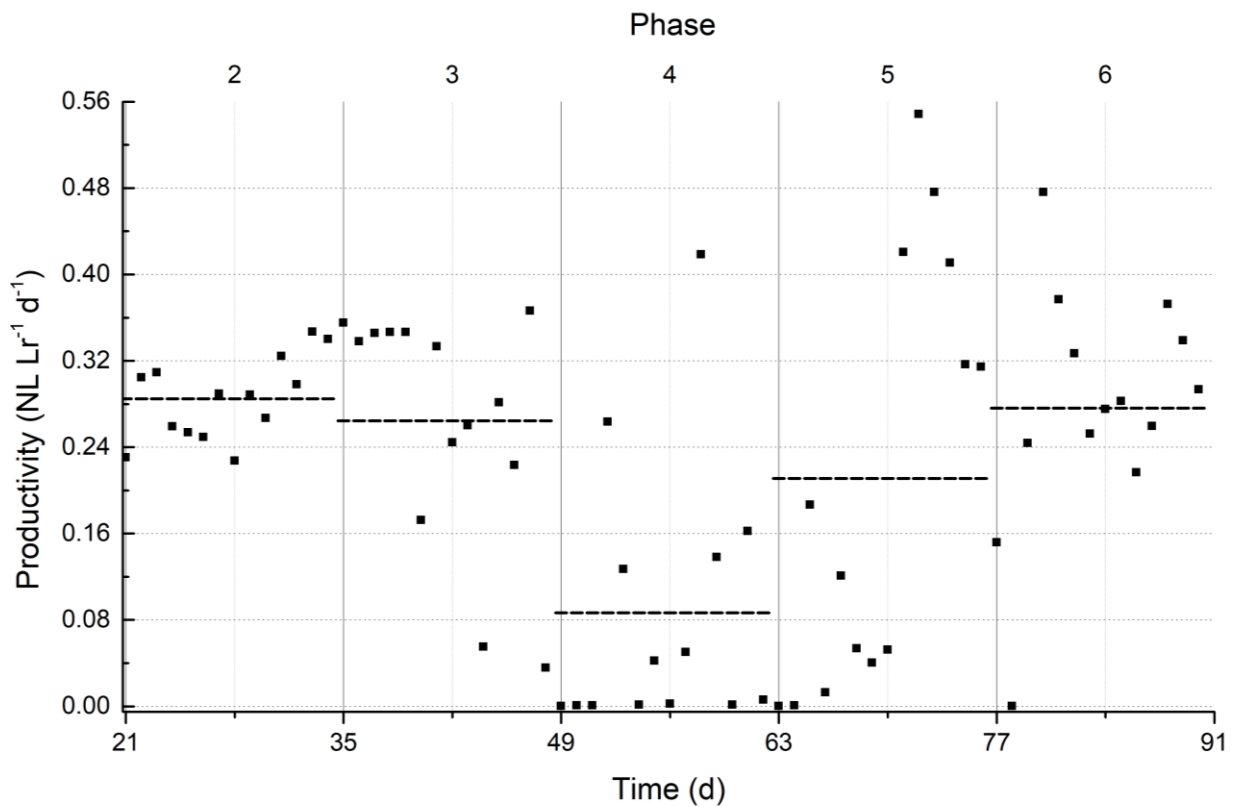


Figura 12. Productividad gaseosa del UASB.

Yun *et al.* en 2016 encontraron que, en un UASB tratando agua residual de melazas con una COV desde 3.6 hasta 9.7 g DQO L⁻¹ d⁻¹, el sistema presentó un máximo de producción de biogás de 1.85 L Lr⁻¹ d⁻¹ a una carga de 5.5 g DQO L⁻¹ d⁻¹, y decayó a partir de este punto. Dado que la carga orgánica influente al UASB desde la fase 2 es

mayor al valor al que ellos determinaron como óptima, es posible que a partir de este punto el sistema haya padecido de sobrecarga orgánica.

En la Figura 13, se muestra la calidad del gas obtenida por el UASB. En la fase 2 se observa el valor de mayor abundancia relativa de CH_4 (53.93%), el cual decae a partir de inicios de la fase 3 de manera concomitante con el aumento de H_2 . Esto pudo haber sido porque el sistema no contaba con sedimentación de biomasa, lo que hizo que los microorganismos pasaran libremente de la 1^o a la 2^o etapa del sistema (del AMBBR al UASB) y así producir más de este gas. El porcentaje más bajo de CH_4 (4.89%) se observa con vinaza sin dilución (fase 6). El aumento de H_2 se dio a la par que la disminución de producción gaseosa, por lo que es posible que los microorganismos del AMBBR desestabilizaran las comunidades ya presentes en el LAG del UASB, afectando la producción y el sistema. De la misma manera, la variación de pH en el UASB podría haber impactado de forma significativa en la producción de CH_4 . Pese a la ineficiencia del sistema para generar CH_4 , produjo, H_2 con una abundancia relativamente alta (81% en el punto más alto, en la fase 4) a partir de mediados de la fase 3. Esto, a pesar de que en la fase 2 se encontró por debajo del 30%, y llegó a valores tan bajos como 13%.

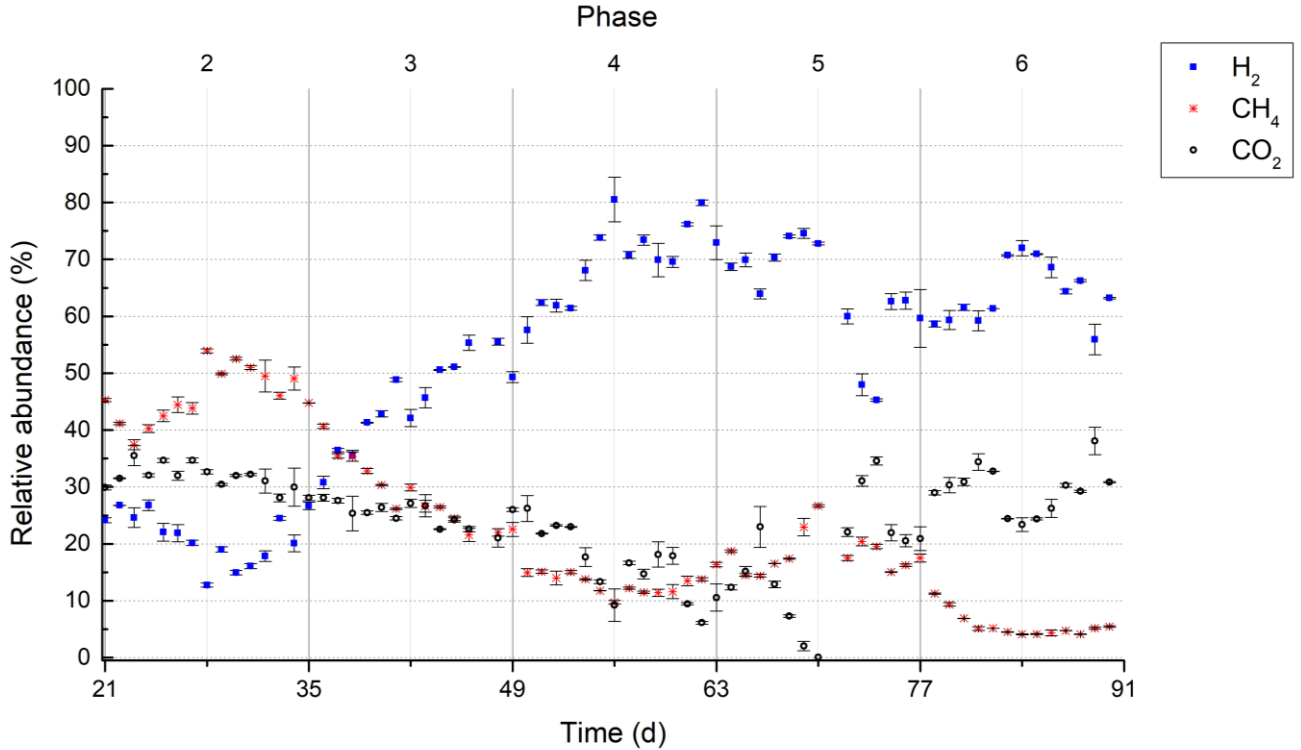


Figura 13. Composición de los gases en el espacio de cabeza del UASB.

Yun *et al.* detectaron nula presencia de H₂. Asimismo, la composición gaseosa del espacio de cabeza de su reactor presentó, en general, más de 60% de CH₄ en todas las fases, en un promedio de 70%, mientras que el CO₂ permaneció en promedio alrededor del 30%. En contraste con el presente trabajo, la abundancia relativa de este último gas fue comparable, ya que en promedio fue de $25 \pm 8\%$.

La productividad de CH₄ y de H₂, tomando en cuenta la productividad total y la composición gaseosa, se puede observar en la Figura 14. Las líneas son el promedio de cada fase. El valor más alto de metano, $0.17 \text{ NLCH}_4 \text{ Lr}^{-1} \text{ d}^{-1}$, se obtuvo en la fase 2, mientras que el más alto de hidrógeno, $0.33 \text{ NLH}_2 \text{ Lr}^{-1} \text{ d}^{-1}$, en la fase 5. Los valores más bajos coinciden con los puntos de inestabilidad del sistema.

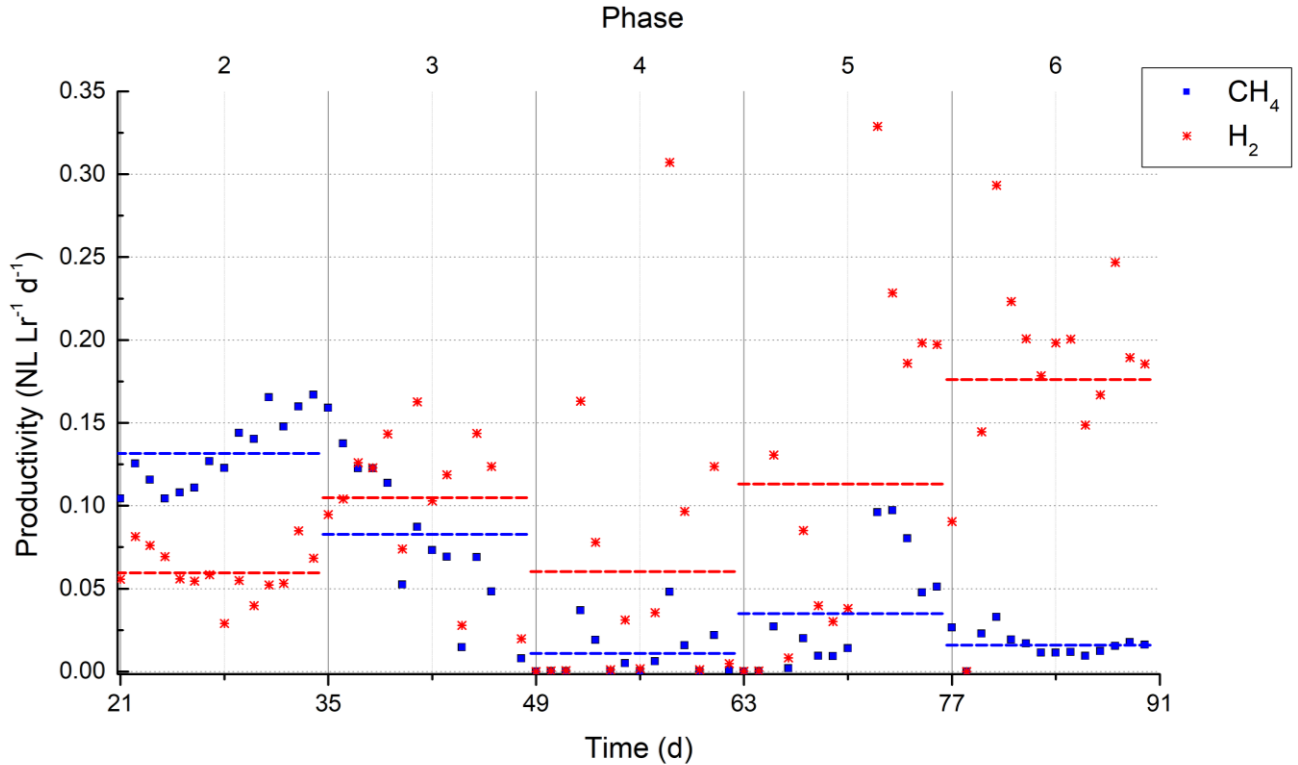


Figura 14. Productividad de metano e hidrógeno del UASB.

En general, desde que se restableció el sistema en la fase 5, el sistema tuvo su mejor productividad de H₂. Asimismo, no fue posible revertir la desestabilización a pesar del remontaje del reactor. Una posible explicación para esto es el hecho de que, se recicló el inóculo (es decir, se reinoculó con el mismo lodo) al volverlo a montar, reflejado en los apartados siguientes que tratan acerca de la composición microbiana del sistema.

8.2.4. Desempeño global

8.2.4.1. Remoción de carga orgánica global

La eficiencia de remoción de DQO se observa en la Figura 15. Se distingue que, en general, al final de cada fase el sistema tiende a una remoción de alrededor de 13% excepto en la penúltima fase, en donde se tuvo un porcentaje de $46.74 \pm 16.96\%$. Ya que la eficiencia fue medida como la diferencia entre la concentración de DQO en el

efluente y en la alimentación, los primeros puntos después de cada cambio de fase presentan un porcentaje más alto. De esta manera, la concentración de carga en el efluente después de cada cambio de fase es probablemente una mezcla entre la carga anterior y la actual. Esto se debe a que aún no se llega completamente a una fase estacionaria del sistema, ya que el TRH > 2 d. Es evidente el estado estacionario sobre todo al final de las fases 2-4, en donde la remoción de DQO es muy similar entre los últimos 4 puntos medidos. La fase con la mejor efectividad coincide con la fase de remoción más alta de DQO en el AMBBR.

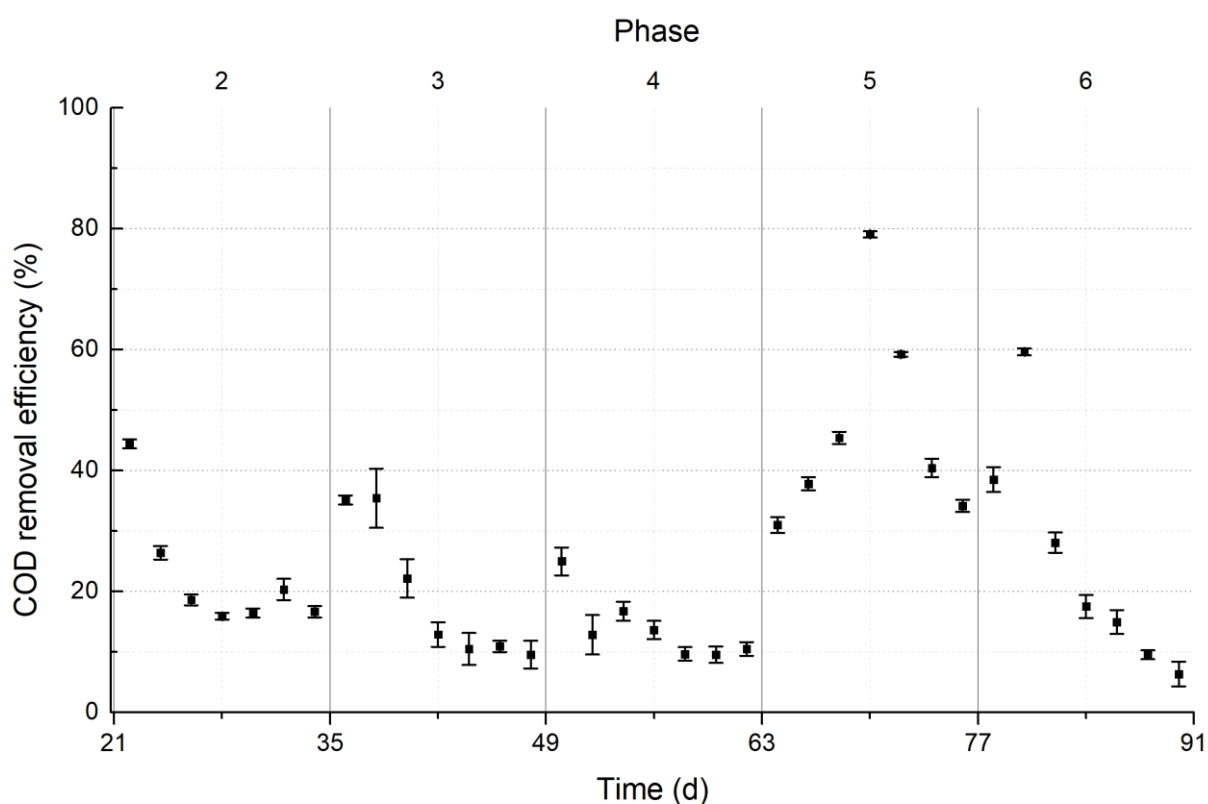


Figura 15. Eficiencia de remoción de carga orgánica del sistema AMBBR-UASB.

8.3. Estructura de las comunidades de microorganismos presentes en el sistema

En su totalidad, se obtuvo ADN de calidad de las muestras del sistema en serie. Como se mencionó en el apartado 7.6, no fue posible obtener ADN de calidad de ninguna

muestra de vinaza, ya que la concentración en promedio fue de $19.9 \pm 3.73 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y la pureza (medida como la relación 260/280) fue de 1.72 ± 0.18 . Asimismo, fue imposible confirmar la integridad de los extractos, por lo que no se procesaron. Debido a la contingencia sanitaria, no fue posible hasta el momento de escritura de esta tesis tener resultados de la secuenciación de las muestras B24-B26, C6 ni L24-L26. A pesar de esto, los principales resultados obtenidos a partir de las muestras biológicas se describen en los siguientes apartados. En el anexo **Error! Reference source not found.** se muestra un listado de todas las muestras y el día en el que fueron tomadas con el fin de facilitar la comparación con resultados previamente discutidos.

8.3.1. Composición de los microorganismos planctónicos en el AMBBR

En la Tabla 14, se señala la correspondencia de las muestras con la fase del experimento. Los extractos de ADN de este tipo de muestra en general mostraron resultados muy satisfactorios. La concentración promedio fue de $199.45 \pm 127.83 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y la pureza de 1.86 ± 0.04 . Se confirmó la integridad del ADN en todas las muestras. Se presentaron bandas íntegras de más de 10 kb en los electrogramas sin presencia de degradado (anexo C).

Tabla 14. Muestras de ADN extraídas del líquido del AMBBR y su correspondencia.

IDs de muestra	Fase	COV (g DQO L ⁻¹ d ⁻¹)
B1 B2 B3 B4 B5 B6	1	54.5
B7 B8 B9 B10	2	81.8
B11 B12 B13 B14	3	109.1
B15 B16 B17 B18	4	136.4
B19 B20 B21 B22	5	163.6
B23 B24* B25* B26*	6	157-174.6

*No secuenciado aún.

Al procesar las secuencias *in silico*, más del 90% de estas solaparon correctamente mediante el script *flash*. Al desreplificarlas, se encontraron en promedio alrededor de

60,000 secuencias únicas. En promedio, 35% de las secuencias fueron quiméricas. Después de eliminar los singletons, se encontró que el 8.9% de estas correspondían a secuencias únicas. Finalmente, se trabajó con 1269 OTUs.

En la Figura 16, se observa la abundancia relativa de OTUs a nivel de filo en las fases. Se destaca la prevalencia de *Firmicutes* en todo el proceso (59-91%). El filo *Bacteroidota* comienza a ser abundante a finales de la 2ª fase, llegando hasta una abundancia de 32.94% a mitad de la 4ª fase. Aun así, disminuye a 6.75% a inicios de la última fase. El tercer taxón con mayor abundancia es *Proteobacteria*. Su punto más alto ocurre a finales de la fase inicial (19.17%), pero disminuye casi de manera concomitante con la aparición de *Bacteroidota* a partir del final de la 2ª fase. Adicionalmente, hay presencia de otros taxones mucho menos abundantes (menos del 10%) tales como *Actinobacteriota* (prevalente en todo el proceso) o *Chloroflexi*.

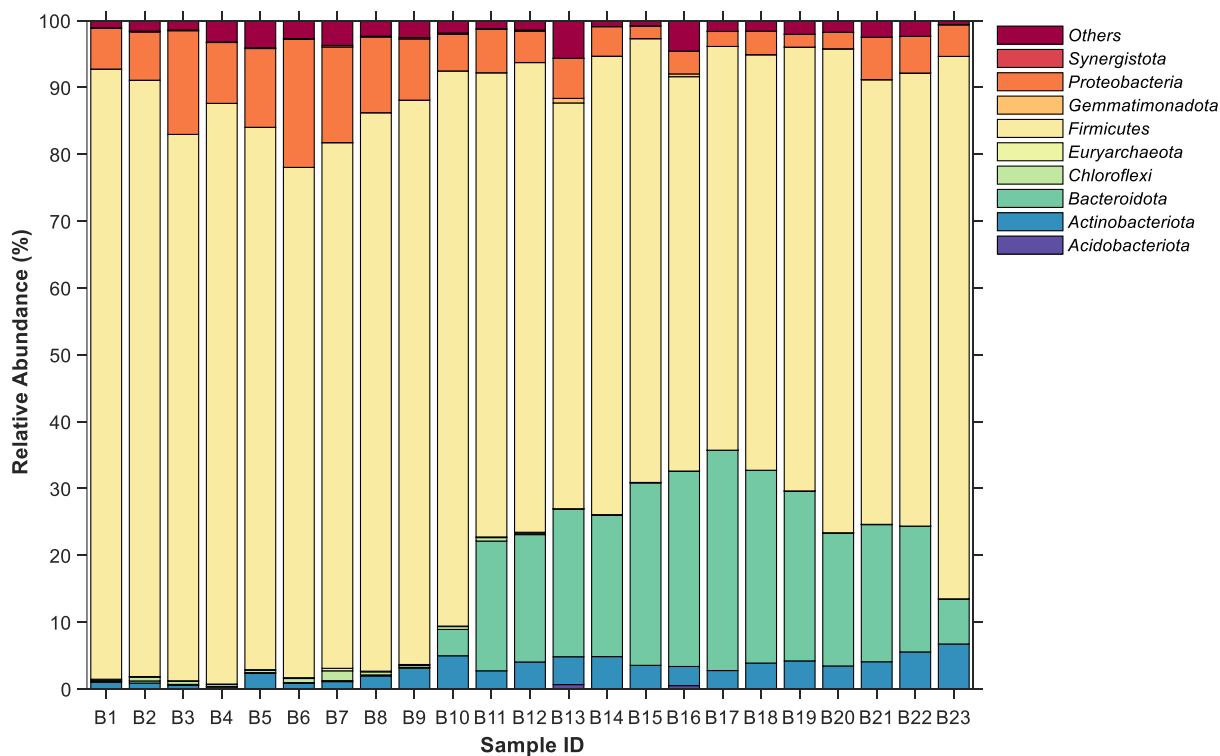


Figura 16. Abundancias relativas de los OTUs presentes en el AMBBR a nivel de filo de manera planctónica. Se realizó un corte al 0.2%.

El punto máximo de producción de H₂ fue a finales de la fase 2, relacionado con la gran abundancia de *Firmicutes* y la presencia, en menor cantidad, de *Proteobacteria*. La presencia de *Bacteroidota* podría ser perjudicial para el sistema, ya que se ha reportado que este filo podría oxidar el H₂ (Islam *et al.*, 2020). Los miembros de este último filo podrían estar asociados a un aumento en la carga orgánica. Sin embargo, parecen no tolerar la máxima COV estudiada en el presente trabajo.

En comparación con las muestras del reactor en lote de la sección 8.1.3, hay semejanzas, tales como la gran abundancia de *Firmicutes* y la presencia de *Proteobacteria* en mayor o menor grado en todo el proceso fermentativo.

En la Figura 17 se observan a nivel de género los taxones más abundantes. Por un lado, *Sporolactobacillus*, miembro del filo *Firmicutes*, fue el género con mayor abundancia en todo el proceso (52-27%). *Clostridium* fue otro miembro del mismo filo con una prevalencia relativamente estable (28-15%) hasta la última fase. Estos dos taxones, en conjunto, fueron los más abundantes en todo el proceso como se mencionó en la descripción de la figura anterior. Sin embargo, a partir de la tercera fase y sobre todo en la última muestra analizada, la abundancia de *Lactobacillus* (otro miembro del mismo filo) se vuelve importante, ya que su valor relativo se dispara de 8.4 a 22.5% al aumentar la carga hasta vinaza sin diluir.

Por otro lado, *Prevotella* fue el miembro más abundante del filo *Bacteroidota* y es el género identificado que aparece a partir de la 3a fase pero que, para la última, disminuye su abundancia. *Acetobacter* forma parte del filo *Proteobacteria* y es el género identificado cuya abundancia relativa disminuye de manera concomitante con el aumento de *Prevotella*. Por último, hay presencia de otros OTU menos abundantes (menos del 10%) como, por ejemplo, *Bifidobacterium* (filo *Actinobacteria*), el cual aparece a partir del final de la 2a fase.

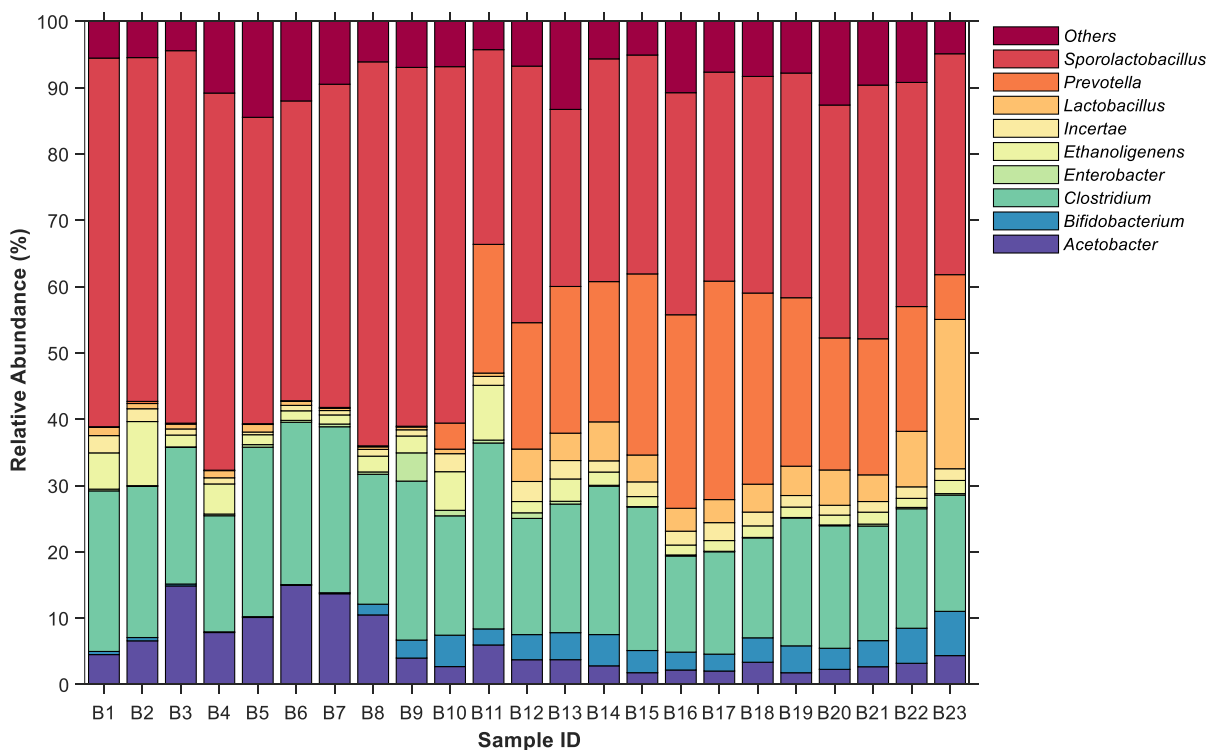


Figura 17. Abundancias relativas de los OTUs presentes en el AMBBR a nivel de género de manera planctónica. Se realizó un corte al 3.0%.

En cuanto a la productividad de H₂ obtenida en el AMBBR, se relacionan los géneros más abundantes *Sporolactobacillus*, *Clostridium* y, en menor medida, a la presencia de *Bifidobacterium* y *Ethanoligenens*. Sin embargo, la presencia de *Prevotella* a partir de ese punto pudo haber impactado la producción gaseosa. Por otro lado, ya que la composición del gas del AMBBR permaneció relativamente estable, se intuye que no afectó de manera significativa en la productividad. Existen reportes mixtos en la literatura acerca de *Lactobacillus*, ya que algunos son productores de H₂ (Asada *et al.*, 2006), mientras que algunos consumen el sustrato sin producción de gas y/o generan bacteriocinas (péptidos antagonistas de bacterias) (Noike, 2002) o peróxido (Hertzberger *et al.*, 2014). *Incertae* (*Incertae sedis*) se trata de miembros del orden *Clostridiales*, los cuales también se han asociado a producción de H₂ (Chiariotti *et al.*, 2018)

8.3.2. Poblaciones presentes en las muestras de soportes para biopelícula del AMBBR

En la Tabla 15 se señala la correspondencia de las muestras con la fase del experimento; también es importante recordar y destacar que se muestreó al final de cada fase.

Tabla 15. Muestras de ADN extraídas de los soportes de biopelícula del AMBBR y su correspondencia.

ID de muestra	Fase	COV (g DQO/L·d)
C1	1	54.5
C2	2	81.8
C3	3	109.1
C4	4	136.4
C5	5	163.6
C6*	6	157-174.6

*No secuenciado aún.

Todas las muestras de ADN extraídas de la biopelícula de los soportes pasaron los parámetros de calidad establecidos. La concentración promedio fue de 166.27 ± 97.46 ng μL^{-1} mientras que la relación 260/280 fue de 1.87 ± 0.03 . En AGE, se observaron bandas íntegras de más de 10 kb en los electrogramas presentes en el anexo C.

Al procesar las secuencias, se encontró que en promedio más del 90% formaron contigs. Al desreplicarlas, se encontraron en promedio alrededor de 80,000 secuencias únicas. Se encontró que alrededor de 34% de las secuencias fueron quiméricas. Después de eliminar singletons, se encontró que el 84.75% de las agrupaciones sólo tenían un miembro. Finalmente, el número de OTUs con el que se trabajó fue de 513. Esto contrasta con el número de OTUs encontrados en el AMBBR de forma planctónica. La menor cantidad presente en los últimos es señal de menor riqueza ecológica. Sin embargo, ambos elementos están presentes en el mismo

reactor, por lo que, de encontrarse otros taxones, aumentarían la robustez del sistema (Wu *et al.*, 2019).

En la Figura 18, se observa la abundancia de taxones presentes en las biopelículas a nivel de filo y su prevalencia en las fases. Al igual que en las muestras de sedimento del AMBBR, el taxón dominante es *Firmicutes* (42-76%), lo cual indica que muy posiblemente sea el filo con mejor adherencia a los soportes Kaldnes K1. El segundo más abundante es *Bacteroidota*, el cual incrementa su valor relativo de un promedio de 9% en las primeras dos fases a un promedio de 28% hasta la quinta fase. Este valor es comparable al obtenido en el sedimento del AMBBR, al menos a partir de la tercera fase. *Actinobacteriota* es el tercer más abundante, con valores entre 4-20% (mayor que en las muestras tipo B), seguido por *Proteobacteria*, cuyo valor relativo en la composición poblacional se mantuvo relativamente estable (4.7-7.6%).

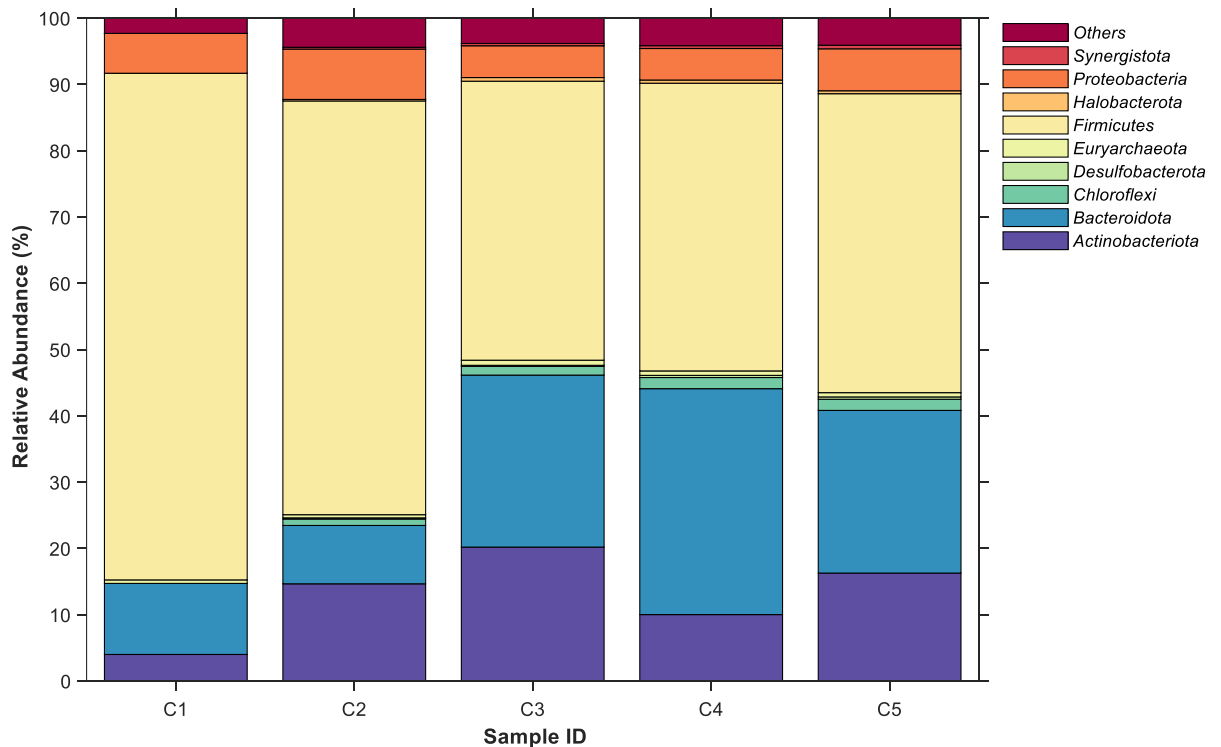


Figura 18. Abundancias relativas de los OTUs presentes en la biopelícula de los soportes dentro del AMBBR a nivel de filo. Se realizó un corte al 0.2%.

La ausencia de *Archaea* posiblemente se deba a que previamente se ha reportado que los soportes de polietileno permiten preferencialmente la adhesión de bacterias hidrolíticas y fermentativas, a comparación de soportes hechos de cerámica o poliuretano (Silva *et al.*, 2006).

A continuación, en la Figura 19 se pueden observar, a nivel de género, los OTUs más abundantes en las muestras de soportes. Al igual que en los extractos analizados a partir del sedimento del AMBBR, *Sporolactobacillus* y *Clostridium* son de los miembros más abundantes del filo *Firmicutes*, 27% y 10% en promedio, respectivamente, ambos con ligeras fluctuaciones a través de las fases. En contraste, está presente *Lactobacillus*, parte del mismo filo, el cual se encuentra en mayor abundancia (12.5% en promedio) a finales de la 1ª y 3ª fase, mientras que en el resto del experimento se encuentra en menor abundancia (1.9%). Asimismo, de manera similar que, en las muestras tipo B, *Prevotella* vuelve más abundante a partir de la 3ª fase, llegando a su valor más alto en la 4ª (8.4-33.4%) y es el miembro con mayor abundancia del filo *Bacteroidetes*. Su presencia en las biopelículas del reactor es más notoria, ya que en las muestras del sedimento del AMBBR, su abundancia relativa en las primeras 2 fases fue prácticamente despreciable, mientras que en los soportes su abundancia desde el final de la 1ª fase fue de 10.7%. Del filo *Actinobacteria*, el miembro más abundante es *Bifidobacterium* y, de manera comparable con *Prevotella*, se encuentra con mayor abundancia en los soportes que de manera planctónica en el reactor, fluctuando su abundancia desde 2.9% en la 1ª fase hasta 18.7% en la 3ª, cuyo valor decae en las siguientes fases.

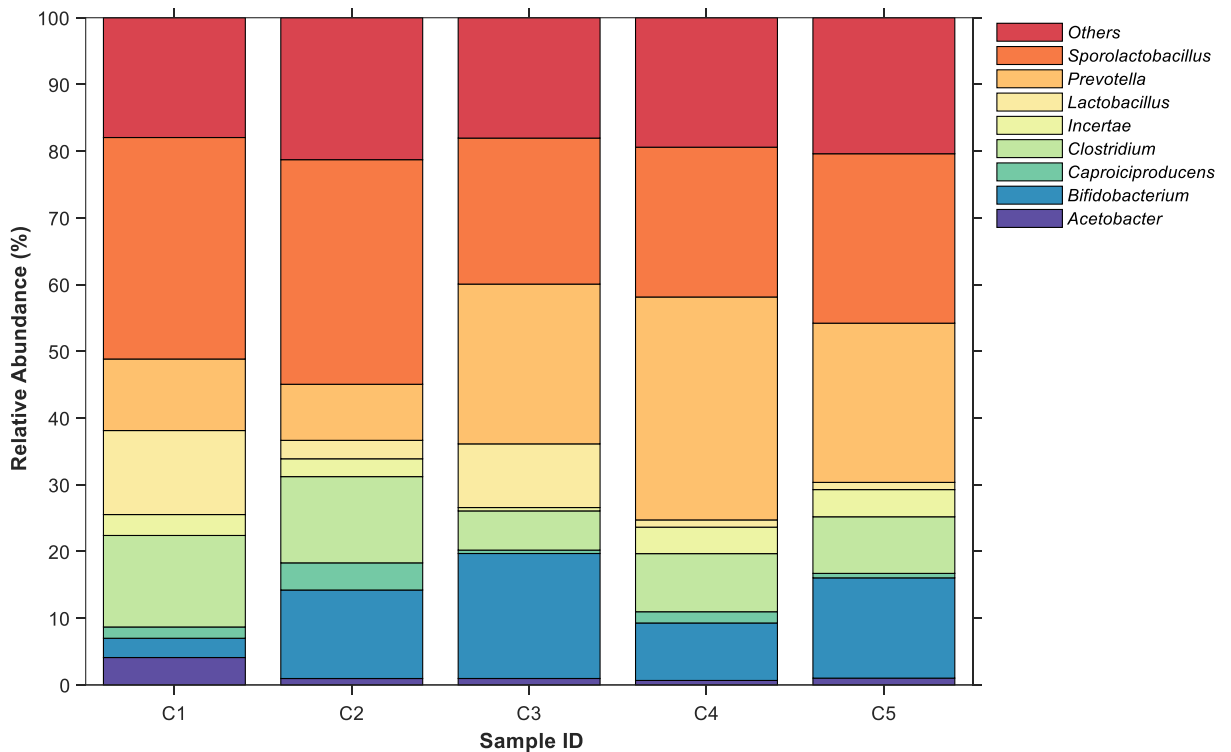


Figura 19. Abundancias relativas de los OTUs presentes en la biopelícula de los soportes dentro del AMBBR a nivel de género. Se realizó un corte al 3.0%.

Ya que la mejor producción de H₂ se obtuvo en la segunda fase, podría estar relacionada de manera positiva con los géneros *Sporolactobacillus* y *Clostridium*, así como posiblemente *Bifidobacterium*. Esto, ya que son los más abundantes en las muestras de biopelícula de los soportes del AMBBR y se ha demostrado que son beneficiosas para el proceso hidrogenogénico. Asimismo, podría relacionarse de manera negativa con el género *Prevotella* ya que comienza a ser más abundante a medida que disminuye la producción de gas y se ha reportado que puede competir por el sustrato, aunque también puede aglutinarse con otros microorganismos y ayudar en la formación de la biopelícula (Cabrol *et al.*, 2017).

Es necesario, para un análisis más integral, secuenciar y analizar el resto de las muestras ya que no es correcto relacionar la peor producción de H₂, obtenida en la 6a fase, con los resultados obtenidos aquí, aunque cabe destacar que C5 es básicamente

el precursor microbiano de la fase 6, por lo que muy posiblemente podría haber correlación de la producción de gas del AMBBR con las abundancias de esta última muestra.

8.3.3. Composición de los microorganismos que forman parte del LAG en el UASB

En la Tabla 16 se muestra la correspondencia de las muestras con la fase del experimento:

Tabla 16. Muestras de ADN extraídas del sedimento del UASB y su correspondencia.

ID's de muestra	Fase
L1 L2 L3 L4 L5 L6	1
L7 L8 L9 L10	2
L11 L12 L13 L14	3
L15 L16 L17 L18	4
L19 L20 L21 L22	5
L23 L24* L25* L26*	6

*No secuenciado aún.

La extracción de ADN fue satisfactoria, ya que las muestras pasaron todos los estándares de calidad. La concentración fue en promedio de 65.69 ± 26.97 ng/ μ L mientras que la pureza (260/280) fue de 1.81 ± 0.07 ng μ L⁻¹. En cuanto a la integridad, se observaron bandas de tamaño de más de 10 kb en los electrogramas. Asimismo, la gran mayoría no presentaron degradado, mientras que el resto presentó degradado leve (anexo C). A pesar de esto, la secuenciación posterior fue exitosa.

Al procesar las secuencias, se encontró que en promedio más del 99% de estas solaparon correctamente. Al desreplicarlas, se encontraron en promedio alrededor de 60,000 secuencias. Se encontraron un promedio de alrededor de 45% secuencias quiméricas del total de secuencias únicas. Filtrando los singletons del resto de las

secuencias, se encontró que el 5.0% de estas correspondían a secuencias únicas. Finalmente, el número de OTUs con el que se trabajó fue de 1232. La cantidad, semejante a la obtenida en 8.3.1 puede ser porque, al no contar con un sedimentador de biomasa, una gran cantidad de bacterias se transfirieron al segundo reactor, y formaron parte de los gránulos. Es decir, posiblemente gran parte de los OTUs presentes en el UASB provengan del AMBBR.

En la Figura 20, se distinguen los taxones más abundantes del UASB a nivel de filo. El más abundante detectado fue *Firmicutes* (37-61%), seguido de *Bacteroidota* (19-42%). El único taxón relativamente abundante perteneciente al dominio *Archaea* es *Euryarchaeota*. Desde la fase 1 su abundancia disminuyó drásticamente (de 28% a un promedio de 11.2%). Sin embargo, su descenso a un promedio de 2.52% se dio a partir de la mitad de la fase 3 (L13). *Actinobacteria* y *Proteobacteria* también prevalecieron en el proceso. La abundancia del primero aumentó a partir de la mitad de la fase 2 (L9), mientras que el segundo varió entre 1.98% y 6.93%.

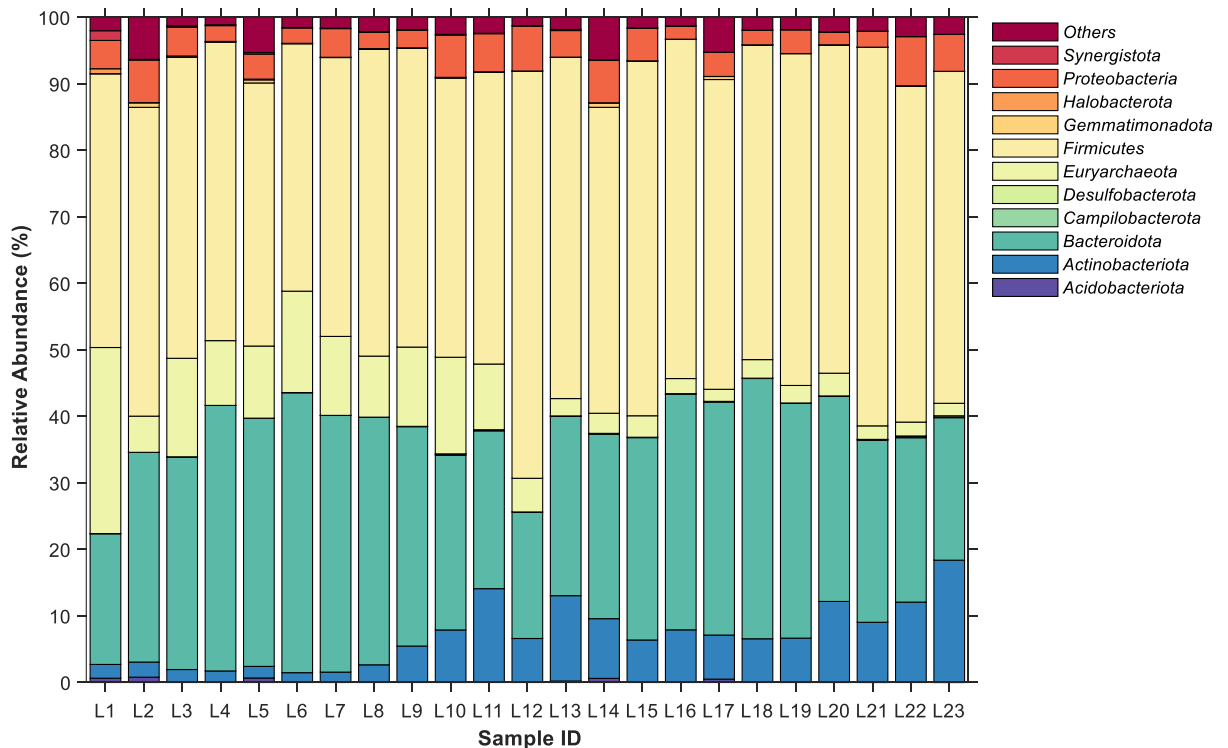


Figura 20. Abundancias relativas de los OTUs presentes en el sedimento del UASB a nivel de filo. Se realizó un corte al 0.2%.

Euryarchaeota representa mayoritariamente al dominio *Archaea* en las muestras, ya que su valor es más del 85% en todas. Se detectó presencia de *Halobacterota* (género identificado: *Methanosaeta*), *Crenarchaeota* (clase identificada: *Nitrososphaeraceae*) pero su abundancia fue despreciable (mucho menor que 0.3%).

En la Figura 21, se observan los géneros de microorganismos más abundantes. Se destacan las abundancias de *Prevotella* (19-42%), seguido de *Sporolactobacillus* (14-29%), que corresponde a casi la mitad de la abundancia relativa total del sistema en todo el experimento. En menor grado, *Clostridium* (7.2-13.8%), *Bifidobacterium* (1-15%) *Methanobacterium* (miembro de *Euryarchaeota* y el único cuya abundancia supera el 85% de los *Archaea*); el cual tiene abundancias prácticamente iguales que las de su filo o, en mucho menor grado, otros tales como *Acetobacter*, *Lactobacillus* o *Caproiciproducens*.

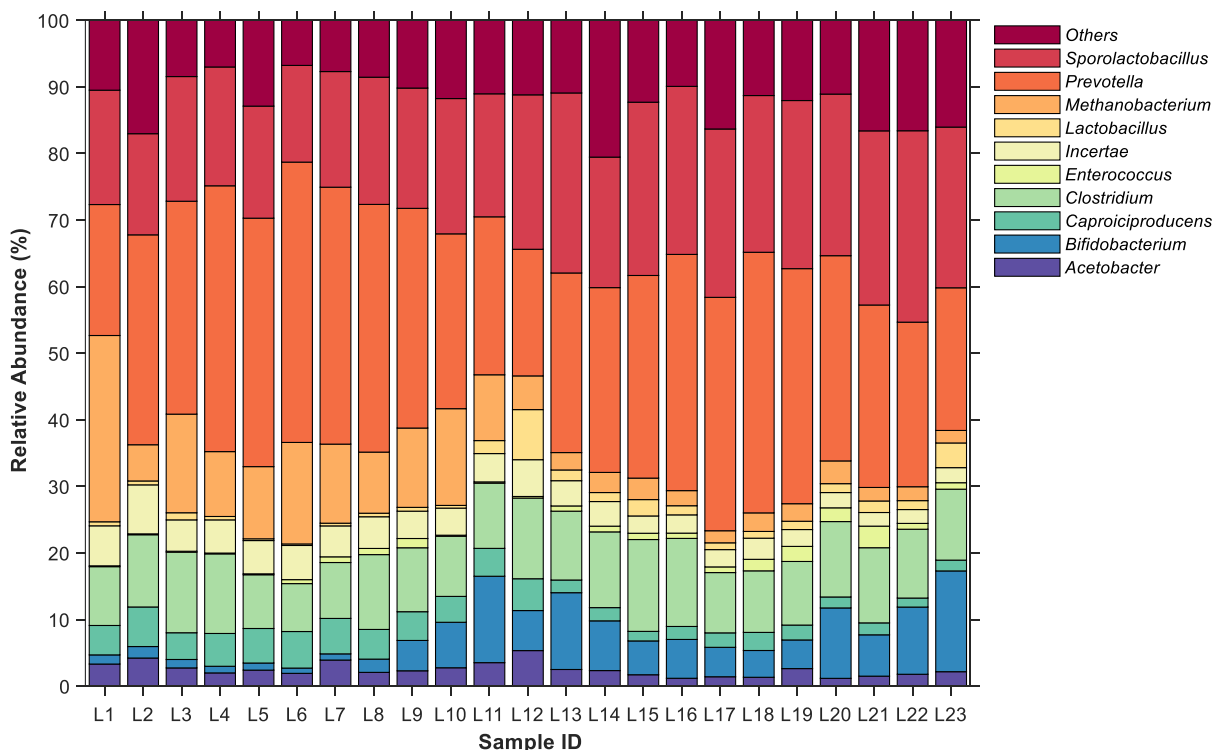


Figura 21. Abundancias relativas de los OTUs presentes en el sedimento del UASB a nivel de género.
Se realizó un corte al 3.0%.

La abundancia relativa de *Euryarchaeota* (principalmente *Methanobacterium*) puede haber sido subestimada, probablemente debido a las copias del gen *ADNr 16S* a comparación de otros filos (Campanaro *et al.*, 2018). Sin embargo, la baja producción de CH₄ coincide con el decaimiento de su abundancia relativa. La presencia de bacterias ácido-lácticas como *Bifidobacter*, *Lactobacillus* o *Sporolactobacillus* pudo haber aportado al sistema ya que ha sido previamente relacionado con productividad de CH₄ (Yun *et al.*, 2016). Sin embargo, debido a la complejidad del sistema en serie, es difícil llegar a la misma conclusión, ya que en el UASB la hidrogenogénesis predominó sobre la metanogénesis a partir de la fase 3. Por otro lado, algunos autores relacionan la presencia de *Clostridium* y *Caproiciproducens* con acidificación del medio (Wang *et al.*, 2020).

8.4. Principales microorganismos del sistema y su relación

En cuanto a los taxones encontrados en el sistema de manera global, se puede deducir de forma general el posible rol y razón de estar de la mayoría de los géneros abundantes y presentes con base en la literatura:

- *Sporolactobacillus*: productor de lactato, acetato y butirato. Capaz de formar endosporas resistentes y de formar gránulos (Kumar *et al.*, 2016; Pugazhendhi *et al.*, 2019).
- *Prevotella*: productor de H₂S, acetato, butirato y ácido isovalérico. Capaz de formar biopelículas, autofloculante (Kumar *et al.*, 2016; Pugazhendhi *et al.*, 2019; Cabrol *et al.*, 2017).
- *Clostridium*: productor de H₂, acetato, butirato, lactato (el cual también consume). Formador de endosporas resistentes (Kumar *et al.*, 2016; Pugazhendhi *et al.*, 2019; Niño-Navarro *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2020; Cabrol *et al.*, 2017).

- *Methanobacterium*: Productor de CH₄, hidrogenotrófico (reduce CO₂ empleando H₂) (Boone, 2015; Wang *et al.*, 2020).
- *Lactobacillus*: Efectos negativos (competición por sustrato, inhibición de bacterias) (Niño-Navarro *et al.*, 2019; Cabrol *et al.*, 2017) y positivos (producción de lactato, H₂) (Pugazhendhi *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2007; Cabrol *et al.*, 2017).
- *Bifidobacterium*: Productor de H₂, lactato, acetato. Capaz de formar biopelículas (Niño-Navarro *et al.*, 2019; Biavati *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2020).
- *Acetobacter*: Consumidor de acetato, lactato, generando CO₂ (Niño-Navarro *et al.*, 2019).
- *Ethanoligenens*: Productor de H₂, acetato (Li *et al.*, 2019).
- *Caproiciproducens*: Productor de caproato (Wang *et al.*, 2020).
- *Enterobacter*: Consumo de O₂, productor de H₂, formiato, acetato, lactato. Capaz de formar biopelículas (Kumar *et al.*, 2016; Pugazhendhi *et al.*, 2019; Niño-Navarro *et al.*, 2019).
- *Incertae*: Productor de H₂, del orden *Clostridiales* (Chiariotti *et al.*, 2018)

Las siguientes figuras (Figura 22, Figura 23, Figura 24) muestran las abundancias acumuladas de bacterias productoras de hidrógeno (HPB), las no productoras de gas energético (NGPB, entendiéndose por esto las que no producen hidrógeno ni metano) y las arqueas productoras de metano (MPA) por muestra, tomando en cuenta las descripciones anteriores y asumiendo el mejor de los casos en el que la totalidad de los microorganismos que se encuentran presentes (cuyo género coincide) son los mismos que han sido descritos como productores de gas. Esta suposición es muy optimista porque sobreestima la abundancia relativa de los productores reales de gases, ya que el hecho que los géneros coincidan no significa que poseen las mismas capacidades; puede haber una alta variabilidad entre especies dentro del mismo género.

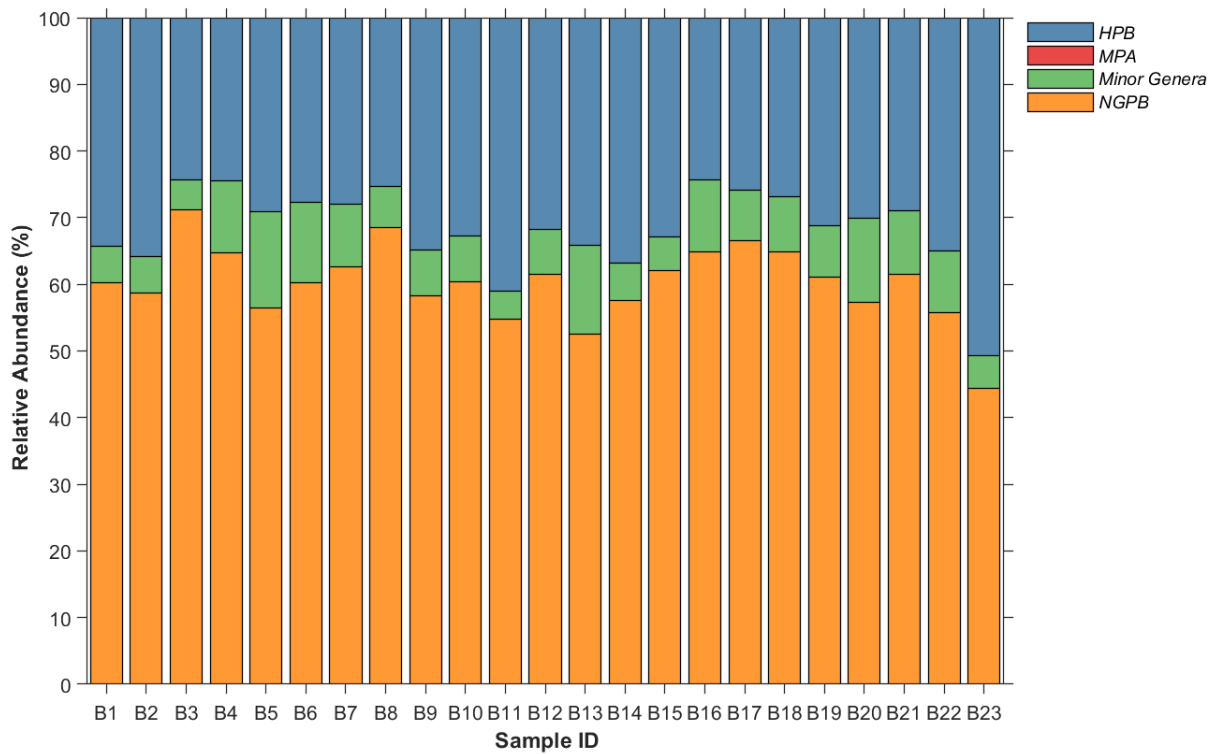


Figura 22. Abundancias relativas de microorganismos productores y no productores de gas con contenido energético presentes de manera planctónica en el AMBBR. Se realizó un corte al 3.0%.

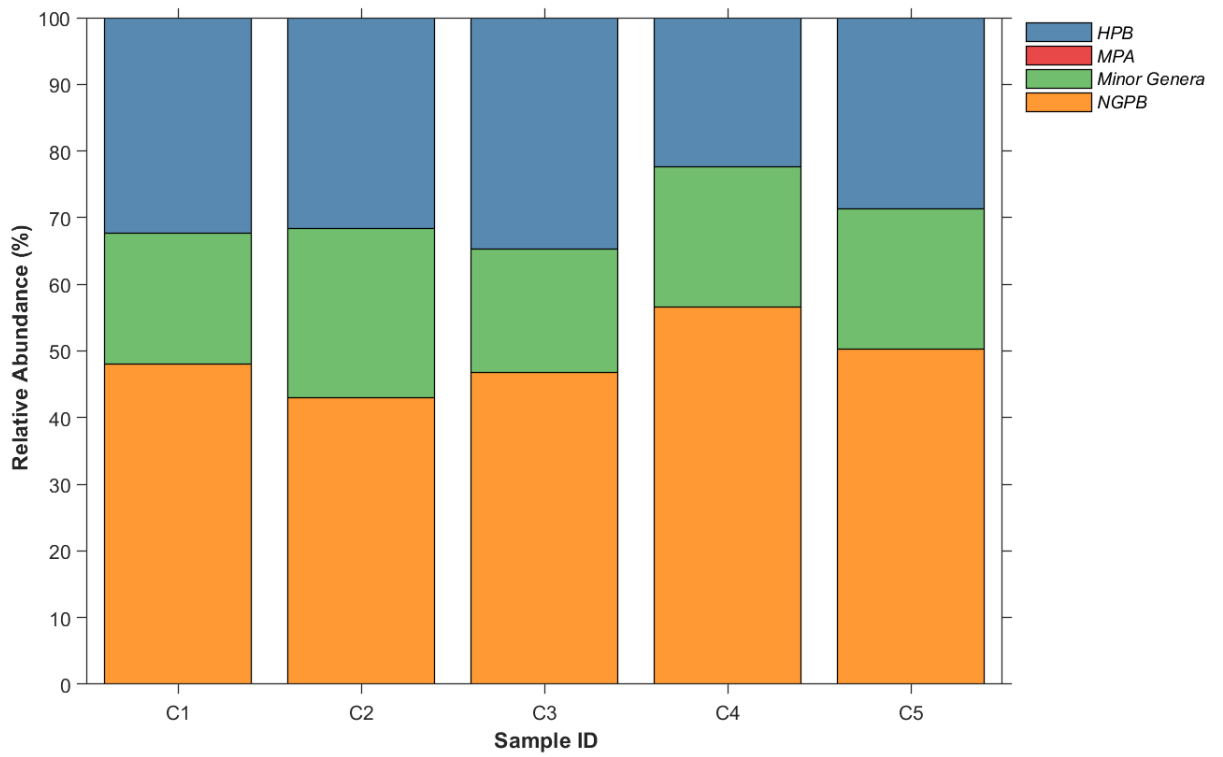


Figura 23. Abundancias relativas de microorganismos productores y no productores de gas con contenido energético presentes en la biopelícula de los soportes dentro del AMBBR. Se realizó un corte al 3.0%.

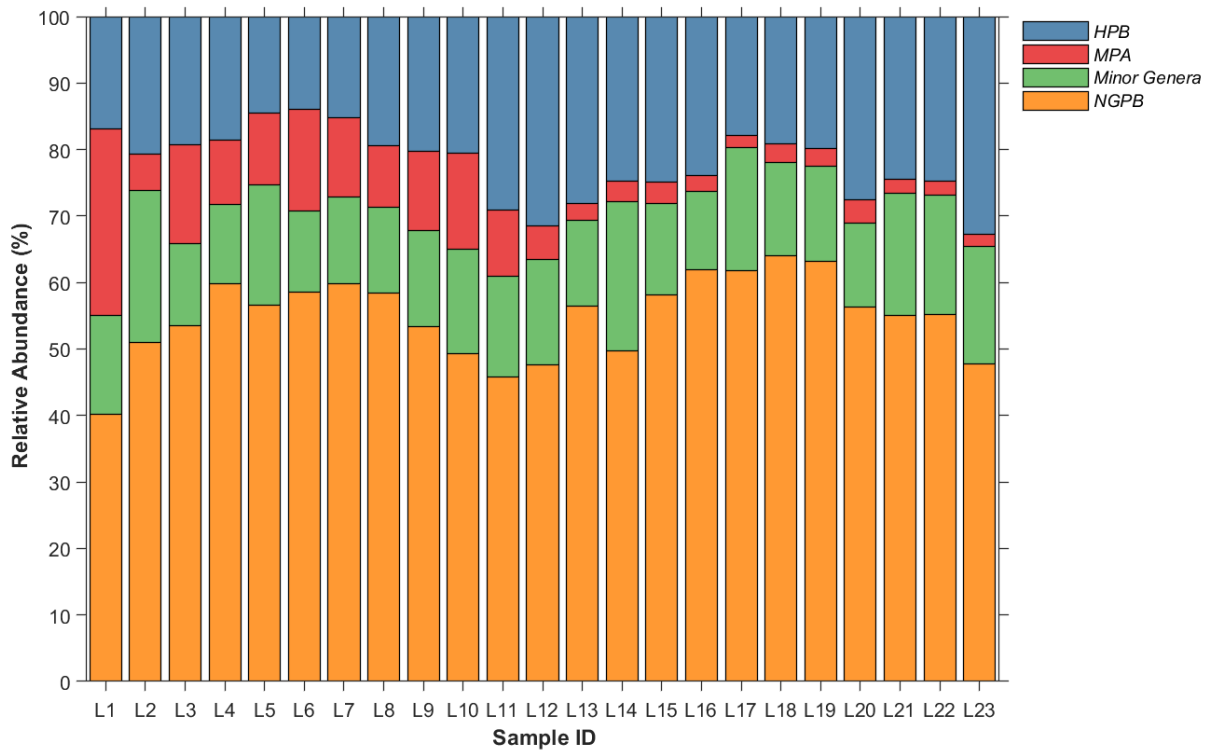


Figura 24. Abundancias relativas de microorganismos productores y no productores de gas con contenido energético presentes en el sedimento del UASB. Se realizó un corte al 3.0%.

Es evidente que en los tres tipos de muestras son más abundantes las no productoras; sin embargo, hay que recordar que el rol de estas puede ser esencial, por ejemplo, al formar biopelículas en el AMBBR o gránulos nuevos en el UASB, por lo que no necesariamente afectan de manera negativa a la productividad.

IX. Conclusiones

Se valoró el posible efecto de la adición de nutrientes o procedencia de inóculo en la composición de microorganismos de un reactor en lote. Asimismo, se determinó la dinámica poblacional de un sistema en serie AMBBR-UASB y se indagó su posible efecto en el desempeño de producción y calidad gaseosa a distintas cargas orgánicas. Para ello se emplearon vinazas tequileras sin adición de nutrientes. Sobre la base de los objetivos específicos, se concluye que:

- 1) La adición de nutrientes, en fermentaciones en lote de vinazas tequileras, parece no afectar a la composición poblacional de bacterias acidogénicas e hidrogenogénicas como *Clostridium* o *Klebsiella*, al emplear inóculo pretratado térmicamente.
- 2) El sistema AMBBR-UASB es capaz de generar eficientemente hidrógeno, presentando una composición de otros gases como CO₂ debajo de 30%. La productividad gaseosa es afectada por la COV aplicada, especialmente por encima de 100 g DQO L⁻¹ d⁻¹ en el AMBBR y su equivalente en el UASB. La estabilidad del AMBBR se atribuye al uso de soportes Kaldnes k1 para biopelículas bacterianas, evitando la inhibición completa incluso al alimentar vinaza concentrada.
- 3) El filo *Firmicutes* fue uno de los más abundantes en todo el proceso, seguido por *Bacteroidota*, independientemente del tipo de muestra (lodo anaerobio granular, células en suspensión, biopelículas adheridas a soportes). Se asocian los géneros *Sporolactobacillus* y *Clostridium* a la mayor producción de H₂, mientras que el aumento de abundancia relativa de *Lactobacillus* a altas cargas sugiere una connotación negativa de la presencia de este taxón. *Clostridium* permanece con una abundancia relativa muy similar en todo el sistema a lo largo de las fases, indicando resistencia ante cargas orgánicas elevadas. La gran abundancia relativa de bacterias como *Prevotella* probablemente es

perjudicial ya que compiten por el sustrato sin generar gases de gran contenido energético, a su vez contribuyendo a la acidificación del medio. Por otro lado, se detectó presencia de bacterias menos abundantes como *Ethanoligenens* que podrían haber colaborado en una mayor producción de H₂. La poca producción de CH₄ en el sistema se debe a la disminución de *Archaea*. Su miembro más abundante detectado, *Methanobacterium*, disminuye su abundancia relativa desde la primera fase, pero de manera más notoria a partir de la tercera, coincidiendo con la baja abundancia relativa de CH₄ en el espacio de cabeza del UASB.

X. Prospectivas y limitaciones

Los resultados aquí generados ayudan a comprender algunos aspectos acerca del impacto de la composición poblacional en el desempeño de los sistemas productores de gases acarreadores de energía, así como el efecto de la carga orgánica en la abundancia relativa de los microorganismos presentes. Por otro lado, se necesitan técnicas complementarias como transcriptómica, proteómica y/o metabolómica para profundizar más en los cambios metabólicos de los microorganismos. Esto permitirá comprender a detalle las alteraciones que atraviesan las poblaciones y su impacto en los productos y desempeño del sistema. También, se tienen como prospectivas mayores análisis de reactores en serie y su validación mediante estadística, empleando residuos agroindustriales con el menor pretratamiento posible para colaborar con la viabilidad y escalabilidad de los procesos industriales, asociando productividades con los microorganismos presentes y su función.

Emplear reactores no comerciales tiene aspectos positivos y negativos. El principal aspecto positivo es poder diseñarlo completamente dependiendo de la necesidad del proceso. Sin embargo, el principal aspecto negativo es que no es fácil alcanzar las condiciones óptimas o la estabilidad. En nuestro caso, el problema más grande al que nos enfrentamos fueron las fugas en los reactores, sobre todo en el UASB. Se tuvo que desmontar completamente, parchar y luego volver a montar, lo cual posiblemente interfirió de manera significativa en los resultados, por lo que hay un impacto en el desempeño desde la elección del material del reactor.

Una de las principales limitantes fue la falta de automatización. Asimismo, es de considerar colocar un sedimentador de biomasa justo después del AMBBR ya que se intuye que una porción significativa del gas producido en el UASB era gracias a la biomasa entrante y al posible gradiente de pH. La pandemia por COVID-19 generó muchas limitaciones significativas; en particular, a mitad del experimento en continuo, ocasionó que en un par de semanas fuera difícil el ingreso al laboratorio, por lo que representó ser una restricción para el debido análisis y control del sistema.

XI. Bibliografía

- Ahn, Y., Park, E.-J., Oh, Y.-K., Park, S., Webster, G. & Weightman, A. J. (2005). *Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production*. FEMS Microbiology Letters. 249(1):31–38. doi:10.1016/j.femsle.2005.05.050
- Alibardi, L., Favaro, L., Lavagnolo, M. C., Basaglia, M., & Casella, S. (2012). *Effects of heat treatment on microbial communities of granular sludge for biological hydrogen production*. Water Science and Technology. 66(7):1483–1490. doi:10.2166/wst.2012.336
- Anijiofor, S. C., Jamil, N. A. M., Jabbar, S., Sakyat, S. & Gomes, C. (2017). *Aerobic and anaerobic sewage biodegradable processes: The gap analysis*. International Journal of Research in Environmental Science. 3(3):9-19. doi:10.20431/2454-9444.0303002
- APHA. (2017). *Standard methods for the examination of water and waste water*. Washington DC, NY, American Public Health Association. 23th ed.
- Asada, Y., Tokumoto, M., Aihara, Y., Oku, M., Ishimi, K., Wakayama, T., Miyake, J., Tomiyama, M. & Kohno, H. (2006). *Hydrogen production by co-cultures of Lactobacillus and a photosynthetic bacterium, Rhodobacter sphaeroides RV*. International Journal of Hydrogen Energy. 31(11):1509–1513. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.06.017
- Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., Margaritis, A. & Reid, G. (2008). *The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures*. International Journal of Hydrogen Energy. 33(15):4064–4073. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.05.069
- Bagley, S. T. (1985). *Habitat association of Klebsiella species*. Infect Control. 6(2):52-8. doi: 10.1017/s0195941700062603.
- Bailén, M., Bressa, C., Larrosa, M. & González-Soltero, R. (2019). *Bioinformatic strategies to address limitations of 16rRNA short-read amplicons from different sequencing platforms*. Journal of Microbiological Methods. 169:105811. doi:10.1016/j.mimet.2019.105811
- Bassin, J. P., Dias, I. N., Cao, S. M. S., Senra, E., Laranjeira, Y. & Dezotti, M. (2016). *Effect of increasing organic loading rates on the performance of moving-bed biofilm reactors filled with different support media: Assessing the activity of suspended and attached biomass fractions*. Process Safety and Environmental Protection. 100:131-141. doi:10.1016/j.psep.2016.01.007
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S. & Bottazzi, V. (2000). *Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications*. Annals of Microbiology, 50(2):117-131.
- Boone, D. R. (2015). *Methanobacterium*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 1–8. doi:10.1002/9781118960608.gbm00495

- BP. (2020). *BP statistical review of world energy 2020*. Accesado en <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2020-full-report.pdf>
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978). *Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 75(10):4801-4805. doi:10.1073/pnas.75.10.4801
- Buitrón, G. & Carvajal, C. (2010). *Biohydrogen production from Tequila vinasses in an anaerobic sequencing batch reactor: Effect of initial substrate concentration, temperature and hydraulic retention time*. *Bioresource Technology*. 101(23):9071–9077. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.127
- Buitrón, G., Prato-Garcia, D. & Zhang, A. (2014). *Biohydrogen production from tequila vinasses using a fixed bed reactor*. *Water Science and Technology*. 70(12):1919–1925. doi:10.2166/wst.2014.433
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S. & Zemskaya, T. I. (2019). *The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results*. *Scientific Data*. 6:190007 (2019). doi:10.1038/sdata.2019.7
- Cabrol, L., Marone, A., Tapia-Venegas, E., Steyer, J.-P., Ruiz-Filippi, G. & Trably, E. (2017). *Microbial ecology of fermentative hydrogen producing bioprocesses: useful insights for driving the ecosystem function*. *FEMS Microbiology Reviews*. 41(2):158–181. doi:10.1093/femsre/fuw043
- Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P. G., Zhu, X. & Angelidaki, I. (2018). *Taxonomy of anaerobic digestion microbiome reveals biases associated with the applied high throughput sequencing strategies*. *Scientific Reports*. 8:1926. doi:10.1038/s41598-018-20414-0
- Cassir, N., Benamar, S., Croce, O. & La Scola, B. (2016). *Clostridium species identification by 16S rRNA pyrosequencing metagenomics*. *Clinical Infectious Diseases*. 62(12):1616-1618. doi:10.1093/cid/ciw203
- Chiariotti, A. & Crisà, A. (2018). *Bio-Hydrogen Production From Buffalo Waste With Rumen Inoculum and Metagenomic Characterization of Bacterial and Archaeal Community*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2:13. doi:10.3389/fsufs.2018.00013
- Chynoweth, D. P., Owens, J. M. & Legrand, R. (2001). *Renewable methane from anaerobic digestion of biomass*. *Renewable Energy* 22(1-3), 1-8. doi: 10.1016/S0960-1481(00)00019-7
- Cisneros-Pérez, C., Etchebehere, C., Celis, L. B., Carrillo-Reyes, J., Alatríste-Mondragón, F. & Razo-Flores, E. (2017). *Effect of inoculum pretreatment on the microbial community structure and its performance during dark fermentation using anaerobic fluidized-bed reactors*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 42(15):9589–9599. doi:10.1016/j.ijhydene.2017.03.157

- Consejo Regulador del Tequila (CRT). (s.f.) *Informe estadístico*. Accesado en 14 de enero 2021 <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>
- Corcoll, N., Österlund, T., Sinclair, L., Eiler, A., Kristiansson, E., Backhaus, T. & Eriksson, K. M. (2017). *Comparison of four DNA extraction methods for comprehensive assessment of 16S rRNA bacterial diversity in marine biofilms using high-throughput sequencing*. FEMS Microbiology Letters. 364(14). doi:10.1093/femsle/fnx139
- Corona, V. M. & Razo-Flores, E. (2018). *Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency*. Bioresource Technology. 249:334-341. doi:10.1016/j.biortech.2017.10.032
- Davila-Vazquez, G., Cota-Navarro, C. B., Rosales-Colunga, L. M., de León-Rodríguez, A. & Razo-Flores, E. (2009). *Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate*. International Journal of Hydrogen Energy. 34:4296–4304. doi:10.1016/j.ijhydene.2009.02.063
- De Amorim, E. L. C., Sader, L. T. & Silva, E. L. (2012). *Effect of substrate concentration on dark fermentation hydrogen production using an anaerobic fluidized bed reactor*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 166(5):1248–1263. doi:10.1007/s12010-011-9511-9
- Ding, C., Yang, K.-L. & He, J. (2016). *Biological and fermentative production of hydrogen*. Handbook of Biofuels Production. 303–333. doi:10.1016/b978-0-08-100455-5.00011-4
- Dinsdale, R., Bryne, K. & Tucker, D. (2007). *The anaerobic digestion of textile desizing wastewater*. Ecotextiles, The Way Forward for Sustainable Development of Textiles: Woodhead Publishing. 163-167.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry, 28(3):350-356. doi:10.1021/ac60111a017
- Elreedy, A. & Tawfik, A. (2015). *Effect of hydraulic retention time on hydrogen production from the dark fermentation of petrochemical effluents contaminated with ethylene glycol*. Energy Procedia. 74:1071–1078. doi:10.1016/j.egypro.2015.07.746
- Ferreira-Rosa, P. R. & Silva, E. L. (2017). *Review of continuous fermentative hydrogen-producing bioreactors from complex wastewater*. Frontiers in Bioenergy and Biofuels, 13:257-284. doi: 10.5772/65548
- Fortina, M. G., Manachini, P. L., Pukall, R., Mora, D., Parini, C., Stackebrandt, E. & Schumann, P. (2001). *Ureibacillus gen. nov., a new genus to accommodate Bacillus thermosphaericus (Andersson et al. 1995), emendation of Ureibacillus thermosphaericus and description of Ureibacillus terrenus sp. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51(2):447–455. doi:10.1099/00207713-51-2-447
- Fuess, L. T., Ferraz, A. D. N., Machado, C. B. & Zaiat, M. (2018). *Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane*

vinasse dark fermentation: The key role of lactate. *Bioresource Technology*. 247:426–433. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.121

- García-Becerra, M., Macías-Muro, M., Arellano-García, L. & Aguilar-Juárez, O. (2019). *Biohydrogen production from tequila vinasses: Effect of detoxification with activated charcoal on dark fermentation performance*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 44(60):31860-31872. doi:10.1016/j.ijhydene.2019.10.059
- Goh, K. M., Gan, H. M., Chan, K.-G., Chan, G. F., Shahar, S., Chong, C. S., Kahar, U. M. & Chai, K. P. (2014). *Analysis of Anoxybacillus genomes from the aspects of lifestyle adaptations, prophage diversity, and carbohydrate metabolism*. *PLoS ONE*. 9(3):e90549. doi:10.1371/journal.pone.0090549
- Guerrero, K., Gallardo, R., Paredes, I., Quintero, J., Mau, S., Conejeros, R., Guentina, J. C. & Aroca, G. (2021). *Continuous biohydrogen production by a degenerated strain of Clostridium acetobutylicum ATCC 824*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 46(7):5100-5111. doi:10.1016/j.ijhydene.2020.11.104
- Guo, L., Li, X.-M., Bo, X., Yang, Q., Zeng, G.-M., Liao, D. & Liu, J.-J. (2008). *Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge*. *Bioresource Technology*. 99(9):3651–3658. doi:10.1016/j.biortech.2007.07.026
- Harun, N., Ibrahim, W. H. W., Lukman, M. F., Yusoff, M. H. M., Daud, N. F. S. & Zainol, N. (2018). *Process simulation of anaerobic digestion process for municipal solid waste treatment*. *Anaerobic Digestion Processes. Green Energy and Technology*. Springer, Singapore. 71-83. doi: 10.1007/978-981-10-8129-3_5
- Haynes, W. M., Lide, D. R. & Bruno, T. J. (2014). *Handbook of Chemistry and Physics*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M. & de Mattos, M. J. T. (2014). *H₂O₂ production in species of the Lactobacillus acidophilus group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase*. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(7):2229–2239. doi:10.1128/aem.04272-13
- Hugenholtz, P. & Tyson, G. W. (2008). *Metagenomics*. *Nature*. 455(7212):481–483. doi:10.1038/455481a
- Iltchenko, J., Almeida, L. G., Beal, L. L., Marconatto, L., dos Anjos Borges, L. G., Giongo, A. & Paesi, S. (2019). *Microbial consortia composition on the production of methane from sugarcane vinasse*. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 10:299-309. doi:10.1007/s13399-019-00426-0
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) & Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). (2015). *Primer Informe Bienal de Actualización Ante la Convención Marco de las Naciones Unidas Sobre el Cambio Climático*. Accesado en <https://www.gob.mx/inecc/acciones-y-programas/inventario-nacional-de-emisiones-de-gases-y-compuestos-de-efecto-invernadero>

- Islam, Z. F., Welsh, C., Bayly, K., Grinter, R., Southam, G., Gagen, E. J. & Greening, C. (2020). *A widely distributed hydrogenase oxidises atmospheric H₂ during bacterial growth*. The ISME Journal. 14:2649-2658. doi:10.1038/s41396-020-0713-4
- Jiang, L., Zhu, L., Xu, X., Lin, M., Li, Y., Li, X., Cui, H. & Huang, H. (2013). *Bioproduction of hydrogen by simultaneous saccharification and fermentation of cassava starch with 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of Clostridium tyrobutyricum*. International Journal of Hydrogen Energy. 38(15):6349–6356. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.02.109
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E. & Weinstock, G. M. (2019). *Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis*. Nature Communications. 10:5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jørgensen, S. B., Bojer, M. S., Boll, E. J., Martin, Y., Helmersen, K., Skogstad, M. & Struve, C. (2016). *Heat-resistant, extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in endoscope-mediated outbreak*. Journal of Hospital Infection. 93(1):57–62. doi:10.1016/j.jhin.2016.01.014
- Kamlage, B., Gruhl, B. & Blaut, M. (1997). *Isolation and characterization of two new homoacetogenic hydrogen-utilizing bacteria from the human intestinal tract that are closely related to Clostridium coccooides*. Applied and Environmental Microbiology. 63(5):1732-8. doi:10.1128/AEM.63.5.1732-1738.1997
- Kapdan, I. K. & Kargi, F. (2006). *Bio-hydrogen production from waste materials*. Enzyme and Microbial Technology. 38:569-582. doi:10.1016/j.enzymictec.2005.09.015
- Karthic, P. & Shiny, J. (2012). *Comparison and limitations of biohydrogen production processes*. Research Journal of Biotechnology. 7(2):59-71.
- Kelly, S. M., Lanigan, N., O'Neill, I. J., Bottacini, F., Lugli, G. A., Viappiani, A., Turrone, F., Ventura, M. & van Sinderen, D. (2020). *Bifidobacterial biofilm formation is a multifactorial adaptive phenomenon in response to bile exposure*. Scientific Reports. 10(1). doi:10.1038/s41598-020-68179-9
- Khan, M. I., Yasmin, T. & Shakoob, A. (2015). *Technical overview of compressed natural gas (CNG) as a transportation fuel*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 51:785-797. doi: 10.1016/j.rser.2015.06.053
- Kim, M., Abdulazeez, M., Haroun, B. M., Nakhla, G., & Keleman, M. (2019). *Microbial communities in co-digestion of food wastes and wastewater biosolids*. Bioresource Technology, 121580. doi:10.1016/j.biortech.2019.121580
- Knüpfer, M., Braun, P., Baumann, K., Rehn, A., Antwerpen, M., Grass, G. & Wölfel, A. R. (2020). *Evaluation of a highly efficient DNA extraction method for Bacillus anthracis endospores*. Microorganisms. 8(5):763. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050763>

- Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M. J., Procop, G. W. & Bauer, T. W. (2009). *Improved detection of biofilm-formative bacteria by vortexing and sonication: a pilot study*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 467(5):1360–1364. doi:10.1007/s11999-008-0609-5
- Kumar, G., Sivagurunathan, P., Park, J.-H., Park, J.-H., Park, H.-D., Yoon, J.-J. & Kim, S.-H. (2016). *HRT dependent performance and bacterial community population of granular hydrogen-producing mixed cultures fed with galactose*. *Bioresource Technology*. 206:188–194. doi:10.1016/j.biortech.2016.01.104
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. (2012). *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments*. *Journal of visualized experiments*. 62:3923. doi:10.3791/3923
- Li, H., Mei, X., Liu, B., Li, Z., Wang, B., Ren, N. & Xing, D. (2019). *Insights on acetate-ethanol fermentation by hydrogen-producing *Ethanoligenens* under acetic acid accumulation based on quantitative proteomics*. *Environment International*. 129:1–9. doi:10.1016/j.envint.2019.05.013
- Li, X., Guo, L., Liu, Y., Wang, Y., She, Z., Gao, M. & Zhao, Y. (2020). *Effect of salinity and pH on dark fermentation with thermophilic bacteria pretreated swine wastewater*. *Journal of Environmental Management*. 271:111023. doi:10.1016/j.jenvman.2020.111023
- Lo, Y.-C., Chen, W.-M., Hung, C.-H., Chen, S.-D., & Chang, J.-S. (2008). *Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies*. *Water Research*, 42(4-5), 827–842. doi:10.1016/j.watres.2007.08.023
- Logan, B. E., Call, D., Cheng, S., Hamelers, H. V. M., Sleutels, T. H. J. A., Jeremiase, A. W. & Rozendal, R. A. (2008). *Microbial electrolysis cells for high yield hydrogen gas production from organic matter*. *Environmental Science & Technology*. 42(23):8630–8640. doi:10.1021/es801553z
- López-López, A., Dávila-Vázquez, G., León-Becerril, E., Villegas, E. & Gallardo-Vázquez, J. (2010). *Tequila Vinasses: Generation and full scale treatment processes*. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 9:109-116 doi:10.1007/s11157-010-9204-9
- Luo, G., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q. & Angelidaki, I. (2011). *Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: Homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production*. *Biotechnology and Bioengineering*. 108(8):1816–1827. doi:10.1002/bit.23122
- Maintinguer, S. I., Fernandes, B. S., Duarte, I. C. S., Saavedra, N. K., Adorno, M. A. T. & Varesche, M. B. A. (2011). *Fermentative hydrogen production with xylose by *Clostridium* and *Klebsiella* species in anaerobic batch reactors*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 36(21):13508–13517. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.07.095
- Marino-Marmolejo, E. N., Corbalá-Robles, L., Cortez-Aguilar, R. C., Contreras-Ramos, S. M., Bolaños-Rosales, R. E., & Davila-Vazquez, G. (2015). *Tequila vinasses acidogenesis in a UASB reactor with *Clostridium* predominance*. *SpringerPlus*. 4(1). doi:10.1186/s40064-015-1193-2

- Mignard, S. & Flandrois, J. P. (2006). *16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment*. *Journal of Microbiological Methods*. 67(3):574–581. doi:10.1016/j.mimet.2006.05.009
- Moraes, B., Zaiat, M. & Bonomi, A. (2015). *Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 44:888-903. doi: 10.1016/j.rser.2015.01.023
- Niño-Navarro, C., Chairez, I., Christen, P., Canul-Chan, M. & García-Peña, E. I. (2019). *Enhanced hydrogen production by a sequential dark and photo fermentation process: Effects of initial feedstock composition, dilution and microbial population*. *Renewable Energy*. 147:924-936. doi:10.1016/j.renene.2019.09.024
- Noike, T. (2002). *Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(11-12):1367–1371. doi:10.1016/s0360-3199(02)00120-9
- Ntaikou, I., Gavala, H. N., Kornaros, M. & Lyberatos, G. (2008). *Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using Ruminococcus albus*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 33(4):1153–1163. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.10.053
- Philippe, D. & Conklin, D. (2010). *NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids*. *Journal of visualized experiments*. 45:2565. doi:10.3791/2565
- Preethi, Mohamed, T. M., Rajesh, J., Gunasekaran, M. & Gopalakrishnan, K. (2019). *Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview*. *Bioresource Technology Reports*, 7:100287. doi: 10.1016/j.biteb.2019.100287.
- Pugazhendhi, A., Kumar, G. & Sivagurunathan, P. (2019). *Microbiome involved in anaerobic hydrogen producing granules: A mini review*. *Biotechnology Reports*. 21:e00301. doi:10.1016/j.btre.2018.e00301
- Qin, Y., Yin, X., Xu, X., Yan, X., Bi, F. & Wu, W. (2020). *Specific surface area and electron donating capacity determine biochar's role in methane production during anaerobic digestion*. *Bioresource Technology*. 122919. doi:10.1016/j.biortech.2020.122919
- Rajin, M. (2018). *A current review on the application of enzymes in anaerobic digestion*. *Anaerobic Digestion Processes*. *Green Energy and Technology*. Springer, Singapore. 55-70. doi: 10.1007/978-981-10-8129-3_5
- Ramírez, G. A., Graham, D. & D'Hondt, S. (2018). *Influence of commercial DNA extraction kit choice on prokaryotic community metrics in marine sediment*. *Limnology and Oceanography: Methods*. 16(9):525-536. doi:10.1002/lom3.10264
- Ren, N., Cao, G., Wang, A., Lee, D., Guo, W., & Zhu, Y. (2008). *Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum W16*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6124–6132. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.107

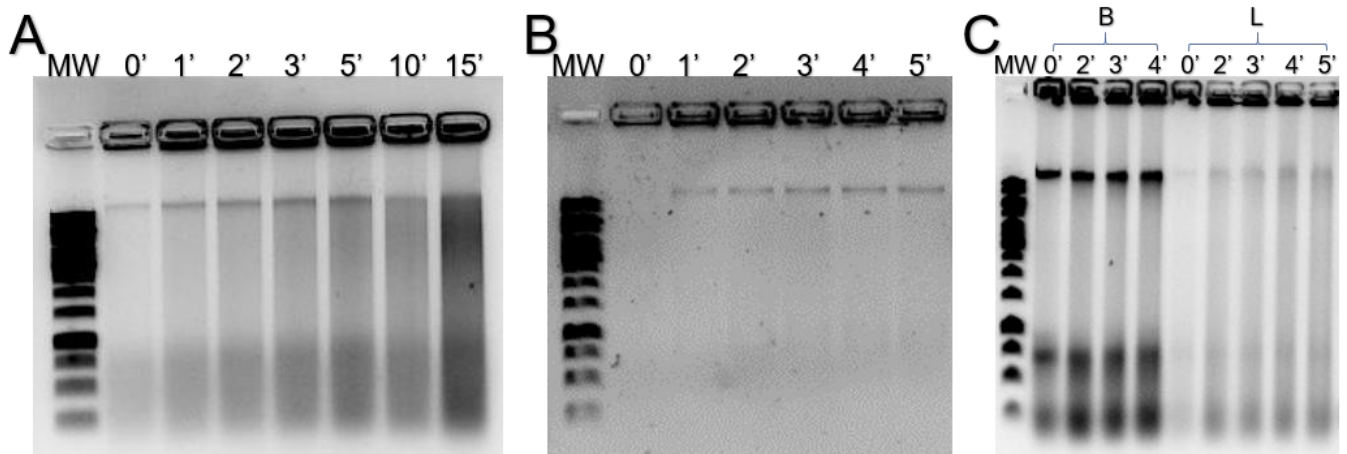
- Ren, N., Guo, W., Wang, X., Xiang, W., Liu, B., Wang, X., Ding, J. & Chen, Z. (2008). *Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production*. International Journal of Hydrogen Energy. 33(16):4318–4324. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.06.003
- Rittmann, S. & Herwig, C. (2012). *A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production*. Microbial Cell Factories. 11(1):115. doi:10.1186/1475-2859-11-115
- Rivera-Tostado, A. (2018). *Efecto del proceso de producción de tequila sobre las características fisicoquímicas y el potencial productor de hidrógeno de las vinazas tequileras (Tesis de licenciatura)*. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. (2016). *VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics*. PeerJ. 4:2584. doi:10.7717/peerj.2584
- Romero-Aguilar, M. A., Fdez-Güelfo, L. A., Álvarez-Gallego, C. J. & Romero García, L. I. (2013). *Effect of HRT on hydrogen production and organic matter solubilization in acidogenic anaerobic digestion of OFMSW*. Chemical Engineering Journal. 219:443–449. doi:10.1016/j.cej.2012.12.090
- Rusten, B., Eikebrokk, B., Ulgenes, Y. & Lygren, E. (2006). *Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors*. Aquacultural Engineering. 34(3):322-331. doi:10.1016/j.aquaeng.2005.04.002
- Secretaría de Energía (SENER). (s.f.). *Sistema de información energética*. Accesado en enero 13 de 2021 <http://sie.energia.gob.mx/>
- Shah, N., Tang, H., Doak, T. G. & Ye, Y. (2010). *Comparing bacterial communities inferred from 16s rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics*. Biocomputing. 2011:165–176. doi:10.1142/9789814335058_0018
- Si, B., Li, J., Li, B., Zhu, Z., Shen, R., Zhang, Y., & Liu, Z. (2015). *The role of hydraulic retention time on controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR)*. International Journal of Hydrogen Energy, 40(35), 11414–11421. doi:10.1016/j.ijhydene.2015.04.035
- SILVA database. 2019. Max Planck Institute for Marine Microbiology and Jacobs University, Bremen, Germany. Accesible en: <https://www.arb-silva.de/>
- Silva, A. J., Hirasawa, J. S., Varesche, M. B., Foresti, E. & Zaiat, M. (2006). *Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea*. Anaerobe. 12(2):93–98. doi:10.1016/j.anaerobe.2005.12.003
- Toledo-Cervantes, A., Guevara-Santos, N., Arreola-Vargas, J., Snell-Castro, R. & Méndez-Acosta, H. O. (2018). *Performance and microbial dynamics in packed-bed reactors during the long-term two-stage anaerobic treatment of tequila vinasses*. Biochemical Engineering Journal. 138:12–20. doi:10.1016/j.bej.2018.06.020

- Toledo-Cervantes, A., Villafán-Carranza, F., Arreola-Vargas, J., Razo-Flores, E. & Méndez-Acosta, H. O. (2020). *Comparative evaluation of the mesophilic and thermophilic biohydrogen production at optimized conditions using tequila vinasses as substrate*. International Journal of Hydrogen Energy. 45(19):11000-11010. doi:10.1016/j.ijhydene.2020.02.051
- Tung, N.-H., Aboudharam, G. & Drancourt, M. (2012). *Heat degradation of eukaryotic and bacterial DNA: an experimental model for paleomicrobiology*. BMC Research Notes. 5(1):528. doi:10.1186/1756-0500-5-528
- Wang, H., Li, J., Zhao, Y., Xu, C., Zhang, K., Li, J., Yan, L., Gu, J.-D., Wei, D. & Wang, W. (2020). *Establishing practical strategies to run high loading corn stover anaerobic digestion: Methane production performance and microbial responses*. Bioresource Technology. 310:123364. doi:10.1016/j.biortech.2020.123364
- Wang, J. & Wan, W. (2008). *Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge*. International Journal of Hydrogen Energy. 33(12):2934–2941. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.03.048
- Wu, Y., Cai, P., Jing, X., Niu, X., Ji, D., Ashry, N. M., Gao, C. & Huang, Q. (2019). *Soil biofilm formation enhances microbial community diversity and metabolic activity*. Environment International. 132:105116. doi:10.1016/j.envint.2019.105116
- Xiao, Y., Zhang, X., Zhu, M. & Tan, W. (2013). *Effect of the culture media optimization, pH and temperature on the biohydrogen production and the hydrogenase activities by Klebsiella pneumoniae ECU-15*. Bioresource Technology. 137:9–17. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.109
- Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J., & Benemann, J. (2007). *Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities*. International Journal of Hydrogen Energy. 32(18):4761–4771. doi:10.1016/j.ijhydene.2007.07.038
- Yang, S., Gao, X., Meng, J., Zhang, A., Zhou, Y., Long, M., Li, B., Deng, Q., Jin, L., Zhao, S., Wu, D., He, Y., Li, C., Liu, S., Huand, Y., Zhang, H. & Zou, L. (2018). *Metagenomic analysis of bacteria, fungi, bacteriophages, and helminths in the gut of giant pandas*. Frontiers in Microbiology. 9:1717. doi:10.3389/fmicb.2018.01717
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W. & Glöckner, F. O. (2014). *The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks*. Nucleic Acids Research. 42(D1):D643–D648. doi:10.1093/nar/gkt1209
- Yin, Y., Hu, J. & Wang, J. (2014). *Enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge by different pretreatment methods*. International Journal of Hydrogen Energy. 39(25):13550–13556. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.01.145
- Yun, J., Lee, S. D. & Cho, K.-S. (2016). *Biomethane production and microbial community response according to influent concentration of molasses wastewater in a UASB reactor*. Applied Microbiology and Biotechnology. 100(10):4675–4683. doi:10.1007/s00253-016-7314-1

- Zhu, H. & Beland, M. (2006). *Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge*. International Journal of Hydrogen Energy. 31(14):1980–1988. doi:10.1016/j.ijhydene.2006.01.019

XII. Anexos

A. Electrogramas de estandarización de tiempos de lisis celular



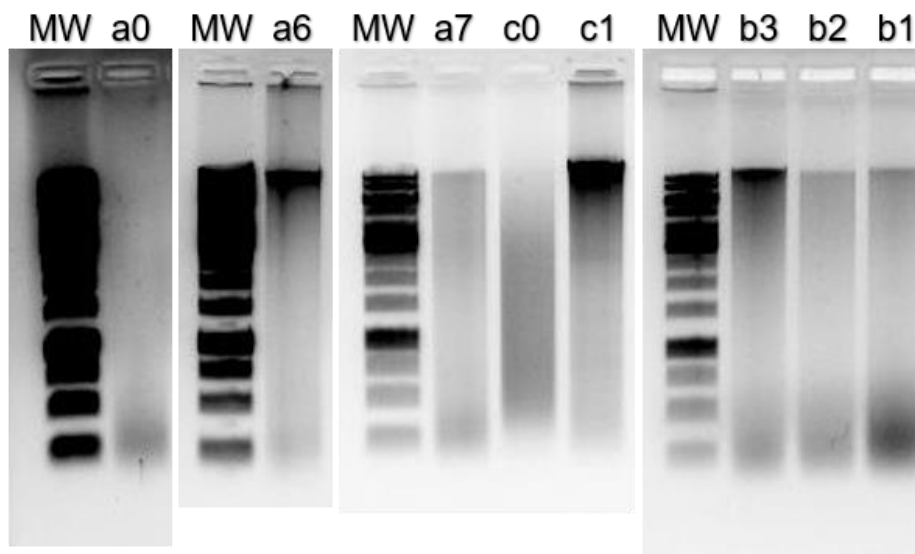
Estandarización de tiempos de vórtex de (A) inóculo seco, (B) biopelícula y (C) biomasa planctónica del AMBBR (señalado como "B") y LAG ("L"). MW= Marcador de tamaño molecular de 1 kbp.

B. Muestras biológicas tomadas

Tiempo (d)				Muestra				Tiempo (d)				Muestra			
1	B1	L1	-					48	-	-	C3				
5	B2	L2	-					50	B15	L15	-				
8	B3	L3	-					54	B16	L16	-				
12	B4	L4	-					57	B17	L17	-				
15	B5	L5	-					61	B18	L18	-				
19	B6	L6	-					62	-	-	C4				
20	-	-	C1					64	B19	L19	-				
22	B7	L7	-					68	B20	L20	-				
26	B8	L8	-					71	B21	L21	-				
29	B9	L9	-					75	B22	L22	-				
33	B10	L10	-					76	-	-	C5				
34	-	-	C2					78	B23	L23	-				
36	B11	L11	-					82	B24	L24	-				
40	B12	L12	-					85	B25	L25	-				
43	B13	L13	-					89	B26	L26	-				
47	B14	L14	-					90	-	-	C6				

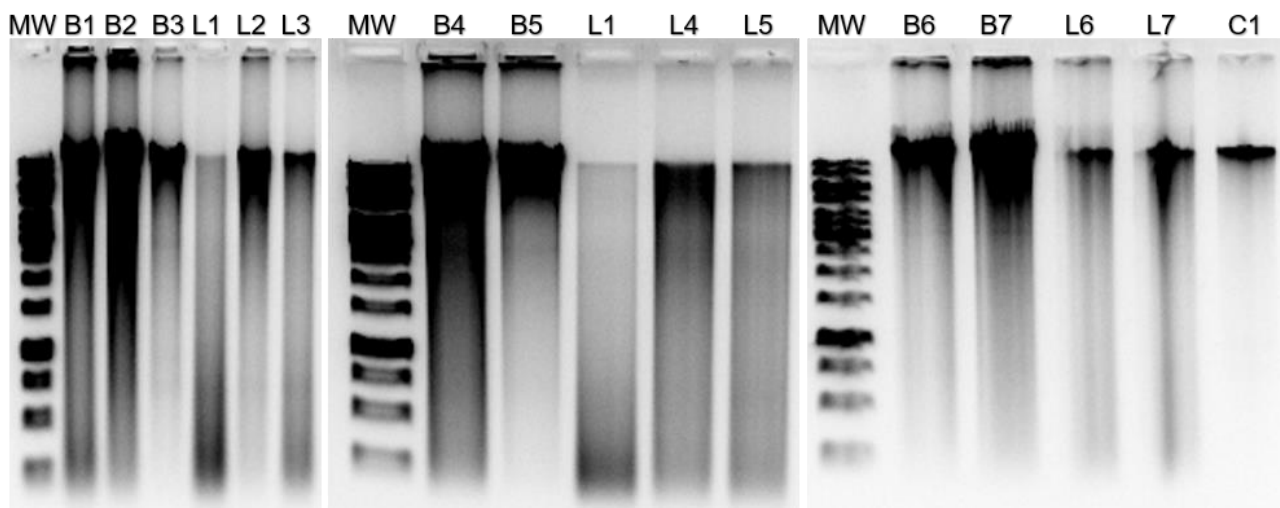
C. Electrogramas de ADN extraído de muestras biológicas

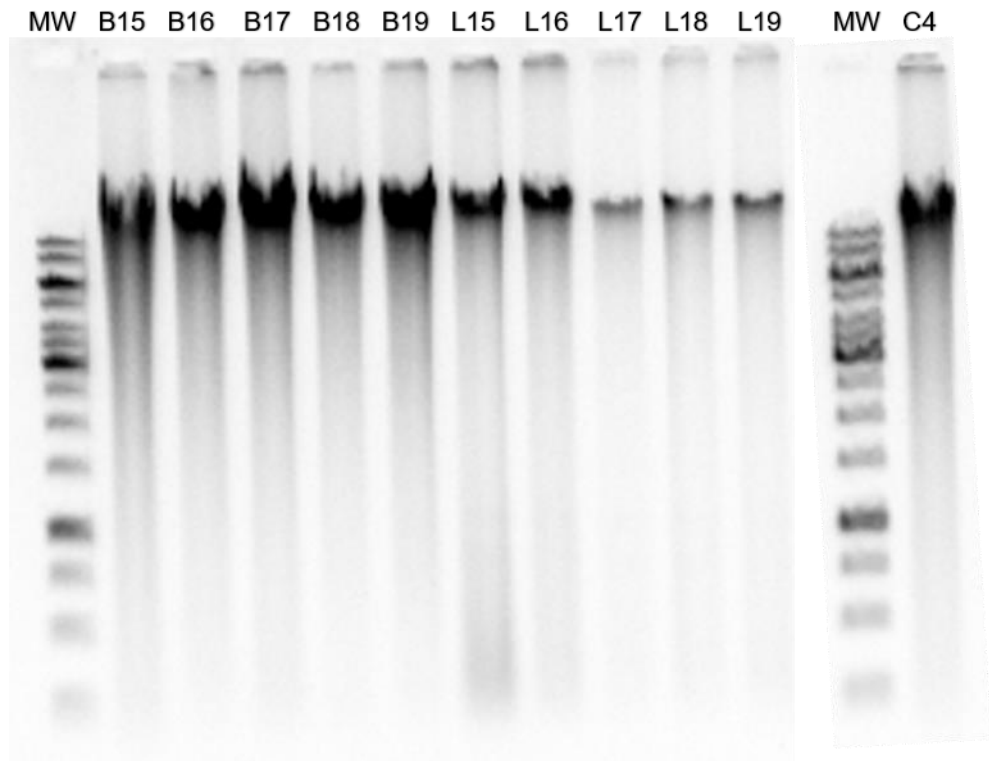
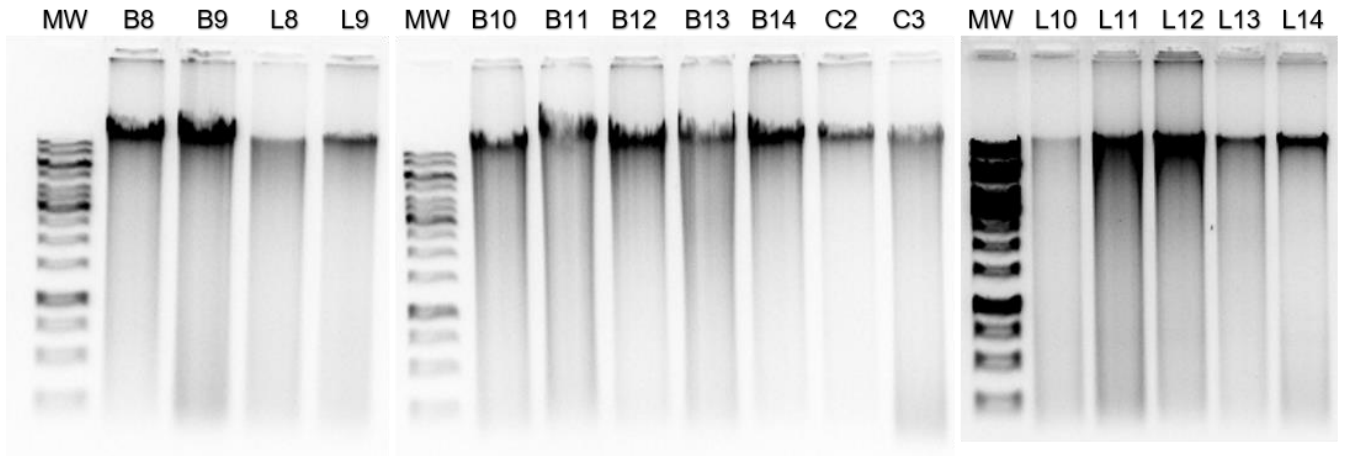
Lote:

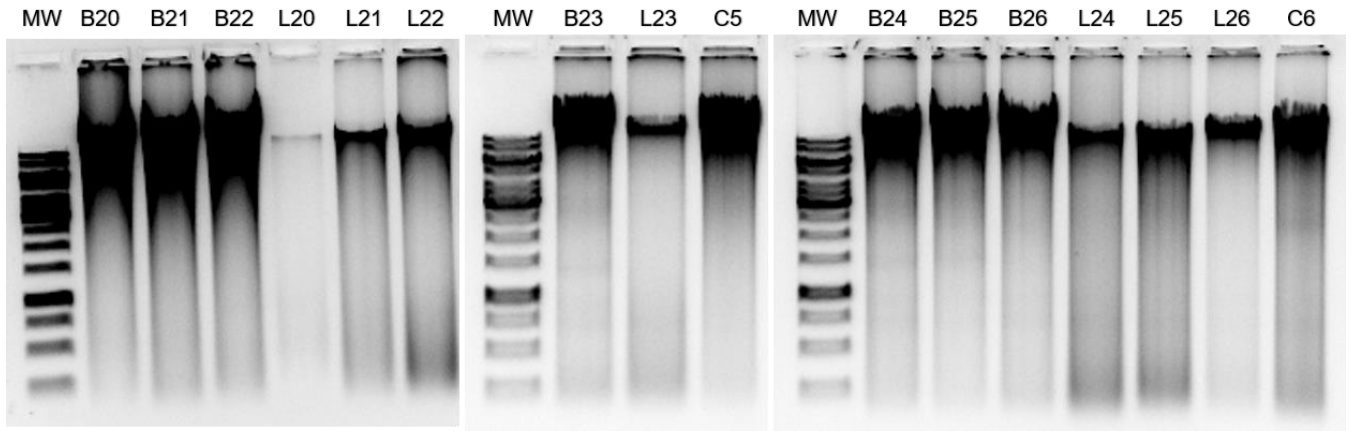


Muestras del reactor en lote. MW= Marcador de tamaño molecular de 1 kbp.

Continuo:







Muestras del reactor en continuo. MW= Marcador de tamaño molecular de 1 kbp.

Nota: Algunas imágenes se cambiaron de tamaño, pero se mantuvo la proporción ancho:largo.

D. Manual práctico de uso de vsearch en Linux

Como ejemplo, procesando muestras tipo C:

```
$ mkdir /home/user/secuencias_C ###haciendo directorio de trabajo
$ cd /home/user/secuencias_C ##moviendonos al directorio de trabajo
$ mkdir OTU secuencias_brutas basic_stats ##subdirectorios, en secuencias_brutas
se pegan todas las secuencias a trabajar!
$ cd /home/user/secuencias_C/OTU
$ ln -s /home/user/secuencias_brutas/* .
$ ls *_1.fq | sed 's/_1.fq//g' > nombres.file ##para hacer un archivo con el nombre de
todas las muestras y depende del nombre que tengan. Nota: Quedan en orden 1 10
11 (...) 19 2 20 21 (...) 3 4 (...)
$ for n in $(cat nombres.file); do (mkdir $n); done ##creando carpetas para cada
muestra
$ for n in $(cat nombres.file); do (mv *$n\*.fq* $n); done ##moviendo ligas
simbólicas de forward, reverse a cada carpeta correspondiente. IMPORTANTE que
sea la liga completa
$ for n in $(cat nombres.file); do (cd $n && flash -r 250 -f 450 -s 50 -t 1 -o flash_out
*_1.fq* *_2.fq* > flash.log); done ##para reconstruir los amplicones; -r es el
tamaño de la secuencia, -f es el tamaño del amplicón esperado aproximado, -s es
SD.
$ for n in $(cat nombres.file); do (cd $n && echo $n && grep 'Percent combined:'
flash.log); done ##loop para ver porcentaje de secuencias solapadas correctamente
$ for n in $(cat nombres.file); do (cd $n && awk 'NR%4==1{gsub("@",">"); print}
NR%4==2{print}' flash_out.extendedFragments.fastq > flash_out.extendedFragments.fasta);
done ##para poder trabajar con archivos .fasta y no .fastq!
$ cd ../ && mkdir dereplicate non_chim cluster ##carpetas para desreplicar,
eliminación de quimeras y clusterizar
$ cd dereplicate/ && mv /home/user/secuencias_C/OTU/nombres.file . ##para mover
nombres.file en /dereplicate/
$ for n in $(cat nombres.file); do (ln -s
/home/user/secuencias_C/OTU/$n/flash_out.extendedFragments.fasta $n); done ##liga
simbólica para trabajar
```

```

$ for n in $(cat nombres.file); do
(/home/scripts_metagen/modifHeaderSimpleSample.pl $n); done ##genera
mod_muestra para poder trabajar

$ For n in $(cat nombres.file); do (vsearch —derep_fulllength mod_$n —output
$n\_derep —sizeout —strand both —threads 2); done ##desreplcando las
secuencias al 100% de identidad

$ for n in $(cat nombres.file); do (vsearch —uchime_denovo $n\_derep —nonchimeras
$n\_derep_nonchim.fasta —threads 2); done ##eliminando chimeras

$ for n in $(cat nombres.file); do (cat $n\_derep_nonchim.fasta >> nonchim_all.fasta);
done ##concatenando secuencias no químéricas en orden de acuerdo a
nombres.file

$ cp nonchim_all.fasta ../cluster/

$ cd ../cluster

$ vsearch —cluster_fast nonchim_all.fasta —id 0.97 —centroids representative.fasta
—sizein —sizeout —strand both —threads 4 —otutabout otu_table.txt
##clusterizando con un 97% de identidad

$ /home/scripts_metagen/singletones_filter.pl otu_table.txt ##eliminando
singletones

$ vsearch —usearch_global representative.fasta —threads 4 —db
/home/base_de_datos/SILVA138SSURef_V3V4s.fasta —id 0.75 —userout file.blast
—userfields query+target+id —log file.classify.log ##contrastando contra base de
datos, SILVA 2020

$ /home/scripts_metagen/annot_transfer.pl file.blast filtered_otu_table.txt ##para
generar archivo de abundancias en tabla filtered_otu_table

$ /home/scripts_metagen/duplicates_cleaning.pl abundance_matrix.txt ##para limpiar
tabla de abundancias, genera clean abundance matrix

$ wc -l clean_abundance_matrix.txt ##para ver número de columnas (OTUs); lista
ordenada gracias a la limpieza (ojo:muestras no ordenadas, solo ordenados los
OTUs). Se puede usar head clean_abundance_matrix.txt para ver los primeros OTUs
también

$ cat clean_abundance_matrix.txt | sed 's/_ / /g; s/#OTU
ID/Kingdom;Phylum;Class;Order;Family;Genus;Species/' > MatrixfixedC.txt
##modificando los encabezados para facilitar procesamiento en MatLab

## NOTA IMPORTANTE! Además de lo anterior, usualmente se tiene que modificar
manualmente el primer y último OTU, llenando de Unknown2 los campos a los

```

niveles taxonómicos vacíos para que se pueda importar de manera correcta en MatLab.

Para generar archivos Krona

```
$ /home/scripts_metagen/run_krona.pl clean_abundance_matrix.txt ##para archivos .input
```

```
$ $ ktlImportText C1.input,C1 C2.input,C2 (.....) C5.input,C5 -o KronaC.html ##poniendo todos los archivos .input de las muestras y generando visualizable
```

E. Scripts de MatLab empleados

Para procesar los datos de la matriz de OTUs, como ejemplo las muestras tipo L.

%% Script para el análisis bioinformático de abundancias de las muestras
% de corridas en continuo, muestras tipo L (ADN extraído de muestras de LAG
UASB).

%Jesús Roberto Muñoz Estrada

```
tic
disp('LOADING DATA') %cargando la información de tabla
nombredetabla='MatrixfixedL.txt'; %nombre del archivo de matriz de OTUs a trabajar
data1=datastore(nombredetabla,'Delimiter',{'\t',';'},'NumHeaderLines',0); %los
delimitadores son tabs y ;
data=read(data1);
aa={'Domain','Phylum','Class','Order','Family','Genus','Species'};
bb=data.Properties.VariableNames(8:end); %muestras en el orden en el que venían
en tabla
cc=[aa,bb];
data.Properties.VariableNames=cc;
[nfilas,ncolumnas]=size(data);
nmuestras=ncolumnas-7; %7 es por los niveles taxonómicos
data2=data; %backup
disp('DATA LOADED')
toc
disp('FIXING DATA')
tic
for idx=1:nfilas %índice para indicar la fila
    ultimaNONAN=find(isnan(data{idx,8:ncolumnas})==0,1,'last');
    cuantosNaN=nmuestras-ultimaNONAN;
    if ultimaNONAN<nmuestras
        for idxc=ncolumnas:-1:8 %índice para indicar la columna
            if isnumeric(data{idx,idxc-cuantosNaN})==1
                data{idx,idxc}=data{idx,idxc-cuantosNaN}; %desplazando valores
            else
                data{idx,idxc}=str2num(char(data{idx,idxc-cuantosNaN}));
            end
        end
    end
    for idxc1=7:-1:8-cuantosNaN
        data(idx,idxc1)={'Unknown2'}; %Asignando el valor de Unknown2;
        %significará que ese taxón no fue asignado tras la asignación por blast
    end
end
```



```

end
data2=data;
bbnum = cellfun(@(x)sscanf(x,'L%d'), bb); %para obtener el orden correcto de las
muestras. L es del tipo de muestra
[~,corregirnumeracion] = sort(bbnum);
bb = bb(corregirnumeracion);
cc=[aa,bb];

for o=1:1:length(cc)
    for remp=find((strcmp(data.Properties.VariableNames,cc(o))==1)==1)
        if (strcmp(data2.Properties.VariableNames(o),cc(o)))==0
            data(:,o)=data2(:,remp); %corrigiendo los valores de la tabla en el orden
correcto
        end
    end
end %en vez de este loop se puede emplear la opción movevars...

```

```

compare=(strcmp(data.Properties.VariableNames,cc)==0);
data.Properties.VariableNames(compare)=cc(compare); %corrigiendo nombres de
variables en tabla
disp('DATA FIXED')
toc
tic
disp('EXTRACTING DATA')
data2=data; %backup
datataxa=data(:,1:7); %extrayendo taxones
datos=data2(:,end-nmuestras+1:end); %extrayendo abundancias
datosm=datos{:,,:};
datosm=cell2mat(num2cell(datosm));
data2=data2((sum(datosm==0,2)<nmuestras),:);
datos2=datos((sum(datosm==0,2)<nmuestras),:);
datosm=datos2{:,,:};
datataxa2=data2(:,1:7);
disp('DATA EXTRACTED')
toc
tic
disp('ANALYZING DATA AND GENERATING GRAPHICS...')
Domain=(data2.Domain); Phylum=(data2.Phylum); Class=(data2.Class);
Order=(data2.Order); Family=(data2.Family); Genus=(data2.Genus);
Species=(data2.Species);
taxones=[Domain,Phylum,Class,Order,Family,Genus,Species];
catDom=categories(categorical(Domain));catPhy=categories(categorical(Phylum));
catCla=categories(categorical(Class)); catOrd=categories(categorical(Order));
catFam=categories(categorical(Family)); catGen=categories(categorical(Genus));
catSpe=categories(categorical(Species));

```

```
set(0,'DefaultAxesColorOrder',linspecer(10)); %linspecer es una función aparte para
el color de las gráficas
%% generando los gráficos
%el corte tiene que ser el adecuado para que muestre bien los elementos en
%pantalla
[Genusdata,Genusmuestra,Genustabla]=barbiodiverscorte(2,bb,datosm,Genus,3.5,2,
0); %extrayendo los datos a nivel de género, a un corte de 3.5%
[Phylumdata,Phylummuestra,Phylumtabla]=barbiodiverscorte(2,bb,datosm,Phylum,0.
3,3,0); %extrayendo los datos a nivel de filo, a un corte de 0.3%
toc
```

Scripts auxiliares.

```
##barbiodiverscorte
```

```
function
```

```
[output1,output2,tabla]=barbiodiverscorte(aux2,nmuestras,matrizdatos,taxon,corte,nn  
fig,cutoff)
```

```
%aux: 1, solo una muestra, que se grafiquen datos porcentuales
```

```
% 2, varias muestras, graficar porcentuales
```

```
% 3, una muestras, graficar datos absolutos
```

```
% 4, varias muestras graficar datos absolutos
```

```
%nmuestras=vector de nombre de muestras debe ser categorical
```

```
%categorias=vector que contiene los datos categÃ³ricos
```

```
%matrizdatos=matriz o vector con todos los datos
```

```
%taxon=el vector que da la taxa, no debe ser categorico.
```

```
% nfig=el nÃºmero de figura en la que se graficarÃ¡
```

```
taxon=strrep(taxon,'_','\_')
```

```
if nargin==6
```

```
    cutoff=0;
```

```
end
```

```
sumadematriz=sum(matrizdatos);
```

```
matrizporcentual=matrizdatos*100./sumadematriz;
```

```
aux=aux2;
```

```
if aux2==3
```

```
    aux=1;
```

```
end
```

```
if aux2==4
```

```
    aux=2;
```

```
end
```

```
if aux==1
```

```
%haciendo el corte
```

```
matrizporcentualcortada=matrizporcentual(matrizporcentual<corte);
```

```
matrizdatoscortada=matrizdatos(matrizporcentual<corte);
```

```
residual=100-sum(matrizporcentualcortada);
```

```
taxon=taxon(matrizporcentual<corte);
```

```
    taxon=categorical(taxon);
```

```
taxon(:,end+1)='Other';
```

```
categorias=categories(taxon);
```

```
matrizporcentualcortada=[matrizporcentualcortada;residual];
```

```
matrizdatoscortada=[matrizdatoscortada;sum(matrizdatos)-sum(matrizdatoscortada)];
```

```

columnas=length(categorias);
output=zeros(columnas,1); outputx=zeros(columnas,1);
for ix=1:columnas
output(ix)=sum(matrizporcentualcortada(taxon==categorias(ix)));
outputx(ix)=sum(matrizdatos cortada(taxon==categorias(ix)));
end
figure(nnfig)
if aux2==1
    output=output'; [filas1,~]=size(output);
bar([output,output'],'stacked');
axis=gca;
ax.YLim=[0 100]; %100 es el total de la abundancia relativa
axis.XTickLabel=nmuestras;
ll=legend(categorias,'Location','northeastoutside');
output1=output; outputx=outputx';
elseif aux==3
    bar([outputx,zeros(columnas,1)]','stacked');
    axis=gca;
axis.XTickLabel=nmuestras;
ll=legend(categorias,'Location','northeastoutside');
output1=outputx;
end

else
    [~,ncolum]=size(matrizdatos);

matrizporcentualcortada=matrizporcentual(sum(matrizporcentual<corte,2)<ncolum,:);
matrizdatos cortada=matrizdatos(sum(matrizporcentual<corte,2)<ncolum,:);
residual=100-sum(matrizporcentualcortada);
taxon=taxon(sum(matrizporcentual<corte,2)<ncolum);
taxon=categorical(taxon);
taxon(end+1)='Others';
categorias=categories(taxon);
matrizporcentualcortada=[matrizporcentualcortada;residual];
matrizdatos cortada=[matrizdatos cortada;(sum(matrizdatos)-
sum(matrizdatos cortada))];
filas=length(categorias); output=zeros(filas,ncolum);outputx=zeros(filas,ncolum);
for idxcol=1:ncolum
    for idxfil=1:filas
output(idxfil,idxcol)=sum(matrizporcentualcortada(taxon==categorias(idxfil),idxcol));
outputx(idxfil,idxcol)=sum(matrizdatos cortada(taxon==categorias(idxfil),idxcol));
    end
end
end
output=output'; outputx=outputx';
figure(nnfig)

```

```

if aux2==2
bar(output(:,1:end-cutoff),'stacked');
axis=gca;
axis.XTickLabel=nmuestras;
ll=legend(categorias,'Location','northeastoutside');
output1=output';
end
if aux2==4
bar(outputx(:,1:end-cutoff),'stacked');
axis=gca;
axis.XTickLabel=nmuestras;
ll=legend(categorias,'Location','northeastoutside');
output1=outputx';
end
ax=gca;
ax.XTick=[1:1:length(nmuestras)];
ax.TickDir='out';
ax.FontSize=9;
ax.Legend.Box='off';
xlength=length(nmuestras)+0.5;
ax.XLim=[0.5 xlength];
ax.YLim=[0 100];
ylabel('\bf Relative Abundance (%)')
xlabel('\bf Sample ID')
output2=categorias;
tablaA=table(output2);
tabla=[tablaA,array2table(output1)];
ll.FontName='TimesNewRoman';
ll.FontAngle='italic';
labels = get(legend(), 'String');
numlabels=length(labels):-1:1;
plots = flipud(get(gca, 'children'));
legend(plots(numlabels), labels(numlabels));
end

```

##Linspecer, obtenido de:

<https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/42673-beautiful-and-distinguishable-line-colors-colormap>

```
function lineStyles=linspecer(N,varargin)
if nargin==0 % return a colormap
    lineStyles = linspecer(128);
    return;
end
if ischar(N)
    lineStyles = linspecer(128,N);
    return;
end
if N<=0 % its empty, nothing else to do here
    lineStyles=[];
    return;
end
% interperet varargin
qualFlag = 0;
colorblindFlag = 0;
if ~isempty(varargin)>0 % you set a parameter?
    switch lower(varargin{1})
        case {'qualitative','qua'}
            if N>12 % go home, you just can't get this.
                warning('qualitative is not possible for greater than 12 items, please reconsider');
            else
                if N>9
                    warning(['Default may be nicer for ' num2str(N) ' for clearer colors use: whitebg("black"); ']);
                end
            end
        case {'sequential','seq'}
            lineStyles = colorm(N);
            return;
        case {'white','whitefade'}
            lineStyles = whiteFade(N);return;
        case 'red'
            lineStyles = whiteFade(N,'red');return;
        case 'blue'
            lineStyles = whiteFade(N,'blue');return;
        case 'green'
            lineStyles = whiteFade(N,'green');return;
    end
end
qualFlag = 1;
```

```

    case {'gray','grey'}
        lineStyles = whiteFade(N,'gray');return;
    case {'colorblind'}
        colorblindFlag = 1;
    otherwise
        warning(['parameter "' varargin{1} '" not recognized']);
end
end
% *.95
% predefine some colormaps
set3 = colorBrew2mat({[141, 211, 199];[ 255, 237, 111];[ 190, 186, 218];[ 251, 128,
114];[ 128, 177, 211];[ 253, 180, 98];[ 179, 222, 105];[ 188, 128, 189];[ 217, 217,
217];[ 204, 235, 197];[ 252, 205, 229];[ 255, 255, 179]}' );
set1JL = brighten(colorBrew2mat({[228, 26, 28];[ 55, 126, 184]; [ 77, 175, 74];[ 255,
127, 0];[ 255, 237, 111]*.85;[ 166, 86, 40];[ 247, 129, 191];[ 153, 153, 153];[ 152, 78,
163]}' ));
set1 = brighten(colorBrew2mat({[ 55, 126, 184]*.85;[228, 26, 28];[ 77, 175, 74];[ 255,
127, 0];[ 152, 78, 163]}),.8);
% colorblindSet = {[215,25,28];[253,174,97];[171,217,233];[44,123,182]};
colorblindSet = {[215,25,28];[253,174,97];[171,217,233]*.8;[44,123,182]*.8};
set3 = dim(set3,.93);
if colorblindFlag
    switch N
        % sorry about this line folks. kind of legacy here because I used to
        % use individual 1x3 cells instead of nx3 arrays
        case 4
            lineStyles = colorBrew2mat(colorblindSet);
        otherwise
            colorblindFlag = false;
            warning('sorry unsupported colorblind set for this number, using regular
types');
        end
    end
end
if ~colorblindFlag
    switch N
        case 1
            lineStyles = { [ 55, 126, 184]/255};
        case {2, 3, 4, 5 }
            lineStyles = set1(1:N);
        case {6 , 7, 8, 9}
            lineStyles = set1JL(1:N)';
        case {10, 11, 12}
            if qualFlag % force qualitative graphs
                lineStyles = set3(1:N)';
            else % 10 is a good number to start with the sequential ones.
                lineStyles = cmap2linspecer(colorm(N));
            end
        end
    end
end

```

```

        end
        otherwise % any old case where I need a quick job done.
            lineStyles = cmap2linspecer(colorm(N));
        end
    end
    lineStyles = cell2mat(lineStyles);
end
% extra functions
function varIn = colorBrew2mat(varIn)
for ii=1:length(varIn) % just divide by 255
    varIn{ii}=varIn{ii}/255;
end
end
function varIn = brighten(varIn,varargin) % increase the brightness
if isempty(varargin),
    frac = .9;
else
    frac = varargin{1};
end
for ii=1:length(varIn)
    varIn{ii}=varIn{ii}*frac+(1-frac);
end
end
function varIn = dim(varIn,f)
    for ii=1:length(varIn)
        varIn{ii} = f*varIn{ii};
    end
end
function vOut = cmap2linspecer(vIn) % changes the format from a double array to a
cell array with the right format
vOut = cell(size(vIn,1),1);
for ii=1:size(vIn,1)
    vOut{ii} = vIn(ii,:);
end
end
%%
% colorm returns a colormap which is really good for creating informative
% heatmap style figures.
% No particular color stands out and it doesn't do too badly for colorblind people
either.
% It works by interpolating the data from the
% 'spectral' setting on http://colorbrewer2.org/ set to 11 colors
% It is modified a little to make the brightest yellow a little less bright.
function cmap = colorm(varargin)
n = 100;
if ~isempty(varargin)

```



```

    n = varargin{1};
end
if n==1
    cmap = [0.2005  0.5593  0.7380];
    return;
end
if n==2
    cmap = [0.2005  0.5593  0.7380;
            0.9684  0.4799  0.2723];
    return;
end
frac=.95; % Slight modification from colorbrewer here to make the yellows in the
center just a bit darker
cmapp = [158, 1, 66; 213, 62, 79; 244, 109, 67; 253, 174, 97; 254, 224, 139; 255*frac,
255*frac, 191*frac; 230, 245, 152; 171, 221, 164; 102, 194, 165; 50, 136, 189; 94, 79,
162];
x = linspace(1,n,size(cmapp,1));
xi = 1:n;
cmap = zeros(n,3);
for ii=1:3
    cmap(:,ii) = pchip(x,cmapp(:,ii),xi);
end
cmap = flipud(cmap/255);
end
function cmap = whiteFade(varargin)
n = 100;
if nargin>0
    n = varargin{1};
end
thisColor = 'blue';
if nargin>1
    thisColor = varargin{2};
end
switch thisColor
    case {'gray','grey'}
        cmapp =
[255,255,255;240,240,240;217,217,217;189,189,189;150,150,150;115,115,115;82,82
,82;37,37,37;0,0,0];
        case 'green'
            cmapp =
[247,252,245;229,245,224;199,233,192;161,217,155;116,196,118;65,171,93;35,139,
69;0,109,44;0,68,27];
            case 'blue'
                cmapp =
[247,251,255;222,235,247;198,219,239;158,202,225;107,174,214;66,146,198;33,113
,181;8,81,156;8,48,107];

```

```

    case 'red'
        cmapp =
[255,245,240;254,224,210;252,187,161;252,146,114;251,106,74;239,59,44;203,24,2
9;165,15,21;103,0,13];
        otherwise
            warning(['sorry your color argument ' thisColor ' was not recognized']);
    end
    cmap = interpomap(n,cmapp);
end
% Eat a approximate colormap, then interpolate the rest of it up.
function cmap = interpomap(n,cmapp)
    x = linspace(1,n,size(cmapp,1));
    xi = 1:n;
    cmap = zeros(n,3);
    for ii=1:3
        cmap(:,ii) = pchip(x,cmapp(:,ii),xi);
    end
    cmap = (cmap/255); % flipud??
end

```