



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
AMBIENTAL – AGUA

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE COMUNIDADES MICROBIANAS Y SU RELACIÓN  
CON EL DESEMPEÑO DE DIGESTORES ANAEROBIOS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:  
Biól. Aída Isabel Murillo Herrera

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Julián Carrillo Reyes, Instituto de Ingeniería, UNAM

COMITÉ TUTOR  
Dra. Ana Elena Escalante Hernández, Instituto de Ecología, UNAM  
Dr. Simón González Martínez, Instituto de Ingeniería, UNAM

Ciudad de México, febrero de 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Ana Elena Escalante Hernández

Secretario: Dr. Iván Moreno Andrade

Vocal 1: Dr. Simón González Martínez

Vocal 2: Dr. Enrique A. Cantoral Uriza

Vocal 3: Dr. Julián Carrillo Reyes

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis

Laboratorio de Investigación en Procesos Avanzados de Tratamiento de Aguas  
(LIPATA).

Unidad Académica Juriquilla, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Campus Juriquilla, Blvd. Juriquilla 3001, 76230 Querétaro,  
México.

TUTOR DE TESIS:

*Julián Carrillo R*

---

Dr. Julián Carrillo Reyes

...Llámalo intuición. Hasta ahora es solo eso, pero pienso razonarlo. Un encadenamiento de válidos razonamientos solo puede llevar a la determinación de la verdad, y a eso me atenderé hasta conseguirla...

Isaac Asimov, Yo, Robot

## Agradecimientos institucionales



Se agradece el financiamiento del presente trabajo de investigación al proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IA211220 (DGAPA UNAM).

Aída Isabel Murillo Herrera agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría durante el periodo del 2020-1 al 2021-2.

Al Programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP) por el apoyo para presentar este trabajo en modalidad cartel en el World Microbe Forum 2021.

Se agradece el apoyo técnico de la Mtra. Gloria Moreno Rodríguez, al Mtro. Jaime Pérez Trevilla y al Ing. Ángel A. Hernández Huerta para la realización de esta tesis.

## Agradecimientos personales

A mis papás Ana e Isaías por su apoyo incondicional en cada una de mis decisiones, por sus palabras de aliento, por motivarme, por estar siempre presentes, y en especial por ser un gran ejemplo de perseverancia y superación. Este logro también es de ustedes.

A mis tíos y primos en Querétaro, que me ayudaron en todo momento y estuvieron al pendiente de mi.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de formarme en el camino de la ciencia, y permitirme adentrarme en el maravilloso mundo de la biología.

Al Dr. Julián por aceptar ser mi tutor, por su disposición a orientarme, resolver mis dudas y proporcionarme un espacio de aprendizaje durante todos estos meses.

A la Dra. Ana, al Dr. Simón, al Dr. Enrique y al Dr. Iván, por sus observaciones e interés en mejorar y enriquecer este trabajo.

A los profesores del posgrado de biológicas que me aceptaron como oyente, gracias por compartirme su conocimiento y amor por la ecología, y al Dr. Alex Correa por brindarme las herramientas estadísticas que necesitaba.

A todas aquellas personas que conocí durante mi estancia en Querétaro, a los compañeros de clase, los “septillizos” por esas largas tardes de estudio, a los profes del posgrado, y a los compañeros de viaje, montañas y senderos que me invitaron a conocer ese hermoso estado.

## **Tabla de contenido**

<i>Agradecimientos institucionales</i>	<b>IV</b>
<i>Agradecimientos personales</i>	<b>V</b>
<i>Índice de Figuras</i>	<b>IX</b>
<i>Índice de Tablas</i>	<b>VIII</b>
<i>Acrónimos</i>	<b>XI</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco Teórico</b>	<b>3</b>
2.1 Digestión anaerobia	3
2.1.1 Grupos tróficos	4
2.1.2 Interacciones microbianas en la DA	7
2.2 Ecología microbiana de la digestión anaerobia	9
2.2.1 Diversidad taxonómica	11
2.2.2 Métodos clásicos para medir la diversidad taxonómica	11
2.3 Parámetros fisicoquímicos que afectan la digestión anaerobia	21
2.3.1 pH	21
2.3.2 Alcalinidad	22
2.3.3 Tiempo de retención hidráulico (TRH)	23
2.3.4 Carga orgánica (CO)	24
2.3.5 Tipo de Sustrato	25
<b>3. Justificación</b>	<b>27</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>29</b>
<b>5. Metodología</b>	<b>30</b>
5.1 Sustratos e inóculos	30
5.1.1 Sustratos solubles	30
5.1.2 Sustratos particulados	30
5.1.3 Inóculos	32
	<b>VI</b>

5.2 Digestión anaerobia de Efluentes Vitivinícolas	33
5.2.1 Sistema en dos etapas	33
5.2.2 Sistema en una etapa	34
5.3 Digestión anaerobia de Residuos Alimenticios	35
5.4 Métodos analíticos	36
5.4.1 Análisis físico-químicos	36
5.4.2 Análisis microbiológicos	37
5.4.3 Análisis estadístico	41
<b>6. Resultados y discusiones</b>	<b>43</b>
6.1 Operación de los Reactores	43
6.1.1 Reactor Metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas	43
6.1.2 Reactor Metanogénico del sistema en una etapa de Efluentes vitivinícolas	46
6.1.3 Reactor Metanogénico del sistema de residuos alimenticios	49
6.2 Análisis microbiológicos	50
6.2.1 Comunidad microbiana del Reactor Metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas.	51
6.2.2 Comunidad microbiana del Reactor Metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas.	62
6.2.3 Comunidad microbiana del Reactor Metanogénico de Residuos alimenticios	74
6.2.4 Tendencias en la diversidad alfa de comunidades metanogénicas de la DA	83
<b>7. Conclusiones</b>	<b>88</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>90</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>109</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Energía libre de Gibbs para reacciones involucradas en la Digestión Anaerobia</i>	8
<i>Tabla 2 . Métricas de diversidad alfa aplicadas a estudios de la DA</i>	14
<i>Tabla 3. Medidas de diversidad verdadera aplicadas a comunidades microbianas de la DA</i>	19
<i>Tabla 4. Caracterización de los efluentes vitivinícolas</i>	31
<i>Tabla 5. Caracterización de los residuos alimenticios</i>	32
<i>Tabla 6. Secuencias obtenidas durante el procesamiento con DADA2</i>	50
<i>Tabla 7. Diversidad alfa del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas</i>	57
<i>Tabla 8. Diversidad alfa del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas</i>	70
<i>Tabla 9. Diversidad alfa del reactor metanogénico de residuos alimenticios</i>	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Fig. 1. Principales grupos tróficos de la DA y sus interacciones metabólicas vía transferencia directa e indirecta de electrones.</i>	4
<i>Fig. 2. Distribución de las abundancias de las especies de una comunidad.</i>	17
<i>Fig. 3. Reactor Metanogénico de efluentes vitivinícolas</i>	34
<i>Fig. 4. Reactor Metanogénico de residuos alimenticios</i>	36
<i>Fig. 5. Desempeño del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas.</i>	44
<i>Fig. 6. Asimilación del sustrato del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas.</i>	44
<i>Fig. 7. AGVs producidos con lías y vinazas durante la operación del TRH de 3 días, en el reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas.</i>	45
<i>Fig. 8. Desempeño del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas.</i>	47
<i>Fig. 9. Asimilación del sustrato del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas.</i>	47
<i>Fig. 10. AGVs producidos durante la operación con los TRH de 3, 2 y 1 día en el reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas.</i>	48
<i>Fig. 11. Desempeño del reactor metanogénico del sistema de residuos alimenticios.</i>	49
<i>Fig. 12. Curvas de rarefacción de las muestras del reactor metanogénico de efluentes vitivinícolas del sistema en dos etapas. Los números representan el día en el que se tomaron las muestras.</i>	51
<i>Fig. 13. Comunidad microbiana del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas.</i>	54
<i>Fig. 14. Diagrama de ordenación del PCoA basado en distancia Unifrac no ponderada de la comunidad microbiana del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas.</i>	56

<i>Fig. 15. Correlograma de las métricas de diversidad alfa y las condiciones de operación y variables de respuesta del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas.</i>	59
<i>Fig. 16. Modelo lineal del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas.</i>	61
<i>Fig. 17. Curvas de rarefacción de las muestras del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas.</i>	62
<i>Fig. 18. Comunidad microbiana del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas.</i>	64
<i>Fig. 19. Diagrama ordenación del Análisis de Coordinados Principales (PCoA) basado en distancia Unifrac ponderada de la comunidad microbiana durante la operación del reactor del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas.</i>	66
<i>Fig. 20. Correlograma de las métricas de diversidad alfa, condiciones de operación y variables de respuesta del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. .</i>	71
<i>Fig. 21. Modelo lineal del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas.</i>	72
<i>Fig. 22. Curvas de rarefacción de las muestras del reactor metanogénico de residuos alimenticios.</i>	74
<i>Fig. 23. Comunidad microbiana del reactor de residuos alimenticios.</i>	76
<i>Fig. 24. Diagrama ordenación del Análisis de Coordinados Principales (PCoA) basado en distancia Unifrac no ponderada de la comunidad microbiana durante la operación del reactor de residuos alimenticios.</i>	78
<i>Fig. 25. Correlograma de las métricas de diversidad alfa con las condiciones de operación y variables de repuesta del reactor de residuos alimenticios.</i>	80
<i>Fig. 26. Modelo lineal del reactor metanogénico de residuos alimenticios.</i>	81

## ACRÓNIMOS

Listado alfabético de los acrónimos y fórmulas químicas utilizadas en esta tesis.

AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
AGVs	Ácidos grasos volátiles
AIC	Akaike information criterion
ASV	Amplicon sequence variants
ASVobs	Observed amplicon sequence variants
Atm	Atmósferas
BSOA	Bacterias sintróficas oxidadoras de acetato
BSOI	Bacterias sintróficas oxidadoras de isovalerato
BSOP	Bacterias sintróficas oxidadoras de propionato
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de calcio
CH <sub>3</sub> COO <sup>-3</sup>	Acetato
CH <sub>4</sub>	Metano
CO	Carga orgánica
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
D <sub>1</sub>	Índice de Simpson
DA	Digestión Anaerobia
DQO	Demanda química de oxígeno
DQO <sub>eq</sub>	Demanda química de oxígeno equivalente
<sup>0</sup> D	Diversidad de orden q=0
<sup>1</sup> D	Diversidad de orden q=1
<sup>2</sup> D	Diversidad de orden q=2
EF	Efluente
ER	Eficiencia de remoción
H'	Índice de Shannon
H <sub>2</sub>	Hidrógeno
H <sub>2</sub> S	Sulfuro de Hidrógeno
IN	Influente
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio

NGS	Next generation sequencing
NH <sub>3</sub> -N	Amonio libre
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	Ion amonio
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCo1	Principal coordinate 1
PCo2	Principal coordinate 2
PCoA	Principal Coordinate Analysis
PERMANOVA	Permutational multivariate analysis of variance
PM	Productividad de metano
R	Software R
REN	Rendimiento de metano
SBR	Sequential batch reactor
Sobs	Observed species
SSF	Sólidos suspendidos fijos
SST	Sólidos suspendidos totales
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
Treac	Tiempo de reacción
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket
UniFrac	Unique fraction metric
VIF	Variance inflation factor

## 1. INTRODUCCIÓN

El proceso de digestión anaerobia (DA), se caracteriza por intensificar a nivel tecnológico, el proceso natural de la respiración anaerobia, que se lleva a cabo en pantanos y fondos de lagos y océanos. En este, microorganismos en ausencia de oxígeno y de otros aceptores de electrones como nitrato y sulfato (la Riviere, 2013), producen un gas inflamable conocido como metano ( $\text{CH}_4$ ) (Wolfe, 1993), que en combinación con otros gases como el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) se conocen como biogás (Jain et al., 2015).

Para la formación de biogás, se han descubierto e identificado, diversos microorganismos involucrados como las arqueas (Fontana et al., 2018), que trabajan en conjunto y de manera secuencial, con bacterias en la producción de metabolitos intermediarios, necesarios para llevar a cabo este proceso. La DA puede dividirse en distintas etapas, hidrólisis, acidogénesis o fermentación, acetogénesis y metanogénesis (Wirth et al., 2012); y se ha destacado por su potencial para ser usado en la producción de biocombustibles, para reemplazar combustibles derivados de fuentes fósiles (Enzmann et al., 2018).

Por lo tanto, existe un gran interés en el mejoramiento de la DA a nivel industrial, lo cual se ha enfocado principalmente en el monitoreo de parámetros fisicoquímicos (Mota et al., 2015; Vital-Jacome et al., 2020). Sin embargo, de manera más reciente, con la ayuda de técnicas de secuenciamiento de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) y análisis de la diversidad del gen 16S ARNr, se ha comenzado a estudiar la DA desde el punto de vista de la ecología de las comunidades microbianas, y cómo es que factores bióticos como la diversidad de microorganismos, se relacionan con la producción de biogás (Callahan et al., 2016; T. Liu et al., 2017; Liu y Whitman, 2008).

La DA tiene como ventaja adicional, el uso de residuos como sustrato, que al ser valorizados para la producción de biocombustibles, se evita su disposición, y por lo tanto la contaminación de suelos y acuíferos, además de evitar la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera (García et al., 2019). En México, los residuos agroindustriales

y urbanos, son los que presentan el mayor potencial de producción de biogás, los cuales anualmente han sido calculados en más de 14 millones de toneladas que pueden ser aprovechadas (Secretaría de energía [SENER], 2017).

Por esta razón, en este trabajo se pretende establecer la relación entre la diversidad microbiana y la funcionalidad de reactores, con respecto a variables como la productividad de metano; así como con parámetros de operación como tipo de sustrato, tiempo de retención hidráulica y carga orgánica.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia (DA) es un proceso biológico que sucede en ausencia de oxígeno, a través del cual, la materia orgánica es degradada de manera gradual en moléculas más simples (Wirth et al., 2012). Durante este proceso, es posible convertir del 40-60% de sólidos orgánicos (Guo et al., 2015) en su mayoría a gas metano ( $\text{CH}_4$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), y cantidades menores de sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), amonio ( $\text{NH}_3$ ) y otros gases, mezcla conocida como biogás (Pramanik et al., 2019).

Este proceso biológico involucra diferentes poblaciones microbianas, o grupos de individuos pertenecientes a una misma especie, las cuales pueden estar definidas ya sea por características taxonómicas y/o funcionales que interactúan entre sí (Panikov, 2010). Dichas poblaciones, llevan a cabo una serie de actividades simultáneas de manera coordinada, a través de la división de procesos metabólicos, permitiendo el desarrollo de comunidades funcionales, también llamados consorcios. Estos consorcios, requieren de interacciones que pueden ser vistas como un tipo de comunicación, mediada por el uso y excreción de metabolitos al medio, donde pueden ser asimilados o inhibir el crecimiento de los diferentes taxa que se encuentran presentes (Alvarado et al., 2014; Ben Said y Or, 2017; Escalante, et al., 2015).

Por lo tanto, el flujo de energía que se lleva a cabo entre las diferentes poblaciones, que interactúan y conforman a la comunidad en el mismo espacio-tiempo, está definido por los requerimientos energéticos, y fuentes de carbono que los microorganismos utilizan. Por lo tanto, estas poblaciones pueden ser agrupadas y/o estructuradas, de acuerdo a la similitud en el uso de los recursos disponibles en diferentes grupos tróficos (Leboffe y Pierce, 2015). Los cuales determinan la diversidad funcional de una comunidad (Halffter y Moreno, 2005; Panikov, 2010; Stroud et al., 2015) y son la base de la resiliencia ecológica (Stroud et al., 2015; Tao et al., 2020).



### 2.1.1 Grupos tróficos

En la DA, los principales grupos tróficos corresponden a bacterias hidrolíticas, acidogénicas, acetogénicas y arqueas metanogénicas acetoclásticas e hidrogenotróficas (Fig. 1). Estos grupos tróficos, a excepción de los metanógenos, suelen estar conformados por microorganismos pertenecientes a diferentes phyla bacterianos, los cuales generalmente pueden utilizar una gran variedad de sustratos, por lo que diferentes especies pueden estar involucrados en más de un nivel trófico (Almeida et al., 2011; Corrales et al., 2015; Schuchmann y Müller, 2016).

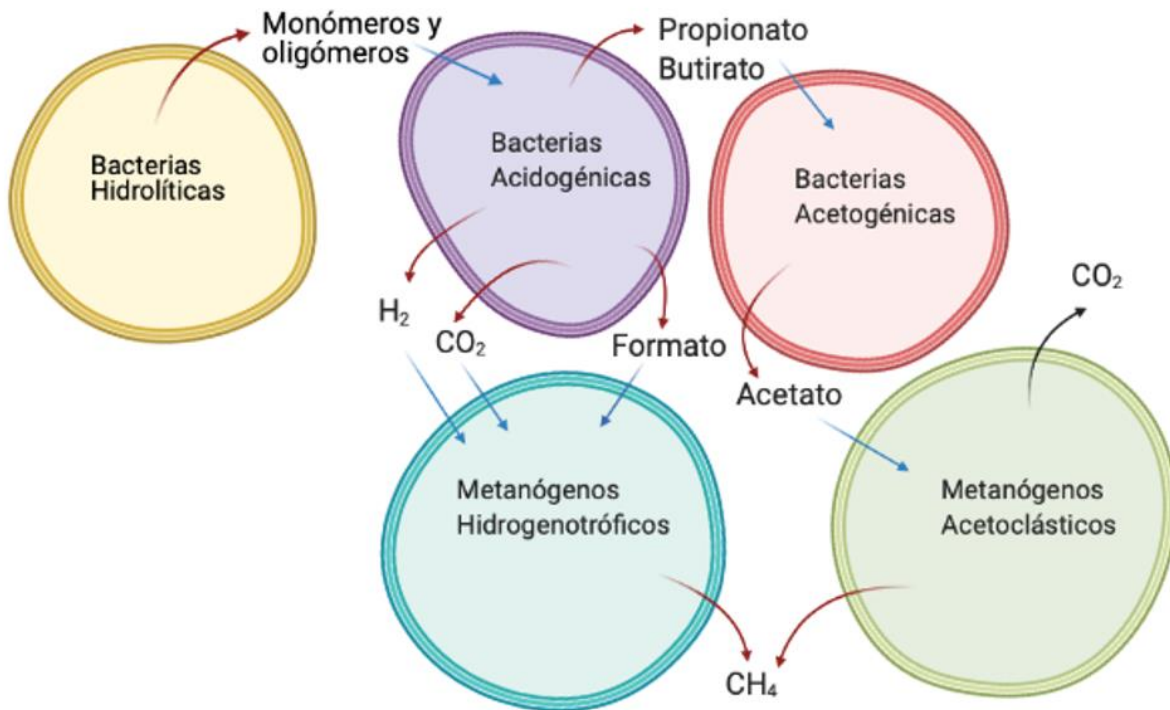


Fig. 1. Principales grupos tróficos de la DA y sus interacciones metabólicas vía transferencia directa e indirecta de electrones.

### **2.1.1.1 Hidrólisis**

Etapa inicial en la que bacterias con capacidades hidrolíticas, rompen los polímeros complejos insolubles, como carbohidratos y coloides orgánicos como proteínas y lípidos. La degradación de estas macromoléculas, se lleva a cabo mediante enzimas extracelulares producidas en el medio, hasta sus componentes monoméricos, para que estos a su vez puedan atravesar la membrana celular. Para el caso de carbohidratos complejos como celulosa y hemicelulosa, enzimas endocelulasas y exocelulasas, son las encargadas de romper los enlaces 1-4 $\beta$  glucosídicos, ya sea internos o externos de los carbohidratos, para obtener tetrámeros o dímeros.

Por último, celobiosas o  $\beta$ -glucosidasas, hidrolizan las moléculas resultantes en dos moléculas de glucosa (Almeida et al., 2011; Corrales et al., 2015). Para el caso de lípidos y compuestos proteicos, estos son degradados por lipasas y proteasas en ácidos grasos de cadena larga (AGCL) y aminoácidos, respectivamente (Alvarado et al., 2014). Algunos géneros bacterianos involucrados en esta etapa son: *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacterioides*, *Micrococcus* y *Clostridium* (Corrales et al., 2015).

### **2.1.1.2 Acidogénesis o Fermentación**

La glucosa y los aminoácidos obtenidos de la etapa anterior, son el sustrato de bacterias fermentativas, las cuales mediante rutas metabólicas como la fermentación alcohólica, heteroláctica, acetona-butanol, propiónica y ácido butírica, pueden producir alcohol, ácidos grasos volátiles (AGVs) (formato, acetato, butirato y lactato), H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Adolfo y Huertas, 2015; Almeida et al., 2011; Corrales et al., 2015; Snell-Castro et al., 2019).

En esta etapa, géneros del phylum Proteobacteria (Cai et al., 2016), Bacteriodetes y Firmicutes, son los mayores contribuyentes de los productos de la fermentación (Guo et al., 2015). De los cuales, el género *Clostridium* del phylum Firmicutes, generalmente es el que presenta la mayor abundancia relativa (Sun et al., 2016). Esto se debe a que

puede fermentar una gran variedad de fuentes de carbono (Cai et al., 2016), además el lactato posteriormente puede ser degradado en H<sub>2</sub> por este grupo de microorganismos (Park et al., 2010).

### **2.1.1.3 Acetogénesis**

En esta etapa, los AGCL y AGVs, son oxidados en acetato (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) por bacterias acetogénicas (Corrales et al., 2015). Esto puede llevarse a cabo mediante hidrogenación o por deshidrogenación. En el primer caso, la hidrogenación se realiza por la oxidación de los AGVs como butirato y propionato; en el segundo caso, el acetato es el producto final de la reducción de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por bacterias homoacetogénicas (Almeida et al., 2011).

Los grupos de microorganismos encargados de esta etapa, se caracterizan por ser bacterias reductoras obligadas de protones, o productoras obligadas de H<sub>2</sub>, las cuales pueden verse inhibidas por la presión parcial del H<sub>2</sub>. Por esta razón, viven en asociaciones con metanógenos y/o bacterias sulfatoredutoras (Almeida et al., 2011). Algunos géneros representativos de bacterias acetogénicas son *Clostridium*, *Treponema*, *Eubacterium*, *Thermoanaerobacter* y *Moorella* (Guo et al., 2015).

### **2.1.1.4 Metanogénesis**

Esta etapa es llevada a cabo por arqueas metanogénicas, las cuales son anaerobios estrictos, y se caracterizan por su habilidad para conservar energía para la síntesis de ATP, a través de la producción de CH<sub>4</sub>. Los metanógenos pueden metabolizar diferentes compuestos, entre estos, los hidrogenotróficos oxidan H<sub>2</sub>, formato o alcoholes simples, y reducen el CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub>. Por otro lado, los acetoclásticos dividen el acetato para formar CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (Hernández et al., 2014; Liu y Whitman, 2008; Lyu et al., 2018). Y los metilotróficos, utilizan compuestos metilados como trimetilamina, sulfato de dimetilo y metanol para producir CH<sub>4</sub> (Lyu et al., 2018).

La presencia de uno u otro grupo de metanógenos está en función del sustrato usado para la DA, siendo los primeros dos grupos los más comunes en este proceso, mientras que los metilotróficos por lo general se encuentran en bajas proporciones en digestores anaerobios (Venkiteshwaran et al., 2015). Esto se debe a que los metilotróficos, dependen de la presencia de metanol, compuesto producido generalmente a partir de procesos industriales, como la producción de aldehídos y esterres o como subproducto de la industria papelera (Fujinawa et al., 2016).

Los órdenes de arqueas más comunes en digestores anaerobios, corresponden a: Methanomicrobiales, Methanosarcinales y Methanobacteriales (Cai et al., 2016). Respecto a los géneros más representativos de metanógenos hidrogenotróficos, se encuentra *Methanospirillum*, *Methanoculleus* y *Metanoregula*. En cuanto a géneros acetoclásticos, se ha identificado a *Methanosaeta*, *Methanococcoides*, *Methanohalophilus* y *Methanolobus*, además el género *Methanosarcina*, que es un generalista, y es capaz de usar metanol, metilamina, acetato, o H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> para la producción de CH<sub>4</sub> (Guo et al., 2015).

### **2.1.2 Interacciones microbianas en la DA**

Procesos complejos a nivel industrial como la DA, son posibles gracias a las interacciones intra e interespecíficas, de los diferentes grupos tróficos involucrados. Por esa razón, es importante que exista un balance en el flujo de energía, lo que genera relaciones de tipo sintróficas o interacciones metabólicas de tipo mutualista obligada (Alvarado et al., 2014; Alzate Moncada y Quintero Silva, 2016; Barber, 2016; Escalante et al., 2015). En estas interacciones, existe una alimentación cruzada entre taxa, en la que un grupo trófico genera compuestos que son consumidos por otro grupo, por lo que suele observarse como un estilo de vida cooperativo (Morris et al., 2013).

Este intercambio metabólico, se encuentra fuertemente relacionado con la termodinámica de las reacciones de la DA. Un ejemplo, es la fermentación de AGVs como butirato y propionato a acetato (Tabla 1), llevado a cabo por bacterias como

*Syntrophomonas* y *Syntrophobacter*. Estas reacciones, son termodinámicamente desfavorables (bajo condiciones estándar a 1 atm de presión), a menos que las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, asimilen el H<sub>2</sub> en el medio, y mantengan su presión parcial en 10<sup>-4</sup> atm. Estas condiciones, permiten que la ΔG de las reacciones 3 y 4 (Tabla 1), se hagan negativas, y por lo tanto sean favorables, a diferencia del resto de las reacciones involucradas (Tabla 1), que presentan una ΔG negativa, a pesar del cambio en la presión parcial de H<sub>2</sub> (Barber, 2016).

Tabla 1. Energía libre de Gibbs para reacciones involucradas en la Digestión Anaerobia

	Cambio de energía libre (kJ/reacción)	
	ΔG <sup>o'</sup> <sup>a</sup>	ΔG <sup>b</sup>
1. Fermentación de glucosa a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> +4H <sub>2</sub> O→2CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> +2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +4H <sup>+</sup> +4H <sub>2</sub>	-207	-319
2. Fermentación de glucosa a butirato, dióxido de carbono e hidrógeno C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> +2H <sub>2</sub> O→C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> +2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +3H <sup>+</sup> +2H <sub>2</sub>	-254.4	-284
3. Fermentación de butirato a acetato e hidrógeno C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> +2H <sub>2</sub> O→2CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> +H <sup>+</sup> +2H <sub>2</sub>	48.2	-17.6
4. Fermentación de propionato a acetato, dióxido de carbono e hidrógeno C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup> +3H <sub>2</sub> O→CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> +HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +H <sup>+</sup> +H <sub>2</sub>	76.2	-5.5
5. Metanogénesis a partir de H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +H <sup>+</sup> →CH <sub>4</sub> +3H <sub>2</sub> O	-136	-3.2
6. Metanogénesis a partir de acetato CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> +H <sub>2</sub> O→CH <sub>4</sub> +HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-31	-24.7
7. Acetogénesis a partir de H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> +2HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> +H <sup>+</sup> →CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> +4H <sub>2</sub> O	-105	-7.1

<sup>a</sup> Condiciones estándar, solutos 1mol L<sup>-1</sup>, gases 1 atm;

<sup>b</sup> Concentraciones de reactivos en ecosistemas típicamente anóxicos, ácidos grasos 1 mmolL<sup>-1</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 20 mmolL<sup>-1</sup>, glucosa 10 mmolL<sup>-1</sup>, metano 0.6 atm e hidrógeno 10<sup>-4</sup> atm.

Tabla modificada de Barber (2016).

Es importante mencionar, que existe una jerarquía en la asimilación de H<sub>2</sub> como recurso por parte de los microorganismos, y está determinado por la presión parcial de H<sub>2</sub> en el medio. Por esta razón, si la presión parcial cambia a 10<sup>-5</sup> atm, otras bacterias como las sulfato reductoras, tendrán la preferencia en el uso del H<sub>2</sub>, en lugar de las arqueas metanogénicas (Barber, 2016). Esto genera una competencia interespecífica por sustratos como H<sub>2</sub>, acetato y AGVs para la formación de H<sub>2</sub>S y/o CH<sub>4</sub>. Aunque, esto estará dado principalmente por el tipo de sustrato y las concentraciones de azufre en el medio. Cuando las concentraciones de azufre son altas, como las generadas por procesos industriales en los que se utiliza ácido sulfúrico, sulfatos y sulfitos, se promueve el crecimiento de las bacterias sulfato reductoras y por lo tanto, se inhibe la metanogénesis (Alvarado et al., 2014; Alzate Moncada y Quintero Silva, 2016; Dries et al., 1998; Promnuana y O-Thong, 2017).

Por lo tanto, la actividad de las arqueas metanogénicas y su producción de CH<sub>4</sub>, está en función de las interacciones interespecíficas, vía transferencia indirecta de electrones, mediante intermediarios como H<sub>2</sub>, formato y acetato como transportadores de electrones. Dónde las vías del H<sub>2</sub> y formato, son las principales en el intercambio de electrones entre microorganismos sintróficos, lo que posibilita que las reacciones metabólicas involucradas, puedan llevarse a cabo de manera simultánea (Baek, et al., 2018; Feng, et al., 2019; Junicke, 2015; Kang, et al., 2019; Morris et al., 2013).

## **2.2 Ecología microbiana de la digestión anaerobia**

Si bien, la formación de gremios funcionales y las interacciones entre las poblaciones que conforman a las comunidades microbianas, se relacionan de manera directa con la resiliencia y la estabilidad funcional de un ecosistema. Estas interacciones son lo primero en verse afectado, cuando existe una perturbación en el medio, incluso antes de que pueda observarse una pérdida de especies (Karimi et al., 2017). Por esta razón, es importante estudiar la ecología de comunidades y los patrones que estructuran a una comunidad en un espacio y tiempo determinados (Ning et al., 2019)

La estructura de las comunidades, se debe a procesos determinísticos como parámetros ambientales, las interacciones inter e intra específicas y los *trade offs* o compromisos costo-beneficio, así como procesos estocásticos o eventos azarosos, como la deriva (cambio en la abundancia relativa de los taxa en un sitio debido a fluctuaciones demográficas) y la dispersión (movimiento de los taxa a lo largo de un sitio). Estos procesos, contribuyen de manera variable a la dinámica de las comunidades, lo que dependerá de la sensibilidad que los microorganismos tengan a la heterogeneidad ambiental y/o evento causal, que provoque una perturbación temporal o de larga duración en la comunidad (Liu et al., 2019; Ning et al., 2019).

Por lo tanto, la alteración directa de las comunidades, puede favorecer el crecimiento y/o extinción de ciertos organismos, comprometiendo la estabilidad funcional de la comunidad y por lo tanto del ecosistema (Santillan et al., 2019; Shade et al., 2012). Asimismo, debe considerarse que la función que una especie puede tener dentro de una comunidad, no es proporcional a su abundancia (Valverde Valdés et al. 2005; Konopka et al., 2015). Esto se debe a que algunos nichos pueden ser ocupados, ya sea por especies raras (poco abundantes) o dominantes. Además, las especies dominantes, suelen tener la capacidad de influenciar a las comunidades microbianas, para que se adapten a sus prioridades metabólicas (plasticidad funcional) (Tao et al., 2020).

Por consiguiente, la clave para que un ecosistema mantenga la funcionalidad, y tenga una mayor resistencia y equilibrio ante un disturbio que genere una pérdida de especies, es la diversidad taxonómica de los gremios funcionales. Esto se debe a que las diferentes especies, pueden presentar redundancia metabólica, resistencia diferencial al estrés, tasas de crecimiento distintas y otras propiedades que le confieren habilidades competitivas a dicha comunidad (Konopka et al., 2015; Stroud et al., 2015; Zamora Figueroa, 2018).

### **2.2.1 Diversidad taxonómica**

Debido a la importancia que la diversidad tiene sobre el funcionamiento de un ecosistema, esta suele ser monitoreada a través de los dos componentes que la conforman: riqueza y abundancia de especies. La riqueza es el número de especies presentes, y la abundancia relativa la determina, el número de individuos de cada especie en relación al total de individuos presentes (Valverde Valdés et al., 2005). Cuando los individuos se encuentran igualmente distribuidos entre las diferentes especies presentes, se conoce como equitatividad o equidad del inglés *evenness*. Por lo tanto, entre más uniforme es una comunidad, la equitatividad es mayor con respecto a una que presenta una alta dominancia de una de las especies (Moreno et al., 2011; Yeshitela, 2008).

Por otro lado, el concepto de diversidad ha sido dividido de acuerdo a la escala de referencia en la que se estudie, en diversidad alfa, beta y gama. La diversidad alfa puede expresarse en términos de las especies que hay dentro de una comunidad en un momento particular en el tiempo o espacio. Esta diversidad se asocia con factores ambientales a nivel local, y las interacciones entre las poblaciones como la competencia interespecífica (Halffter y Moreno, 2005).

La diversidad beta mide las diferencias, o el recambio de especies entre comunidades, y se relaciona con la distancia en el espacio y/o tiempo en el que se llevan a cabo los muestreos, así como a la heterogeneidad ambiental. Por lo tanto, es una estimación cuantitativa de qué tanto cambia la diversidad alfa a lo largo de un periodo de tiempo o el espacio. Por último, la diversidad gama es el conjunto de especies de las comunidades interactuantes que integran una extensión espacial (Gasol y Kirchman, 2018; Halffter y Moreno, 2005).

### **2.2.2 Métodos clásicos para medir la diversidad taxonómica**

Entre los métodos más comunes para medir la diversidad alfa, se encuentra el uso de índices de diversidad, los cuales de manera general, utilizan información acerca de la



riqueza y abundancia relativa de especies (Carmona-Galindo y Carmona, 2015; Guisande González et al., 2000). Se caracterizan por sintetizar un conjunto de variables medibles en un solo valor (Marques, 2008), y permiten interpretar una tendencia en el sistema de estudio, ya sea positiva o negativa. Además, ayudan a comparar la variabilidad de diferentes ecosistemas, o uno solo a lo largo del tiempo (Jorgensen et al., 2007)

Entre los índices más usados se encuentra el índice de Shannon ( $H'$ ) (Anexo 1), el cual es en realidad una medida de la entropía, o el grado de incertidumbre con el que puede determinarse la identidad de un individuo seleccionado al azar de una comunidad (Moreno et al., 2011). Por lo tanto, en una comunidad poco diversa, dominada por una o más especies, la identidad de un individuo puede ser predicha más fácilmente, lo que se asocia a una menor incertidumbre. En contraste, en una comunidad más equitativa, la incertidumbre aumenta. De acuerdo a lo anterior, este índice suele ser interpretado como una medida de diversidad (Moreno et al., 2011; Morris et al., 2014)

Por otro lado, el índice de Simpson ( $D_1$ ) (Anexo 1) representa la probabilidad de que dos individuos seleccionados de manera aleatoria de una muestra, pertenezcan a especies distintas (Morris et al., 2014). Este índice puede tomar valores entre 0 y 1 y conforme la riqueza aumenta, este índice se acerca a 1 (Kim et al., 2017).

Existen también índices que miden la riqueza, o el número total de especies observadas en una muestra (Sobs) (Anexo 1) (Lv et al., 2019). Sin embargo, dado que existen especies que pueden haber quedado fuera del muestreo de la comunidad, se han desarrollado estimadores no paramétricos de riqueza para corregir esto. Un ejemplo es el estimador de riqueza Chao1 (Anexo 1), el cual extrapola la riqueza observada a partir del número de especies consideradas raras, por estar representadas por uno o dos individuos (Kim et al., 2017).

Es importante mencionar, que además de las métricas para medir la diversidad antes descritas, también existen otros como los índices de diversidad de Margalef,

Menhinick y Brillouin (Ciprian, 2014; Okpiliya, 2012), el índice de equitatividad de Pielou (Jost, 2010) y el estimador de riqueza ACE (Kim et al., 2017), entre otros, pero estos suelen ser aplicados en menor medida.

Estas métricas de diversidad alfa ya han sido aplicadas en estudios de la DA, en los que se ha buscado caracterizar a las comunidades microbianas de reactores a diferentes escalas. A partir de estos, se ha intentado establecer una relación entre la diversidad, la funcionalidad del reactor y los parámetros de operación (Tabla 2). Sin embargo, en la mayoría de los casos, las interpretaciones posteriores suelen ser superficiales, e incluso llegan a carecer de análisis estadísticos, un ejemplo es el estudio realizado por Granada et al. (2018).

Otro aspecto recurrente en los análisis de diversidad alfa, es que las diferentes métricas, suelen ser comparadas entre sí, a pesar de que cada una mide características conceptuales diferentes de una comunidad, e incluso se expresan en unidades distintas. Por esta razón, los resultados y significancia suelen ser contrastantes y poco comparables entre sí. Esto conlleva a que el significado de los cambios observados en la comunidad, sean malinterpretados, ya que la significancia estadística y la magnitud, suelen tener poco que ver con el verdadero significado ecológico de estos (Daly et al., 2018).

Tabla 2 . Métricas de diversidad alfa aplicadas a estudios de la DA

Sustrato	Condición evaluada	Índice de diversidad	de Resultados	Referencia
Paja y celulosa	Diferentes inóculos, de co-digestión y plantas de aguas residuales	OTUs observadas, Shannon, Simpson y Chao1	La diversidad calculada fue significativamente menor en los inóculos provenientes de plantas de co-digestión con altos niveles de amonio (Prueba T de dos colas, y Prueba permutacional con simulación de Monte Carlo)	Sun et al. (2016)
Aguas residuales municipales e industriales	20 reactores con diferentes cargas orgánicas	Shannon, ACE Simpson, Chao1 Mehninck, Gini Margalef, Brillouin, OTUs observadas	Todas las métricas de diversidad tuvieron una relación baja y poco significativa con la remoción del sustrato en DQO y la producción de CH <sub>4</sub> (Pearson)	Tao et al. (2020)
Residuos lácticos y de rastros, cerdos y aves	Digestión en lote	Chao1, Shannon y Simpson	Los índices de diversidad aumentaron a lo largo del tiempo de operación, indistintamente de la producción de CH <sub>4</sub> observado	Granada et al. (2018)
Estiércol porcino	Fluctuaciones de temperatura	Shannon	El índice de Shannon no presentó diferencias significativas con respecto al cambio de temperatura (Prueba T de Student)	Shaw et al. (2019)

Forraje de maíz, estiércol de pollo y cerdo	Diferentes tipos de sustrato	Chao, Shannon, Simpson, ACE, Sobs	Chao, ACE, Shannon, Sobs y Simpson fueron significativamente mayores con sustratos como la paja y el estiércol de cerdo (ANOVA, $p \leq 0.0001$ ). Todos los índices, excepto Simpson, tuvieron los valores más bajos y no significativos en sustratos con compuestos inhibitorios (amonio) como el estiércol de pollos y cerdos (ANOVA)	Lv et al. (2019)
Residuos de grasas y aceites	Estrés por cambios en la CO	Riqueza de OTUs, Shannon, Simpson y Pielou	Shannon y la riqueza de OTUs no mostraron diferencias durante el cambio en la CO (ANOVA). Simpson y Pielou tuvieron un aumento directamente proporcional a la concentración de CH <sub>4</sub> en el biogás (ANOVA).	Ferguson et al. (2018)

### **2.2.2.1 Medidas de diversidad verdadera**

Una forma de abordar la falta de significado biológico de los índices de diversidad clásicos, es mediante su transformación en medidas de diversidad verdadera (Chao et al., 2014), este término fue acuñado por Jost (2006), basado en los números de Hill de orden  $q$  (Hill, 1973). Estas medidas de diversidad verdadera, se caracterizan por cumplir con algunos requerimientos matemáticos, que les confieren propiedades esperadas del concepto de diversidad biológica. Un ejemplo, es el principio de duplicación, del cual carecen la mayoría de los índices de diversidad clásicos (Chao et al., 2014).

La propiedad de la duplicación, consiste en que si en una comunidad A con  $S$  especies igualmente abundantes, al dividir a cada una de estas  $S$  especies en 2 grupos repartiendo su abundancia justo a la mitad, y luego consideramos a cada grupo como una especie distinta, tendríamos una nueva comunidad B con abundancias igualmente distribuidas. Entonces se esperaría que la diversidad de la comunidad B sea exactamente el doble que la comunidad A. De igual manera, al tener  $N$  comunidades con el mismo número de especies  $S$ , igualmente abundantes, sin ninguna especie compartida entre sí, entonces la diversidad de este conjunto de comunidades  $n$ , sería igual a  $N$  veces la diversidad de una sola comunidad (Moreno et al., 2011).

Por lo tanto, estas medidas indican qué tan diversa es una comunidad que es integrada por  $n$  especies, denominadas número efectivo de especies, número de especies equivalentes, especies igualmente comunes o especies igualmente abundantes (Daly et al., 2018; García-Morales et al., 2011; Moreno et al., 2011). Al expresarse en las mismas unidades, la diversidad puede ser comparada de manera directa entre sí, en función del orden  $q$  aplicado. Esto facilita la interpretación de la magnitud de cambio, y refleja de manera más precisa, la similitud en la composición de la diversidad alfa de las comunidades de interés (Chao et al., 2014).

Por otro lado, el parámetro  $q$  de los números de Hill (Anexo 1), determina la sensibilidad de esta medida a las frecuencias relativas de las especies, y puede tomar

cualquier valor continuo, aunque la elección del mismo, va a depender de la información que se desee obtener (Fig. 2). Entre lo valores más usados, se encuentra  $q=0$  o diversidad de orden 0 ( $^0D$ ), el cual corresponde a la riqueza de especies, ya que descarta la abundancia de especies (Moreno et al., 2011).

Por otro lado, cuando  $q=1$  o diversidad de orden 1 ( $^1D$ ), la abundancia de especies es ponderada de acuerdo a la proporción de sus frecuencias, interpretándose como el número efectivo de especies que se encuentran de manera común o típicamente en esa comunidad (especies con abundancias típicas). Para  $q=2$  o diversidad de orden 2 ( $^2D$ ), las especies más abundantes se ven favorecidas y las raras se descuentan, siendo esto el inverso de índice de Simpson, y puede ser interpretado como el número efectivo de especies dominantes, o las especies más abundantes presentes en el ensamblaje (Chao et al., 2014; Leinster y Cobbold, 2012; Moreno et al., 2011).

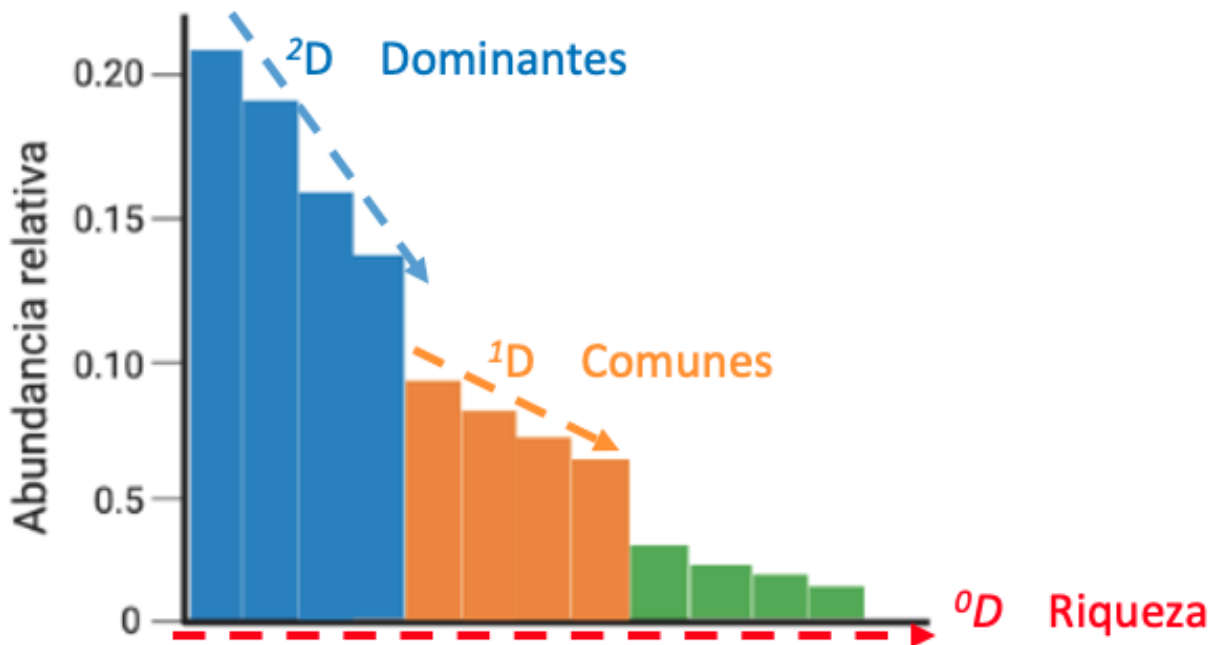


Fig. 2. Distribución de las abundancias de las especies de una comunidad. Las líneas discontinuas representan la diversidad verdadera ( $q^D$ ) que puede ser evaluada con los distintos valores de  $q$ . Modificado de Moreno et al. (2011)

Si bien, estas medidas de diversidad verdadera ya se han aplicado en estudios de comunidades microbianas de la DA, su uso se encuentra poco difundido, por lo que existen aún pocos trabajos en los que se reporten (Tabla 3), los cuales en ocasiones carecen de análisis estadísticos y/o interpretaciones biológicas. Esto a pesar de que se ha demostrado que en datos moleculares como los derivados del secuenciamiento, estas medidas satisfacen criterios ecológicos que permiten la comparación entre estudios y una mejor interpretación. Por esta razón, pueden ser visualizados como una herramienta útil, en el estudio de las relaciones bióticas entre ciertos grupos microbianos, y su conexión con factores ambientales, como las condiciones de operación estudiadas (Lucas et al., 2017).

Tabla 3. Medidas de diversidad verdadera aplicadas a comunidades microbianas de la DA

Sustrato	Condición evaluada	Medida de diversidad verdadera	Resultados	Referencia
Melaza, Lodo activado residual (LAR), LAR con glicerol (LARG), LARG con sal y urea (LARGSU)	Tipos de sustrato	$^0D$ , $^1D$ , $^2D$	$^0D$ y $^1D$ de los reactores de LARG y LARGSU fueron mayores al reactor con melazas y al inóculo. En este último $^2D$ fue significativamente mayor (ANOVA con Prueba de Dunn). La perturbación en LARGSU provocada por la adición de sal y urea, no representó diferencias significativas en ninguna de las medidas de diversidad con respecto a LARG (ANOVA con Prueba de Dunn).	De Vrieze et al. (2017)
Hidrolizado enzimático de paja y forraje de alfalfa pretratado con vapor (HPA), Efluentes de la fermentación oscura del HPA (EFO)	Tipos de hidrolizado e incremento en la CO	$^0D$ , $^1D$	La CO no tuvo efecto alimentando con HPA para $^0D$ . Al alimentar EFO, $^0D$ tuvo un aumento directamente proporcional a la carga orgánica (Prueba t). $^1D$ tuvo una disminución inversamente proporcional al tiempo de operación y la carga orgánica con ambos sustratos, tanto para bacterias como arqueas.	Liu et al., (2020)



---

Aguas residuales municipales	Contenido de H <sub>2</sub> S, temperatura y etapas de tratamiento (lodo primario, lodo floculado, superficie y fondo de los digestores anaerobios)	OTUs, Chao1 <sup>0</sup> D, <sup>1</sup> D, <sup>2</sup> D	Los reactores sin H <sub>2</sub> S medible y con la menor temperatura y concentración de AGVs, junto con el lodo primario y el lodo floculado presentaron los mayores valores de <sup>1</sup> D y <sup>2</sup> D. OTUS y <sup>0</sup> D presentaron la menor riqueza en el lodo primario y el lodo floculado.	Houari et al., (2020)
------------------------------	---	--	---	-----------------------

---

## **2.3 Parámetros fisicoquímicos que afectan la digestión anaerobia**

Las comunidades microbianas y por consiguiente el desempeño de digestores anaerobios, puede verse afectado por diversos parámetros fisicoquímicos y de operación (Jain et al., 2015), algunos de los cuales se describen a continuación:

### **2.3.1 pH**

Durante la DA, el pH de operación puede ser variable, y estará en función de la actividad los diferentes grupos tróficos. Por lo tanto, durante la etapa acidogénica, el pH puede ser cercano a 6 o menos, mientras que conforme los AGVs son digeridos y el CH<sub>4</sub> es producido, el pH puede aumentar entre 6.8 y 7 (Jain et al., 2015; Pramanik et al., 2019).

Es importante mencionar que durante la metanogénesis, el pH puede disminuir debido a una acumulación de AGVs en el medio, por lo que los metanógenos acetoclásticos pueden verse inhibidos si los AGVs se encuentran en altas concentraciones (Pap et al., 2015; Schnürer et al., 2016). Esto puede promover la proliferación de metanógenos hidrogenotróficos, los cuales son menos sensibles a estas condiciones, por lo que el rendimiento y la productividad de CH<sub>4</sub> disminuye (Mukhuba et al., 2019).

Una forma de evitar una disminución en el rendimiento y productividad, es mediante la división de este proceso en dos etapas, en las que las fases acidogénica y metanogénica se llevan a cabo en espacios separados. Esto promueve la formación de un ambiente más favorable, en el que pueden mantenerse valores óptimos de pH entre 5.0 a 7.0 para la etapa acidogénica, y de 7.0 a 8.0 para la etapa metanogénica. Dicha división, permite que se mejore la estabilidad de este proceso, y potencializa la remoción de la carga orgánica con respecto a sistemas en una sola etapa (Begum et al., 2018; Li et al., 2018).

Además, el pH también está involucrado en la composición del biogás, ya que la solubilidad del CO<sub>2</sub> en la fase líquida, depende de su valor en el medio, en contraste con el CH<sub>4</sub> que tiene una baja solubilidad, y que se mueve a su fase gaseosa en cuanto es formado, independientemente del pH (Feng et al., 2019).

### **2.3.2 Alcalinidad**

La capacidad de un sistema para amortiguar una disminución en el pH debido a la concentración de ácidos orgánicos, es conocida como alcalinidad (Fontana et al., 2018). En digestores anaerobios, la alcalinidad ha sido relacionada principalmente al sistema de carbonatos, conformado por hidróxido, carbonato y bicarbonato, y las formas no protonadas de AGVs (Jenkins y Moore, 1977; Martín-González et al., 2013).

Por lo tanto, cuando el pH disminuye por acumulación de AGVs como se describe en la sección anterior, implica que hubo una destrucción de la capacidad buffer del sistema (Jenkins y Moore, 1977; Martín-González et al., 2013), por lo que una pequeña disminución del pH, se traduce en un gran consumo de alcalinidad, ya que este último se expresa en escala lineal, en contraste con el pH que es expresado en escala logarítmica. Por esta razón, este parámetro suele ser monitoreado con el objeto de mantener valores entre 2000 a 4000 mg CaCO<sub>3</sub>/l (Musa et al., 2018) o 0.2 a 0.4 de índice alfa (Vital-Jacome et al., 2020).

Por otro lado, entre los métodos para controlar la alcalinidad, se encuentra la adición de NaHCO<sub>3</sub> (Vital-Jacome et al., 2020), o sales de potasio (Adolfo y Huertas, 2015). Además, se ha reportado que el nitrógeno disuelto en el medio, en conjunto con iones hidróxido, pueden mejorar la capacidad buffer del sistema, con lo que se puede contrarrestar la acidificación en el medio debido a la producción de AGVs (Baldi et al., 2019). Aunque la adición de compuestos para controlar la alcalinidad, debe realizarse de manera cuidadosa, ya que altas concentraciones de cationes de sodio y potasio, también

pueden tener efectos inhibitorios en la metanogénesis (Anwar et al., 2016; Zhang y Jahng, 2010).

### **2.3.3 Tiempo de retención hidráulico (TRH)**

Corresponde al tiempo que permanece el sustrato dentro del reactor, y depende del caudal a tratar y del volumen de reactor (David et al., 2019), por lo que debe ser suficiente, para que la comunidad microbiana pueda llevar a cabo el proceso completo de la DA. Esto dependerá de la comunidad, y las características del sustrato a degradar, ya sea que esté formado por carbohidratos que no requieren ser hidrolizados, o ricos en fibras que sí requieren, por lo que la remoción del sustrato y la productividad de biogás suelen ser inversamente proporcional al TRH (Musa et al., 2018).

Este parámetro, también tiene que ver con las tasas de crecimiento de las distintas especies microbianas que producen biogás (David et al., 2019). De tal manera, que TRH cortos, son preferibles para las bacterias productoras de H<sub>2</sub>, y TRH largos para los metanógenos, ya que, de lo contrario, estos últimos pueden salir del reactor junto con el efluente. Esto se debe a que los metanógenos, tienen tiempos largos de duplicación (Huang et al., 2015; Jain et al., 2015; Kim et al., 2013), que en aquellos con citocromos (Methanosarcinales), pueden ser >10 horas, en contraste con aquellos sin citocromos (Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales y Methanopyrales) que pueden ser de 1 hora (Thauer et al., 2008).

Si bien, no existe un criterio general para el establecimiento del TRH adecuado (David et al., 2019), en reactores metanogénicos se ha reportado que 1 día como mínimo, puede ser suficiente para alcanzar la remoción de algunos sustratos, especialmente en forma líquida (Musa et al., 2018). Aunque la acumulación de productos intermediarios, o una baja tasa de degradación, pueden ser un indicador de que el TRH es muy corto (Schnürer et al., 2016), por lo que también se han utilizado TRH de hasta 20 días (Xu et al., 2018).

### 2.3.4 Carga orgánica (CO)

Puede ser definida como la tasa a la que el sustrato, ya sea de tipo soluble o particulado es introducido al sistema para la degradación por microorganismos, generalmente está expresada en términos de concentración por unidad de tiempo. Para su determinación, se toma en cuenta el TRH y el flujo volumétrico multiplicado por la concentración del sustrato, por lo que depende de manera directa de las características y composición del sustrato (Bhaskar Singh y Kuldeep Bauddh, 2015).

La CO puede afectar la dinámica de la comunidad microbiana, ya que las poblaciones pueden tener tolerancias variables a esta (Amha et al., 2019). En sistemas anaerobios, el rango de CO más reportadas, es de 4 a 22 g DQO/l d, pero puede llegar hasta 54 g de DQO/l d, ya que al aumentar la CO gradualmente, la producción de CH<sub>4</sub> es directamente proporcional. Sin embargo, el uso de una CO muy alta, puede generar acumulación de AGVs, por lo que suelen preferirse CO bajas, ya que el sistema puede colapsar (Barros et al., 2016; España-Gamboa et al., 2012; Nagao et al., 2012; Vargas-Morales et al., 2018; Vital-Jacome et al., 2020; Zhang et al., 2018).

Entre los efectos que la CO puede tener en las comunidades microbianas, se ha identificado que a CO altas (54 g de DQO/l d), la abundancia relativa de bacterias fermentativas puede aumentar hasta en un 41%. Este aumento puede favorecer la actividad fermentativa, y por lo tanto en las concentraciones de AGVs en el medio, lo cual ha sido asociado con cambios repentinos en la dominancia de uno u otro género de metanógenos, lo que puede ser un indicador de acidificación del medio (Goux et al., 2015). Bajo estas condiciones, géneros como *Syntrophobacter* suelen ser los acetógenos dominantes (Zhang et al., 2018). Es importante mencionar, que la CO en conjunto con el TRH, están involucrados en la cinética de crecimiento de los microorganismos, lo que puede afectar de manera indirecta el desempeño del reactor (Gómez Camacho et al., 2019)

### 2.3.5 Tipo de Sustrato

Para la producción de biocombustibles, algunos residuos suelen ser valorizados como sustrato (Garcia et al., 2019). Estos pueden ser solubles y/o de fácil biodegradación, conformados por AGVs, carbohidratos simples, aminoácidos y alcoholes, o pueden ser sustratos particulados, conformados por moléculas de mayor tamaño. Los sustratos particulados, previamente deben ser hidrolizados hasta sus componentes monoméricos por enzimas extracelulares, para que puedan ser transportados a través de la membrana (Rodriguez et al., 2012).

Como ejemplo de sustratos solubles, se encuentran los efluentes producidos durante las diferentes fases de la producción de vino como las lías, conformadas principalmente por metabolitos residuales, y sólidos formados por levaduras y sus residuos, además de otras partículas que se precipitan al fondo de las barricas (Zhijing et al., 2018). Las lías se caracterizan por tener altas concentraciones de etanol, pH ácido por los ácidos orgánicos presentes, fenoles y otros compuestos recalcitrantes, con una Demanda Química de Oxígeno (DQO) que de bodegas de vino mexicano, se ha establecido en 221 a 436 g DQO/l d (Vital-Jacome et al., 2020).

Al destilar el etanol de las lías y del vino de baja calidad, se obtienen vinazas (Nigam y Pandey, 2009), las cuales también tienen bacterias y hongos muertos remanentes, pH ácido, y sólidos suspendidos en menor cantidad, (Bueno et al., 2009), además pueden presentar residuos de productos de limpieza de las barricas, pesticidas y fertilizantes (Sousa et al., 2019).

Por otro lado, en cuanto a los sustratos particulados más usados, se encuentran los residuos de alimentos y/o verduras (Garcia et al., 2019), los cuales suelen generarse en función de la estacionalidad y los patrones de consumo de la población. Sus características fisicoquímicas, las macromoléculas predominantes y su composición elemental, suele ser variable, por lo que su biodegradabilidad y por lo tanto el potencial productivo de biogás también (Escamilla, 2018).

Macromoléculas como proteínas y lípidos pueden dificultar la transferencia de masa, al acumularse y formar compuestos inhibitorios. Particularmente, las proteínas en solución acuosa, pueden formar ion amonio ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) o amonio libre ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ). Este último, tiene la capacidad de penetrar las paredes celulares, provocando un desbalance de protones, cambios en el pH extracelular y por lo tanto inhibir la actividad enzimática de las células (Okoro-Shekwaga et al., 2019).

Asimismo, la degradación de lípidos como los triglicéridos, producen glicerol que rápidamente es convertido en biogás, y AGCL que pueden acumularse y generar espumas. Sin embargo, se ha visto que al juntar estas moléculas poco biodegradables con carbohidratos simples de fácil degradación, puede reducirse la acumulación de compuestos inhibitorios, y por lo tanto mejorar la estabilidad (Garcia et al., 2019; Hagos et al., 2017).

### 3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que el proceso biológico de metanogénesis, ha sido plasmado en el modelo de DA como una base para su aplicación tecnológica a nivel industrial en reactores anaerobios, existen varias limitaciones (Batstone et al., 2002). Entre estas, se encuentra que los metanógenos no pueden utilizar de manera directa materia orgánica compleja. De tal manera, que dependen de otros organismos (Liu y Whitman 2008), que a su vez necesitan condiciones ambientales diferentes entre sí (Enzmann et al., 2018).

Por lo tanto, las interacciones entre los grupos microbianos de esta red trófica, son frágiles y pueden ser perturbados fácilmente, dificultando la eficiencia de este proceso (McAnulty et al., 2013). Por esta razón, algunas variables fisicoquímicas suelen ser monitoreadas como indicadores de alerta temprana de la inhibición de la metanogénesis (M. Vital-Jacome et al., 2020; Wu et al., 2019). Sin embargo, estos no pueden ser usados como indicadores predictivos o a largo plazo de la estabilidad de estos sistemas. Debido a esto, es importante el desarrollo de parámetros de monitoreo, basados en comunidades microbianas como predictores a largo plazo (De Vrieze y Verstraete, 2016).

Entre los parámetros clave para el monitoreo biológico de la DA, se encuentran los análisis de diversidad alfa clásicos, los cuales suelen ser limitados, dificultando el entendimiento y la comparabilidad de las comunidades. Por esta razón, es importante utilizar herramientas como las medidas de diversidad verdadera, que reflejan de manera más adecuada, la realidad biológica de las comunidades estudiadas, y que sí permiten una comparación entre sí (Chao et al., 2014).

Por consiguiente, la presente investigación busca contribuir al conocimiento acerca de la diversidad de las comunidades microbianas de la DA, con el objeto de establecer mecanismos de monitoreo biológico, que permitan ser relacionados con el desempeño del proceso, así como generar un mayor entendimiento sobre la ecología de estas comunidades. Por lo que se busca reconocer cambios en la diversidad, asociados a las condiciones de operación, con lo que se pueda identificar su influencia en la productividad



de CH<sub>4</sub> y su relación con la estructura, composición e interacciones entre los grupos funcionales (Ferguson et al., 2018; Lucas et al., 2017; Regueiro et al., 2015; Venkiteshwaran et al., 2015).

## **4. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar la aplicación de diferentes medidas de diversidad a comunidades microbianas de la digestión anaerobia, para interpretar la funcionalidad del proceso, relacionándolas con el desempeño de reactores bajo diferentes condiciones de operación y tipos de sustrato.

### **Objetivos Específicos**

- Identificar la dinámica de las comunidades microbianas asociadas a la digestión anaerobia, durante la operación de reactores alimentados con vinazas vitivinícolas y residuos orgánicos alimenticios, y su relación con las condiciones de operación y desempeño.
- Relacionar la diversidad alfa de las comunidades microbianas con la funcionalidad de los digestores anaerobios, para mejorar la comprensión acerca del desempeño de estos sistemas

## **5. METODOLOGÍA**

El desarrollo experimental consistió en la operación de dos reactores metanogénicos, el primero perteneciente a un sistema en dos etapas, en el que se utilizó como sustrato, el efluente acidogénico del reactor operado y reportado por Zavala-Méndez (2020), para la producción de biohidrógeno, a partir de un sustrato soluble conformado por efluentes vitivinícolas. Posteriormente, el mismo reactor metanogénico fue reinoculado, y puesto en marcha para evaluar la digestión anaerobia en una etapa. Por último, para evaluar a la comunidad microbiana de la digestión anaerobia de un sustrato particulado, se obtuvieron muestras del reactor operado por Jiménez-Ocampo et al. (2021), para la producción de metano a partir de residuos alimenticios.

### **5.1 Sustratos e inóculos**

#### **5.1.1 Sustratos solubles**

Como sustratos solubles, se utilizaron aguas residuales de la industria vitivinícola, correspondientes a lías y vinazas (Tabla 4), recolectadas de una bodega ubicada en el municipio de Ezequiel Montes, Querétaro. Los sustratos fueron almacenados a  $-4^{\circ}$  C hasta su uso.

#### **5.1.2 Sustratos particulados**

Como sustratos particulados se utilizaron residuos provenientes de un restaurante tipo parrillada buffet, ubicado en la Ciudad de Querétaro (Tabla 5). Los residuos se procesaron de acuerdo con la metodología descrita en la NMX-AA-15-1985 y almacenaron a  $-4^{\circ}$ C hasta su uso.

Tabla 4. Caracterización de los efluentes vitivinícolas

Parámetro*	Sistema 2 etapas		Sistema 1 etapa
	Lías**	Vinazas**	Vinazas
pH	3.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	
Sólidos suspendidos totales	52.1 ± 0.5	0.5 ± 1.5	1.4 ± 0.01
Sólidos suspendidos volátiles	42.2 ± 2.7	0.4 ± 1.7	1.4 ± 0.02
Sólidos suspendidos fijos	9.6 ± 1.3	0.1 ± 3.3	0.01 ± 0.004
Carbohidratos totales	24.3 ± 0.2	4.4 ± 1.5	0.26 ± 0.002
Carbohidratos solubles	7.14 ± 0.6	3.6 ± 1.0	0.27 ± 0.001
DQO total	236 ± 1.0	77 ± 8.0	44.8 ± 2.1
DQO soluble	214 ± 1.8	77 ± 6.0	44.5 ± 21.9
Ácido acético	8.4 ± 0.2	9.0 ± 1.0	7 ± 1.4
Ácido propiónico	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.3	0.26 ± 0.4
Ácido butírico	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0
Ácido láctico	7.2 ± 0.3	10.2 ± 3.4	0
Ácido succínico	1.2 ± 0.5	0	0
Etanol	46 ± 2.7	0.4 ± 0.2	0
Glicerol	ND	7.4 ± 5.3	ND
Fósforo	ND	ND	0.47
Amonio	ND	ND	0.0004
Nitrito	ND	ND	0.16
Sulfato	ND	ND	0.53
Na	ND	ND	2.43
Mn	ND	ND	1.59
Cu	ND	ND	0.41
Al	ND	ND	0.18
Ca	ND	ND	0.78
Zn	ND	ND	0.84

\*Todos los parámetros están expresados en g/l, excepto la composición elemental expresada en mg/l. \*\*Tomado de Zavala-Méndez (2020). No identificado (ND).

Tabla 5. Caracterización de los residuos alimenticios

Parámetro	Concentración
Sólidos totales (ST) (mg/g Residuo)	454
Sólidos volátiles (SV) (mg/g Residuo)	431
Carbohidratos totales (mg/g ST)	207.11
Carbohidratos solubles (mg/g ST)	140.18
N-NH <sub>3</sub> (mg/g ST)	1
Lípidos totales (g/l)	126
DQO total (mg/g ST)	860
DQO soluble (mg/g ST)	460
Humedad (%)	55
Densidad (g/ml)	1.2

### 5.1.3 Inóculos

El reactor acidogénico de lías y vinazas, operado por Zavala-Méndez (2020), fue inoculado con microorganismos endógenos de los sustratos utilizados, los cuales previamente fueron desarrollados en el sustrato, mediante fermentaciones a temperatura ambiente a pH 7, siguiendo una modificación de la metodología reportada por Fernandes et al., (2013).

En cuanto a los reactores metanogénicos, la inoculación fue realizada con lodo anaerobio granular, proveniente de un reactor mesofílico de la industria harinera, localizado en el estado de Querétaro. Este lodo presentó una concentración de 0.84 g SV/g de lodo húmedo, y en los reactores UASB de efluentes vitivinícolas se utilizaron 15 g de SV.

## 5.2 Digestión anaerobia de Efluentes Vitivinícolas

### 5.2.1 Sistema en dos etapas

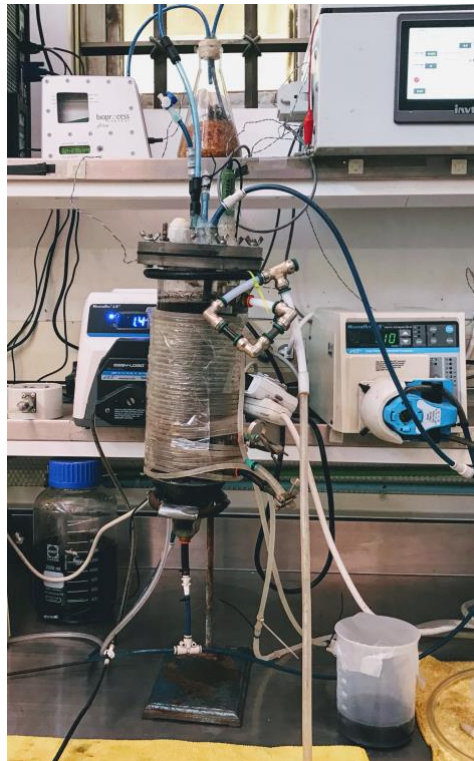
La fase acidogénica de este sistema, operado y reportado por Zavala-Méndez (2020), tuvo una configuración de reactor de tipo filtro percolador, fue operado en continuo, con un volumen de trabajo de 1 l y un volumen total de 2 l. La totalidad del volumen de trabajo, fue empacado con anillos de polietileno (HAS filter media,  $963 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ,  $0.95 \text{ g}/\text{cm}^3$ ) como medio de soporte para la biopelícula. Se operó a un TRH variable de 5.5, 4 y 3 horas, con una CO de 181 a 856 g DQO/l d. Además, se controló la temperatura a  $35^\circ\text{C}$  y tuvo un pH de operación de 5.5 ajustado con NaOH 10 N.

Por otro lado, el reactor metanogénico operado por el autor del presente trabajo, fue cilíndrico, fabricado en acrílico, con una configuración de reactor de tipo anaerobio de flujo ascendente con manto de lodos (UASB, por sus siglas en inglés), operado en continuo (Fig. 3), con un volumen de trabajo de 1.5 l y un volumen total de 1.8 l. La temperatura fue controlada a  $35^\circ\text{C}$ , con un baño de recirculación de acero inoxidable (MX06S135-A11B, Polyscience, México). La alimentación y recirculación se llevó a cabo con dos bombas peristálticas de control variable (EW-77800-5, MasterFlex, EUA). El biogás producido se registró con un medidor de microcaudales de gas ( $\mu\text{Flow}$ , Bioprocess Control, Suecia).

En este sistema, la estrategia experimental consistió en la utilización del efluente acidogénico del reactor operado por Zavala-Méndez (2020), como sustrato para el reactor metanogénico. Inicialmente, este sustrato estuvo conformado por lías y posteriormente por vinazas, las cuales fueron alimentadas al reactor metanogénico previo ajuste de pH con 5 g de  $\text{NaHCO}_3$  por cada 3 g DQO para controlar la alcalinidad. A partir de esto, se evaluaron diferentes CO, establecidas de acuerdo a los valores reportados en la literatura para el tratamiento de vinazas y/o efluentes vitivinícolas entre los que se encontraron CO de 3 hasta 29.9 g DQO/l d (Barros et al., 2016; Keyser et al., 2003; Moletta, 2005; Petta et al., 2017; Vital-Jacome et al., 2020; Vital-Jacome y Buitrón, 2021). Por lo tanto, se

probaron CO de 17.4 a 5.5 g DQO/l d, las cuales fueron alcanzadas mediante una variación en el TRH de 1, 2 y 3 días.

La frecuencia de análisis fisicoquímicos y toma de muestra de biomasa para comunidades microbianas y composición de biogás, fue de 1 a 2 veces a la semana, con lo que se evaluó la productividad de CH<sub>4</sub> (PM) y la eficiencia de remoción del sustrato (ER), para establecer una relación con la estabilidad del sistema.



*Fig. 3. Reactor Metanogénico de efluentes vitivinícolas*

### **5.2.2 Sistema en una etapa**

El reactor metanogénico del sistema en dos etapas previamente descrito en la sección 5.2.1, fue reinoculado y puesto en marcha para evaluar la digestión anaerobia en una etapa, para lo cual se utilizó como sustrato únicamente vinazas crudas. Se llevó a cabo el procedimiento anterior, en el que se evaluaron diferentes CO, las cuales fueron

de 8, 12 y 22 g DQO/l d, alcanzadas mediante la variación en el TRH de 3, 2 y 1 días, respectivamente. Cada CO fue evaluada durante 10 TRH.

Asimismo, la frecuencia de análisis fisicoquímicos y toma de muestra de biomasa para comunidades microbianas y composición de biogás, fue de 1 a 2 veces a la semana, con lo que se evaluó la productividad de CH<sub>4</sub> (PM) y la eficiencia de remoción del sustrato (ER), para establecer una relación con la estabilidad del sistema.

### **5.3 Digestión anaerobia de Residuos Alimenticios**

Para lograr el objetivo de este trabajo, y evaluar a las comunidades microbianas de la digestión anaerobia de un sustrato particulado, se tomaron muestras de biomasa de un reactor de residuos alimenticios. Este reactor fue operado y reportado por Jiménez-Ocampo et al. (2021), de quien se obtuvieron los datos de productividad de CH<sub>4</sub> y biogás de este reactor, que fueron utilizados posteriormente para analizar a la comunidad metanogénica de este reactor y su relación con las condiciones de operación y desempeño. En breve, este sistema fue un reactor discontinuo secuencial (SBR, por sus siglas en inglés), con un volumen de trabajo de 2.5 l y un volumen total de 3.2 l. El tiempo de reacción (T<sub>reac</sub>) fue de 1.04 a 10 horas. La temperatura se controló a 37°C y pH de operación de 5.5 ajustado con NaOH 10N. La operación del reactor tuvo como fases de operación: llenado de 3 min, sedimentación de 1 h y vaciado de 1 min. El volumen de intercambio en todos los experimentos fue de 0.5 l, con una agitación de 100 rpm.

La alimentación del reactor de los residuos alimenticios (sección 5.1.2) se realizó previa adición de 8 g NaHCO<sub>3</sub>/l para adicionar alcalinidad. La CO de diseño con este lote de sustrato fue de 10 g SV/l d y se evaluó durante 49 ciclos. La frecuencia de toma de muestra de biomasa para comunidad microbiana, y composición de biogás fueron al final de cada ciclo.





*Fig. 4. Reactor Metanogénico de residuos alimenticios*

## **5.4 Métodos analíticos**

### **5.4.1 Análisis físico-químicos**

#### ***5.4.1.1 Composición de biogás***

Se tomaron 5 ml de gas del espacio de cabeza del reactor, y se determinaron las concentraciones de H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> mediante un cromatógrafo de gases (8610C SRI, SRI Instrumental, EUA). Este estuvo acoplado a un detector de conductividad térmica (TCD) y dos columnas empacadas en serie. Una de las columnas estuvo empacada con 1.83 m x 0.32 cm de sílica gel y la otra columna de tamiz molecular de 13x con 1.82 m x 3.175 mm). La temperatura del inyector y el detector, fueron de 90 y 150 °C, respectivamente. El horno fue inicialmente puesto a una temperatura de 40 °C y mantenido así durante 4

min. Posteriormente, la temperatura fue incrementada a 110 °C a una velocidad de 20 °C /min) Se utilizó nitrógeno como fase móvil a un flujo de 20 ml/min (Buitrón, Martínez-Valdez, y Ojeda, 2019)

#### **5.4.1.2 Perfil de ácidos grasos volátiles**

Las concentraciones de AGVs se obtuvieron con cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) (1260, Agilent Technologies, CA, USA), equipado con un detector de arreglos de diodos (DID) y uno de índice de refracción (RID), con una columna AMINEX HPX-87 H a una temperatura de 55°C. Se utilizó una solución de 5mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eluyente (0.6 ml/min). El volumen de inyección fue de 10µl, con un flujo de 0.6 ml/min, previo paso por un filtro de nitrocelulosa y acidificación de la muestra a pH <2 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### **5.4.1.3 Demanda química de oxígeno (DQO)**

Se utilizó el método 8000 de Hach, basado en el método estándar colorimétrico de Demanda Química de Oxígeno (APHA, 2017), a partir del cual pasadas 2 horas de digestión, los tubos a temperatura ambiente fueron leídos con un espectrofotómetro portátil (DR/1900, Hach, USA) a una longitud de onda de 620 nm. Para diferenciar entre DQO total y soluble, la muestra diluida fue filtrada con fibra de vidrio (glass microfiber) con diámetro de poro de 1.6 µm (1820025, Whatman, USA).

#### **5.4.1.4 Alcalinidad**

Se utilizó el método titulométrico estándar a un pH de 4.5, mediante la adición de HCl 0.1N (APHA, 2017). Además, en el reactor del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas, se calculó el índice alfa al titular a pH 5.75 y pH 4.3, de acuerdo a lo reportado por Vital-Jacome et al. (2020).

### **5.4.2 Análisis microbiológicos**

#### **5.4.2.1 Estrategia de muestreo**

Se obtuvieron 1.5 ml de muestra de biomasa de los reactores metanogénicos de manera semanal, y se almacenaron a -20° C para extracciones de ADN posteriores. Cabe mencionar que el análisis de ADN únicamente se llevó a cabo en las muestras derivadas de momentos de interés particular, como aquellos momentos de estabilidad, en los que existieron cambios abruptos, notablemente diferentes en la productividad de CH<sub>4</sub>.

#### **5.4.2.2 Extracción de Ácidos nucleicos**

Previo a la extracción de material genético, los gránulos y/o biomasa fueron disgregados con una punta de pipeta, y centrifugados para eliminar residuos del sustrato. Posteriormente, se tomó una muestra del pellet formado y se prosiguió con la extracción de ADN con el DNeasy Power Soil Kit (Qiagen, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante; el ADN final se eluyó en un volumen de 50 µl. La concentración y pureza de los extractos se cuantificaron con un espectrofotómetro Nanodrop (2000C, ThermoScientific, USA), usando la relación de absorbancias de las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. El ADN extraído se mantuvo a -20°C hasta su envío a secuenciar.

#### **5.4.2.3 Secuenciamiento masivo de nueva generación y clasificación en ASVs**

La composición de procariontes se determinó con secuenciación masiva de nueva generación por parte del servicio de Integrated Microbiome Resource (IMR, Universidad de Dalhousie, Canadá), mediante amplicones de 16S ARNr con MiSeq (illumina), usando los primers universales para procariontes de la región variable V4-V5 515F 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' y 926R 5'-CCGYCAATYMTTTRAGTTT-3' (Parada et al., 2016).

Posteriormente los fragmentos de las secuencias, fueron procesadas con el paquete DADA2 (Callahan et al., 2016) en el software R (R 3.6.2, R Core Team), siguiendo el pipeline de la versión 1.16 de DADA2. El primer paso fue inspeccionar la calidad de las lecturas “forward” y “reverse”. A partir de esto, se siguieron los parámetros de filtrado estándar con el comando *filter and trim* en DADA2, y se configuró el truncado de las lecturas (*truncLen*) después de las bases forward y reverse 250 y 160 para efluentes vitivinícolas, y 270 y 200 para residuos alimenticios, además se removieron los primeros 10 nucleótidos (*trimLeft*).

A partir de las secuencias filtradas, con *learnErrors* se modeló la tasa de error de los amplicones por métodos paramétricos, usando el argumento *multithread* como “verdadero”. Posteriormente con el algoritmo DADA2 se infirieron las variantes de secuencias verdaderas. Con esto, las lecturas “forward” y “reverse” se alinearon y combinaron mediante *mergePairs* para obtener las secuencias con ruido eliminado, las cuales fueron usadas para la obtención de una tabla de variantes de secuencias amplificadas (ASVs).

A partir de las ASVs, con *removeBimeraDenovo* se removieron las secuencias quiméricas con el método “consensus”, y *multithread* y *verbose* como “verdaderos”. Por último, la identificación taxonómica de las ASVs, se realizó mediante el alineamiento de las secuencias parciales del gen 16S ARNr, de acuerdo a la base de datos SILVA (v.138) con la función *assignTaxonomy*, y se utilizaron para construir un objeto phyloseq con el paquete phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013) en R.

Es importante mencionar, que si bien previo a la obtención de OTUs comúnmente se realiza una rarificación de las lecturas como método de normalización (Hughes y Hellmann, 2005), en este caso se optó por evitar en la medida de lo posible esta práctica, ya que se ha comprobado que tiende a aumentar el error tipo I y II y genera OTUs espurias. Esto se debe a que se requiere de una selección arbitraria del tamaño mínimo de las lecturas, pero en especial por la pérdida de información, lo que puede dificultar la comparación entre comunidades (McMurdie y Holmes, 2014). Sin embargo, al usar ASVs

derivadas del procesamiento con DADA2, ya se abordan algunos de los artefactos que se pretenden disminuir al rarificar las lecturas y clasificar en OTUs. Por esta razón, se optó por evaluar si el presente estudio podía beneficiarse de esta práctica, al observar las características de los datos obtenidos (McKnight et al., 2019)

#### **5.4.2.4 Análisis de la diversidad microbiana**

El objeto `phyloseq`, estaba compuesto por la tablas de ASVs, taxonomía, secuencias de ADN de referencia de las ASVs, datos de operación y rendimiento del reactor, así como el árbol filogenético enraizado que posteriormente sería usado para calcular la distancia Unifrac. Una vez obtenido el objeto `phyloseq`, se realizó un filtrado de los phyla que únicamente tuvieran una ASV asignada y se procedió a realizar curvas de rarefacción para determinar el esfuerzo de muestreo y establecer si pudieron detectarse la mayoría de especies presentes en cada muestra.

En función de las curvas de rarefacción, se decidió no rarificar las muestras de los reactores de efluentes vitivinícolas y evitar un sesgo en el listado de ASVs, que podría afectar posteriormente la comparación de los sistemas. En contraste, las ASVs del reactor de residuos alimenticios, si fueron rarificadas a través de `rarefy_even_depth` del paquete `phyloseq`, usando el método de muestreo sin reemplazamiento. Esto se realizó tomando en cuenta lo recomendado por Cameron et al. (2020), para evitar el sesgo causado por librerías desiguales.

Por otro lado, se calcularon las métricas de diversidad alfa mencionadas en la sección 2.2.2, como riqueza observada o ASVobs, Shannon, Simpson, Chao1 (<sup>0</sup>D) e Inverso de Simpson (<sup>2</sup>D) con `estimate_richness` del paquete `phyloseq` en R (McMurdie y Holmes, 2013), así como el exponencial de Shannon (<sup>1</sup>D). Posteriormente, el análisis de la diversidad beta se llevó a cabo mediante una matriz de distancia UniFrac (Lozupone y Knight, 2005) con el paquete `phyloseq`, con el que se realizó un agrupamiento jerárquico representado en un dendrograma (Legendre y Legendre, 2003).

### 5.4.3 Análisis estadístico

A partir de la matriz de distancia UniFrac, se realizó un análisis multivariado de Coordinados Principales (PCoA, por sus siglas en inglés) con el paquete *ape* (Paradis y Schliep, 2019) en R, y se representó en un diagrama de ordenación. Las variables de respuesta como productividad de CH<sub>4</sub> (PM), rendimiento (REN) y eficiencia de remoción del sustrato (%) (ER), fueron representadas como vectores ajustados con la función *envfit* del paquete *vegan* (Oksanen et al., 2012). Además, se realizó un análisis de varianza multivariado permutacional (PERMANOVA, por sus siglas en inglés), para evaluar la relación entre las condiciones de operación y la distancia entre las comunidades en el tiempo. Para realizarlo, se utilizó la función *adonis* del paquete *vegan* (Oksanen et al., 2012).

Por otro lado, para relacionar las condiciones de operación y las variables de respuesta con la diversidad alfa calculada, se realizó un análisis de correlación de Pearson con *rcorr* del paquete *Hmisc* en R. De acuerdo a lo anterior, para explicar la variación observada durante la operación de los reactores en cuanto a productividad de CH<sub>4</sub>, se realizó un modelo lineal en función de las métricas de diversidad alfa como variables explicativas.

Para el ajuste del modelo, inicialmente se revisó la colinealidad de las variables a partir del análisis de correlación de Pearson, en el que las variables altamente colineales ( $r > 0.70$ ) no se utilizaron en un mismo modelo. Posteriormente, se realizaron modelos con diferentes combinaciones de las variables restantes, a partir de las cuales se realizó una reducción con el método “forward”. Se usaron como criterios para escoger a las variables, aquellas que explicaran una proporción alta de la varianza ( $R^2$ ) de las variables de respuesta y que tuvieran una significancia de  $p \leq 0.05$  (Borcard et al, 2011). Es importante mencionar, que en caso de datos con distribución normal sesgada, previo al ajuste del modelo, se realizó una transformación logarítmica de los datos.

Posteriormente, los modelos se compararon de acuerdo al criterio de información de Akaike (AIC) y se escogieron aquellos que tuvieran los menores valores de AIC, previa verificación del factor de inflación de la varianza (VIF). El VIF mide la proporción de la varianza del coeficiente de regresión que incrementa o se “infla” por las variables explicativas, por lo que un VIF cercano a 10 debe ser evitado por la alta colinealidad de las variables, justificando la reducción del número de variables (Borcard et al, 2011). Por último, se comprobó el supuesto de distribución normal de los residuos, y fue validado a través de la prueba de normalidad de Shapiro Wilks.

Por otro lado, para comparar si había diferencias en la productividad de CH<sub>4</sub> entre los dos tipos de sustrato utilizados en el reactor del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas, se utilizó una prueba t pareada. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software R (R 4.0.3, R Core Team).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 Operación de los Reactores

#### 6.1.1 Reactor Metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas

El reactor estuvo en operación durante 158 días en continuo, iniciando con el TRH de 1 día durante 24 días, TRH de 2 días durante 11 días y por último el TRH de 3 días se evaluó durante 123 días. Durante este último, las lías usadas como sustrato fueron sustituidas a partir del día 56 por vinazas al 50% y posteriormente en el día 130 se utilizó la concentración completa, por lo que la CO fue variable en el tiempo (Fig. 5).

Durante la operación, se observó que la productividad de CH<sub>4</sub> con lías, mejoró a CO altas (17 y 8.7 g DQO/l d) y TRH cortos (2 y 1 día), ya que con la CO de 5.8 g DQO/l d con el TRH de 3 días, las productividades decayeron notablemente (Fig. 5). En contraste, al realizar el cambio de sustrato a vinazas, manteniendo el TRH de 3 días hasta el término de la operación del reactor, se observó que la productividad de CH<sub>4</sub>, fue similar con las dos CO evaluadas (8 y 5.5 g DQO/l d), las cuales no superaron los mínimos y máximos obtenidos con lías, pero si se acercaron a los valores obtenidos durante el TRH de 2 días con lías (Fig. 5).

En cuanto a la ER (Fig. 6), es posible notar que el reactor fue más eficiente en la remoción de la DQO durante la operación con lías, a partir de las CO más altas utilizadas, alcanzando una ER del 97 %, indistintamente del TRH usado. En cambio, a partir de la utilización de vinazas, la ER máxima fue de 87 %, con un promedio de 64 % y particularmente casi al final de la operación, cuando se aumenta la CO a 8 g DQO/l d manteniendo del TRH de 3 días, esta eficiencia decae hasta 20 a 45 % (Fig 6).



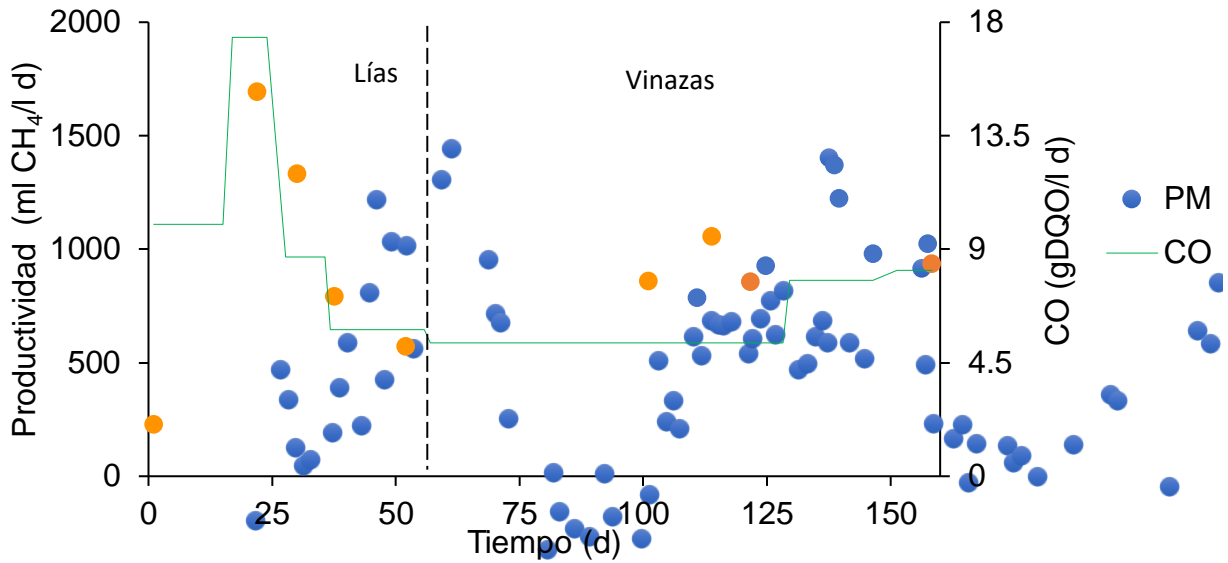


Fig. 5. Desempeño del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas. Se muestra la productividad de CH<sub>4</sub> (ml CH<sub>4</sub>/l d) (PM), CO (g DQO/l d) y muestras de biomasa para secuenciación (naranja).

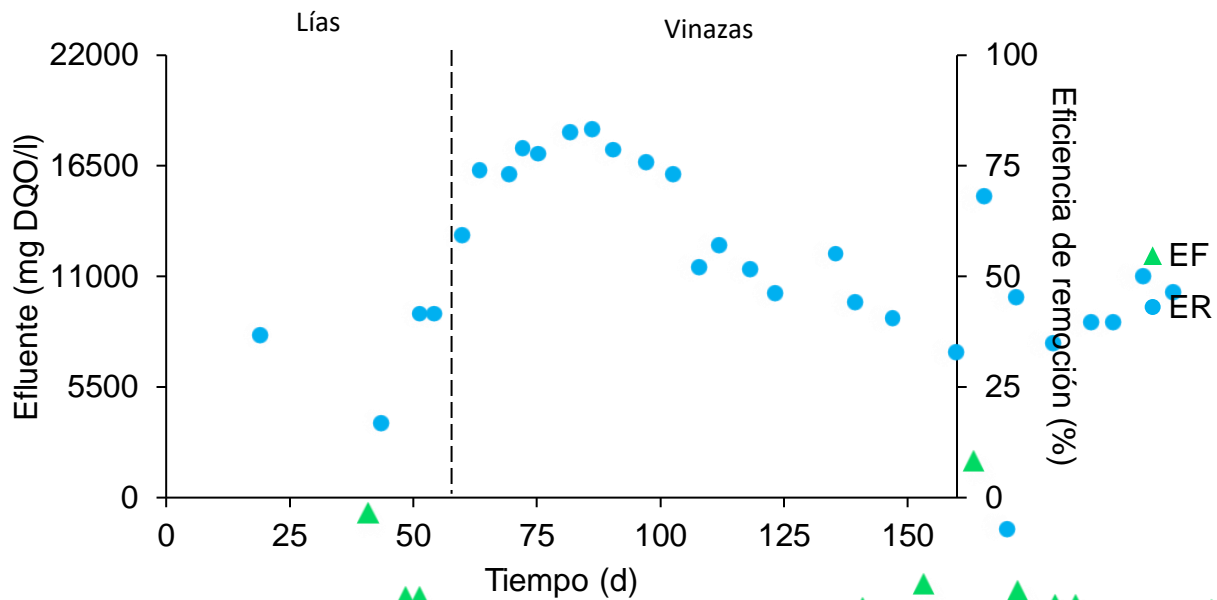


Fig. 6. Asimilación del sustrato del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas. Se muestra la eficiencia de remoción del sustrato alimentado (%) (ER) y concentración del efluente (mg DQO/l) (EF).

A pesar de la variabilidad antes descrita en el desempeño y productividad del reactor, las productividades promedio fueron de  $1057 \pm 291$  ml de  $\text{CH}_4/\text{l d}$ , con un rendimiento de  $0.10 \pm 0.03$  l de  $\text{CH}_4/\text{g DQO}$  alimentada, con una composición de biogás de  $67 \pm 0.05$  %, así como ER, de  $72 \pm 17$  % (Fig. 6). Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros sistemas UASB, como el estudio realizado por Barros et al. (2016), quienes a partir de vinazas de caña de azúcar, obtuvieron productividades promedio de 829 a 938 ml de  $\text{CH}_4/\text{l d}$  con CO de 5 a 11.5 g  $\text{DQO}/\text{l d}$  a partir de TRH de 2.8 a 1.8 días, así como ER de 70-82%.

Por otro lado, durante la operación tanto con lías como con vinazas, los AGVs identificados fueron los mismos, tales como ácido acético, propiónico, valérico, láctico, caprónico, isovalérico y succínico (Fig. 7), de los cuales con vinazas, las concentraciones de ácido acético y propiónico aumentaron 2.26 veces más a las producidas con lías (Fig. 7), lo cual pudo haber estado relacionado con las productividades de  $\text{CH}_4$  (Fig. 5) y ER obtenidas (Fig 6).

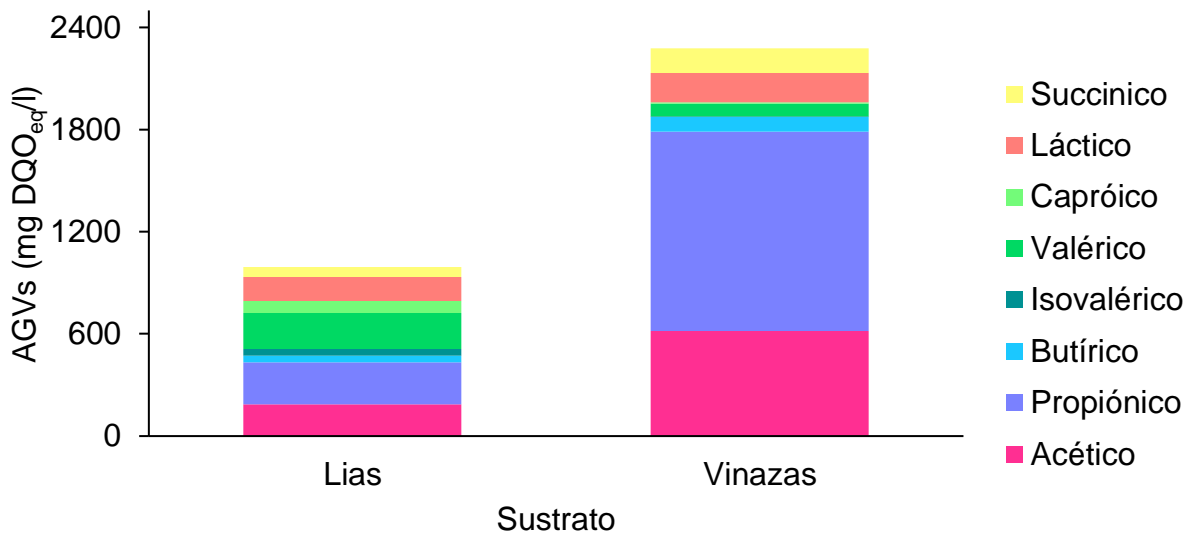


Fig. 7. AGVs producidos con lías y vinazas durante la operación del TRH de 3 días, en el reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas. AGVs promedio expresados en su equivalencia de DQO ( $\text{DQO}_{\text{eq}}$ )

### 6.1.2 Reactor Metanogénico del sistema en una etapa de Efluentes vitivinícolas

El reactor estuvo en operación durante 72 días en continuo, iniciando con el TRH de 3, 2 y 1 días, los cuales tuvieron una duración de 10 TRH cada uno. En este reactor, las productividades de CH<sub>4</sub> fueron directamente proporcionales al aumento de la CO, e inversamente proporcionales a los TRH utilizados (Fig. 8). A partir de esto, se obtuvo una productividad de  $1722 \pm 815$  ml de CH<sub>4</sub>/l d (Fig. 8) y un rendimiento de  $0.05 \pm 0.02$  l de CH<sub>4</sub>/g DQO, con una composición de biogás de  $70 \pm 0.03\%$  de CH<sub>4</sub>, y  $3531 \pm 1141$  ppm de H<sub>2</sub>S. Mientras que la alcalinidad a pH 4.5 fue de  $8645 \pm 1012$  mg CaCO<sub>3</sub> y el factor alfa fue de  $0.25 \pm 0.13$ .

En cuanto a la ER del sustrato alimentado medido en términos de DQO (Fig. 9), los valores se mantuvieron entre 77 y 87 % durante la operación con el TRH de 3 días. Posteriormente, la ER tuvo mayor variabilidad, en especial justo después del cambio hacia la CO de 12 y 22 g DQO/l d, aunque de manera general, la ER fue de  $68 \pm 20\%$  (Fig.9).

Respecto a los AGVs producidos (Fig. 10), es posible notar que en este reactor, se formaron únicamente 5 tipos de AGVs (ácido valérico, isovalérico, butírico, propiónico y acético), en comparación con el sistema en dos etapas en el que se identificaron 8 (sección 6.1.1). Sin embargo, en promedio el ácido propiónico y acético nuevamente fueron los que se produjeron en mayor medida, alcanzando concentraciones de 1165 y 226 g DQO<sub>eq</sub>/l, respectivamente, durante el TRH de 3 días. Estos valores fueron muy similares a las concentraciones obtenidas con el sistema en dos etapas, también durante el TRH de 3 días con vinazas (1168 y 617 g DQO<sub>eq</sub>/l) (Fig. 7).

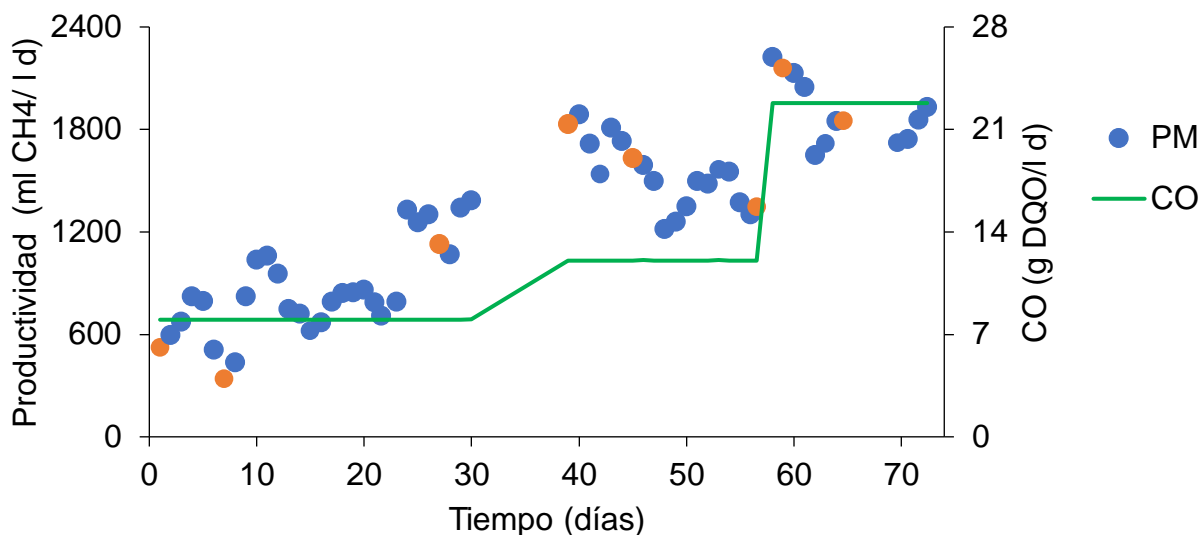


Fig. 8. Desempeño del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. Se muestra la productividad de  $\text{CH}_4$  (ml  $\text{CH}_4$ /l d) (PM), CO (g DQO/l d) y muestras de biomasa para secuenciamiento (naranja).

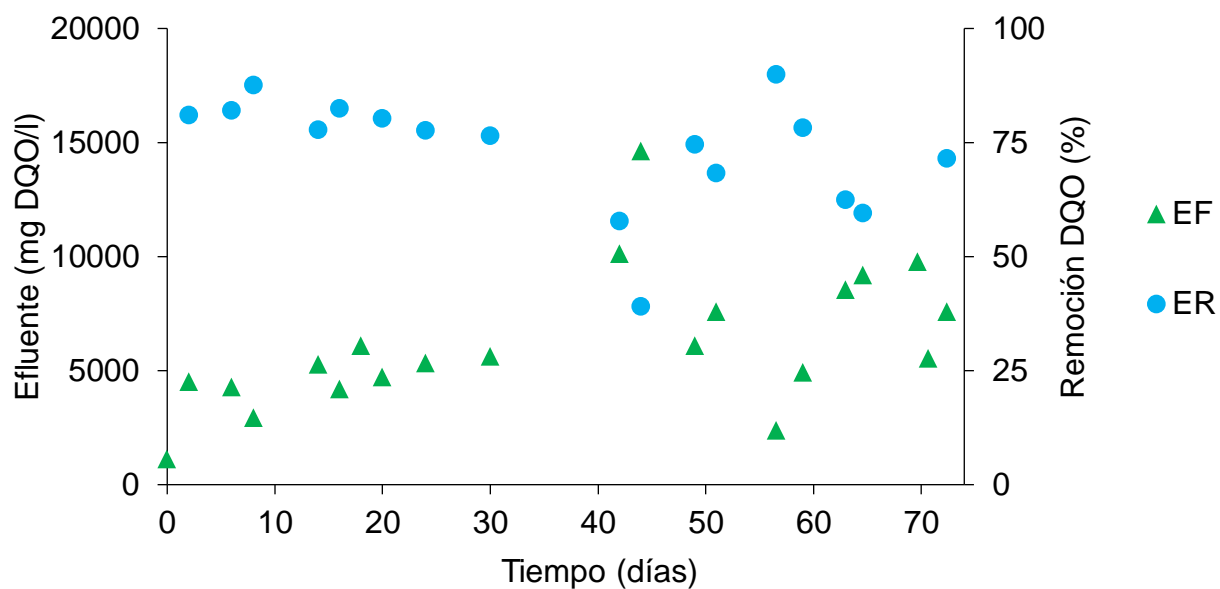


Fig. 9. Asimilación del sustrato del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. Se muestra la eficiencia de remoción del sustrato alimentado (%) (ER) y la concentración del efluente (mg DQO/l) (EF).

Durante la operación del reactor, las concentraciones máximas de ácido propiónico y acético (4110 y 1397 mg DQO<sub>eq</sub>/l), se identificaron durante el TRH de 2 días, las cuales disminuyeron al cambiar al TRH a 1 día y la CO más alta (22 g DQO/l d), obteniéndose valores de 3277 y 898 mg DQO<sub>eq</sub>/l respectivamente. Además, es importante mencionar que a partir del aumento de la CO con el TRH de 2 y 1 día, comenzó a observarse una mayor producción de otros AGVs, como ácido valérico e isovalérico (Fig. 10 B)

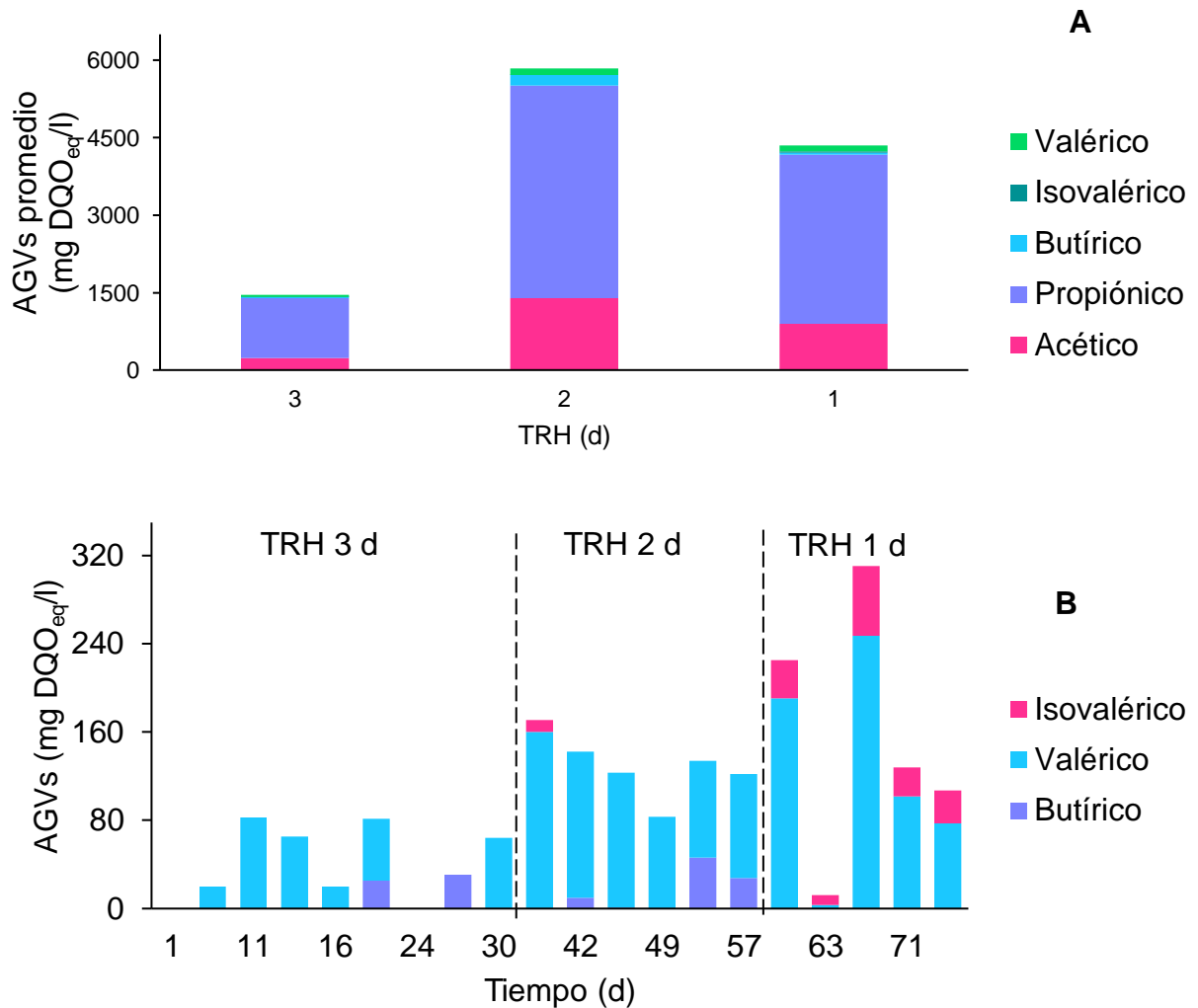


Fig. 10. AGVs producidos durante la operación con los TRH de 3, 2 y 1 día en el reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. (A) AGVs promedio por cada TRH evaluado. (B) AGVs producidos a menores concentraciones durante la operación del reactor del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. AGVs expresados en su equivalencia de DQO (DQO<sub>eq</sub>).

### 6.1.3 Reactor Metanogénico del sistema de residuos alimenticios

El reactor de residuos alimenticios fue operado en lote durante 49 ciclos, con una CO de 0.2 a 19 g de SV/l d y un Treac de 1.22 a 10 días. A partir de eso, se obtuvo una productividad de  $314 \pm 247$  ml de  $\text{CH}_4$ /l d, con una composición de  $40 \pm 22$  % $\text{CH}_4$  (Fig. 11). En este reactor, es posible distinguir que la productividad de  $\text{CH}_4$  y la productividad de biogás, mantienen un comportamiento directamente proporcional hasta el ciclo 40, después de este, puede observarse que la productividad de  $\text{CH}_4$  decae por completo hasta cero, mientras que la productividad de biogás aumenta exponencialmente. Este cambio en las productividades se da, a pesar de que la CO se mantiene estable durante el mismo periodo.

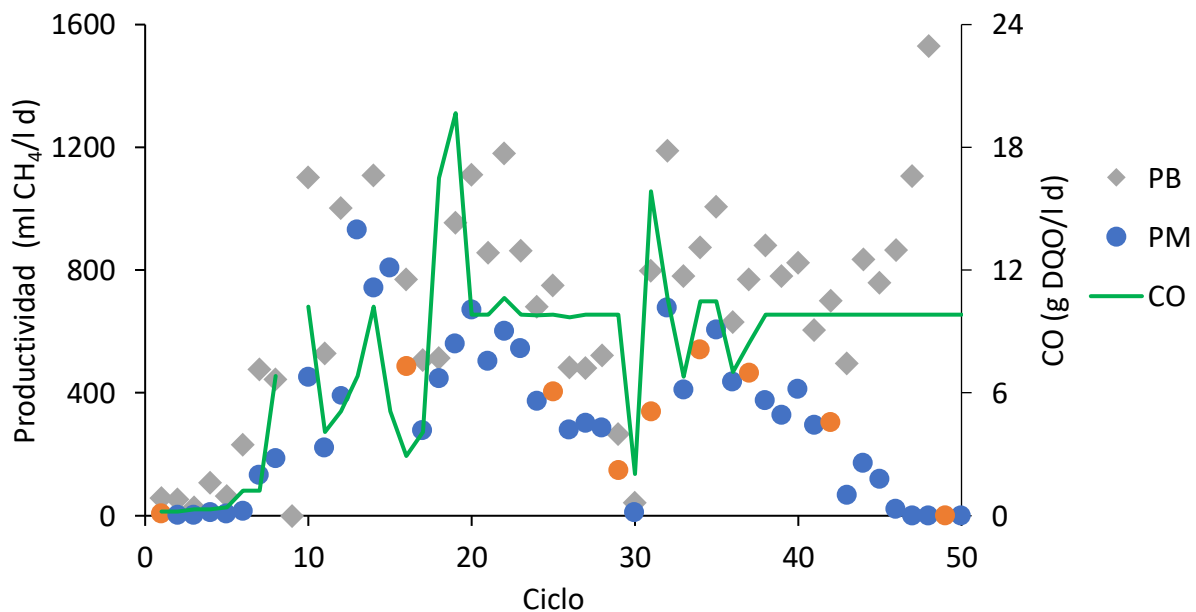


Fig. 11. Desempeño del reactor metanogénico del sistema de residuos alimenticios. Se muestra la productividad de  $\text{CH}_4$  (ml  $\text{CH}_4$ /l d) (PM), productividad de biogás (ml gas/l d) (PG), CO (g DQO/l d) y muestras de biomasa para secuenciamiento (naranja).

## 6.2 Análisis microbiológicos

A partir de los reactores de efluentes vitivinícolas, se obtuvieron 20 muestras de gránulos anaerobios y 9 muestras del reactor de residuos alimenticios, con las que se realizaron las extracciones de ADN de acuerdo a la metodología descrita en la sección 5.4.2.

La mayor parte de las muestras fueron secuenciadas con éxito, a excepción de 2, pertenecientes a los reactores de efluentes vitivinícolas. Es posible que las muestras no secuenciadas, tuvieran una relación con las características del sustrato, y la naturaleza del gránulo, ya que estos pueden presentar compuestos fenólicos, taninos y polisacáridos complejos, entre otros, que han sido reportados como inhibidores de la polimerasa y otras reacciones enzimáticas (Schrader et al., 2012). Por otro lado, respecto a las secuencias procesadas con DADA2 (v.1.16) para la obtención de ASVs (Tabla 6), es posible notar que después de la eliminación de quimeras, todos los reactores en promedio mantuvieron más del 65% de las secuencias originales.

*Tabla 6. Secuencias obtenidas durante el procesamiento con DADA2*

Reactor	Iniciales	Filtradas	denoisedF	denoisedR	merged	Sin quimeras
Efluentes vitivinícolas (dos etapas)	34489±	31723±	31474±	31501±	30239±	29055±
	20780	18620	18531	18518	18200	17853
Efluentes vitivinícolas (una etapa)	76205±	66838±	66302±	66222±	64117±	59360±
	45301	39642	39135	39106	37295	33206
Residuos alimenticios	52529±	48617±	48131±	48232±	45765±	35186±
	28122	26086	25837	25915	24553	18200

### 6.2.1 Comunidad microbiana del Reactor Metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas.

La evaluación de la calidad del muestreo mediante la curva de rarefacción (Fig. 12), demostró que la mayor parte de las muestras comienzan a llegar a la asíntota, es decir, existió un muestreo homogéneo, ya que la muestra del día 158, es la única que aún se encuentra en la fase exponencial, por lo que es posible que algunos individuos no logran ser muestreados.

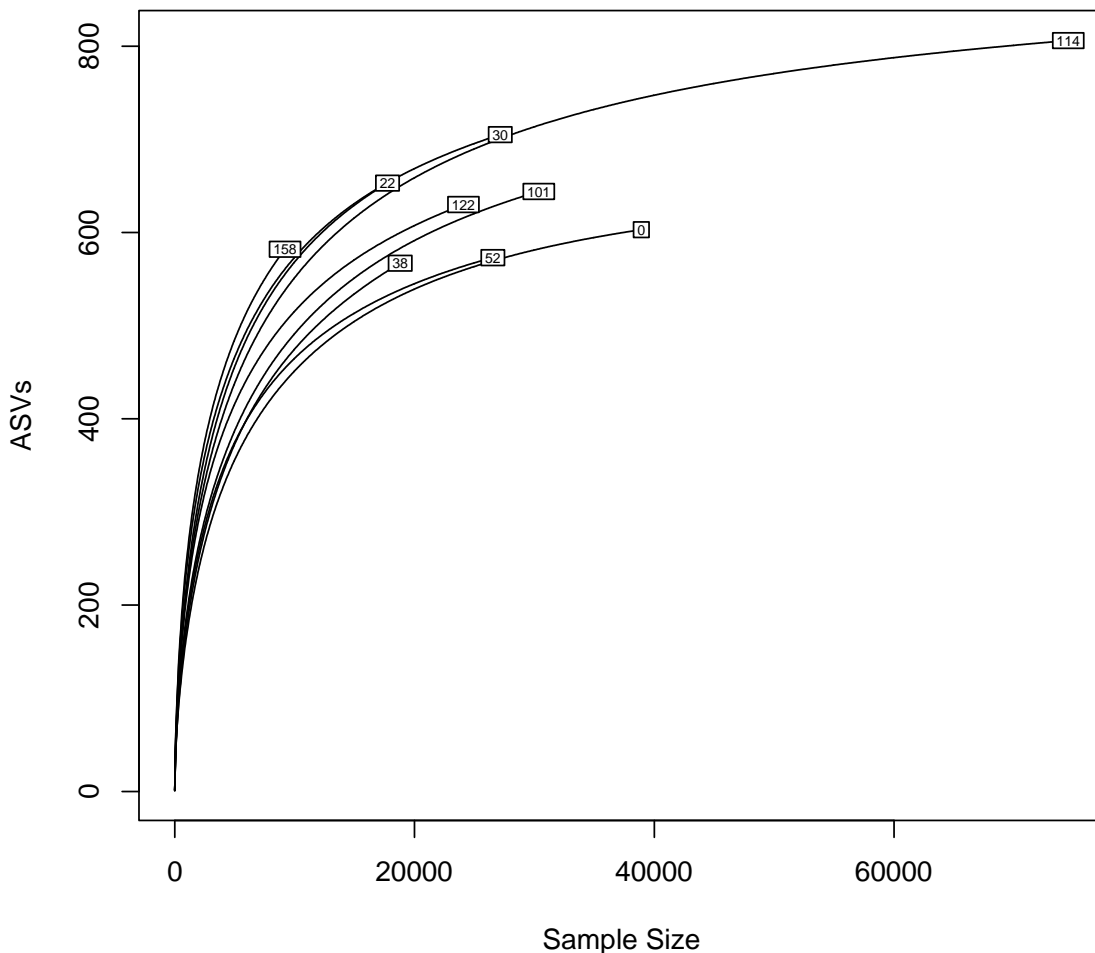


Fig. 12. Curvas de rarefacción de las muestras del reactor metanogénico de efluentes vitivinícolas del sistema en dos etapas. Los números representan el día en el que se tomaron las muestras.



En total se identificaron 968 ASVs, distribuidas en 34 phyla (Fig. 12), de las cuales el 78% pudo ser identificada hasta género, encontrándose un total de 158. La comunidad microbiana en el tiempo, estuvo principalmente dominada por los phyla Synergistota ( $37 \pm 13\%$ ), Halobacterota ( $13 \pm 9.6\%$ ), Firmicutes ( $12 \pm 7.2\%$ ) y Bacteroidota ( $9 \pm 6\%$ ), entre otros.

A lo largo del tiempo de operación, se observaron variaciones en los patrones de abundancias relativas de algunas taxas, los cuales de acuerdo con la distancia Unifrac no ponderada, formaron dos grandes clústers de comunidades (Fig. 13). Uno de ellos, conformado por los días 1, 22, 30, 38 y 52 y el segundo por los días 101, 114, 122 y 158.

Entre la variabilidad observada en las comunidades, destaca el phylum Synergistota, representado en su mayoría por Synergistaceae, el cual alcanzó las mayores abundancias relativas durante los días 101 y 122, correspondientes a los días en los que se obtuvieron las menores productividades de  $\text{CH}_4$  (860 y 855 ml de  $\text{CH}_4/\text{l d}$ ) durante la segunda mitad de la operación del reactor.

El phylum Synergistota se conforma por microorganismos anaerobios estrictos y se caracterizan por hidrolizar proteínas en aminoácidos y péptidos para posteriormente fermentarlos en AGVs (Jumas-Bilak y Marchandin, 2014). Además, también pueden producir acetato e hidrógeno (Ferguson et al., 2018; Lv et al., 2019), por lo que suelen ser más abundantes en sistemas en dos etapas, que se caracterizan por utilizar altas cargas u otras condiciones de estrés como amonio, AGVs, sulfatos, entre otros (Rajendran et al., 2020). De acuerdo a esto, el aumento en su abundancia relativa durante la segunda mitad de la operación, puede deberse al cambio de sustrato de lías a vinazas (día 56), ya que las concentraciones de nitrógeno total en estas últimas pueden llegar a ser de hasta 17.4 g/l (Vlyssides et al., 2010).

Además, la fermentación de compuestos nitrogenados por parte de este phylum, también pudo producir una acumulación de AGVs como propionato ( $>1000$  mg/l) (Fig. 7). Esto pudo generar un desbalance en las interacciones de tipo sintróficas, entre bacterias

sintróficas oxidadoras de propionato (BSOP) y metanógenos hidrogenotróficos, afectando la metanogénesis (Khafipour et al., 2020). Esto podría explicar la baja productividad de CH<sub>4</sub>, cuando las abundancias de este phylum estuvieron en sus máximos.

En este caso, las concentraciones de propionato en el medio posteriores al cambio de sustrato, coinciden con lo reportado por Wang et al. (2009), quienes encontraron que la metanogénesis puede ser inhibida a partir de los 900 mg/l. Esta inhibición concuerda con una disminución en la abundancia de *Methanosaeta* del phylum Halobacterota, característico de la producción de CH<sub>4</sub> vía acetoclástica (Smith y Ingram-Smith, 2007), el cual tuvo una abundancia inversamente proporcional al tiempo de operación.

Por otro lado, el phylum Firmicutes (tercer phylum más abundante en el reactor), estuvo conformado en su mayoría por la clase Clostridia y el género *Syntrophomonas*. Este presentó una menor abundancia relativa en los días 1, 38 y 52, con respecto al resto de la operación, que corresponden a los días con las menores productividades alcanzadas (Fig. 5). Este phylum se caracteriza por su actividad fermentativa (García-Lozano et al., 2019), aunque también pueden oxidar acetato en sintrofia con metanógenos hidrogenotróficos (García-Ruiz et al., 2019). Sin embargo, dado que el sustrato alimentado proviene del reactor acidogénico y estaba conformado en su mayoría por acetato ( $3.9 \pm 0.032$  g DQO<sub>eq</sub>/l), la segunda vía puede ser la más probable.

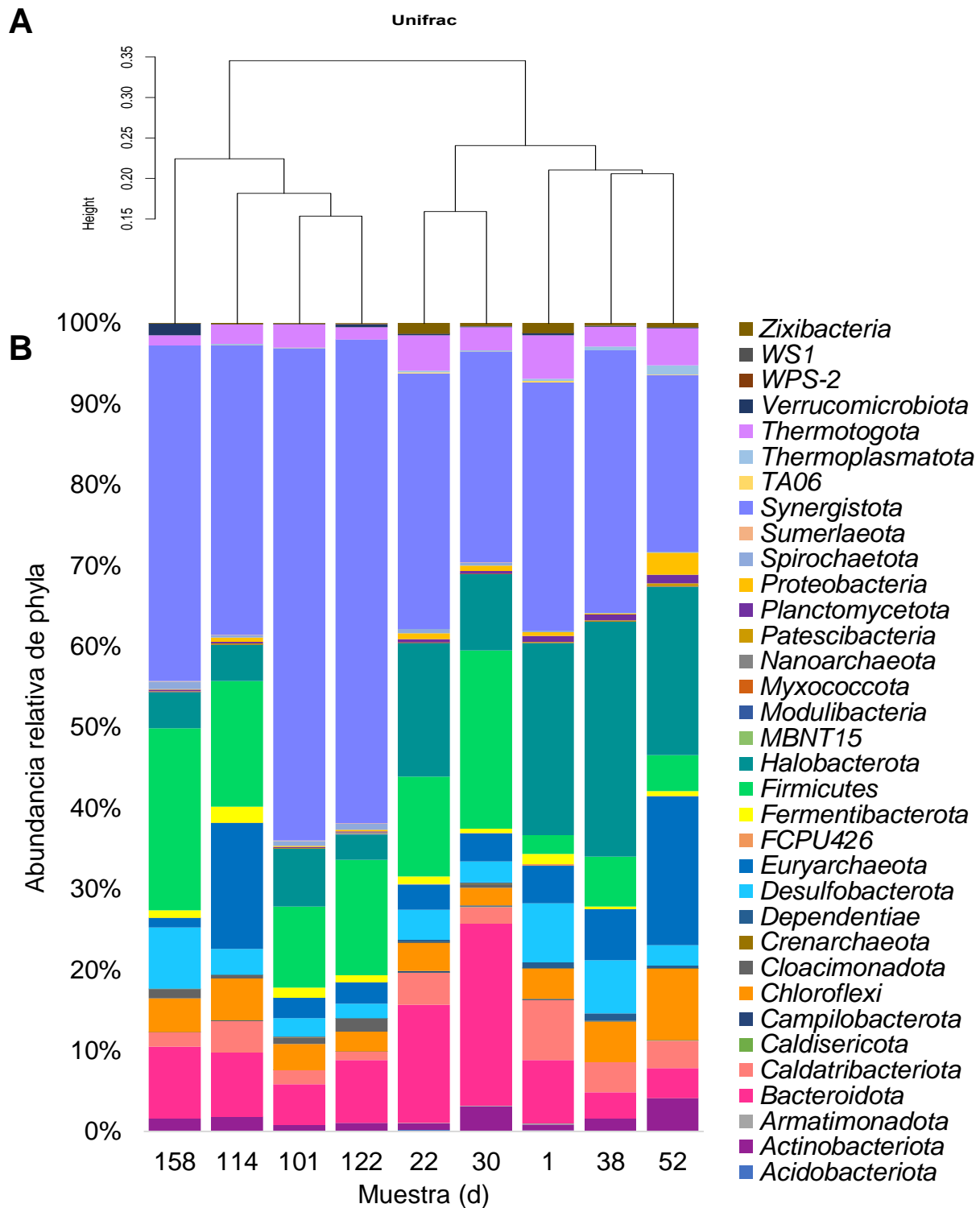


Fig. 13. Comunidad microbiana del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas. (A) Dendrograma de la distancia Unifrac no ponderada. (B) Abundancia relativa de los phyla identificados.

Por otro lado, el phylum Bacteroidota, tuvo la mayor abundancia relativa en las comunidades de los días 22 y 30, los cuales se caracterizaron por las mayores productividades obtenidas durante la operación del reactor (1693 y 1332 ml de CH<sub>4</sub>/ l d, respectivamente). Este phylum, se caracteriza por degradar proteínas, además de fermentar aminoácidos a acetato (Rivière et al., 2009).

El enriquecimiento de Bacteroidota en conjunto con otros phyla dominantes como Firmicutes, se ha reportado como una sinergia que permite una mayor conversión del sustrato a CH<sub>4</sub>, en especial cuando la proporción de las abundancias de Bacteroidota/Firmicutes (B/F) es baja o <4 (Cayetano et al., 2020; Cayetano et al., 2021; Tukanghan et al., 2021). Esto puede explicar la alta productividad obtenida durante los días 22 y 30, ya que la proporción B/F de ambos phyla durante este tiempo fue cercana a 1 (Fig. 13).

Esta dinámica en la estructura de las comunidades, fue analizada a través de la diversidad beta, usando como medida de distancia entre las comunidades UniFrac no ponderada, con la cual se realizó un Análisis de Coordinados Principales (PCoA) (Fig. 14). En este, la estructura de las comunidades divergió en el tiempo, de acuerdo a los dos tipos de efluentes vitivinícolas usados (lías y vinazas) (centroide  $r^2=0.70$ ,  $p = 0.009$ ). La conformación de estas dos grandes comunidades en el tiempo a lo largo del PCo1, explican hasta el 51.2 % de la varianza total. Por otro lado, en el PCo2 las comunidades asociadas al sustrato lías, se diferencian en tres grupos a lo largo del tiempo, identificándose un clúster microbiano conformado por los días 22 y 30, con los que se obtuvieron las mayores productividades de CH<sub>4</sub>. El PCo2, explica el 13.5 % de la varianza observada, y en conjunto ambos coordinados explican hasta el 64.7 % de varianza total.

Asimismo, en el espacio de ordenación del PCoA, se sobrelaparon las variables de respuesta de interés que fueron medidas en el reactor (productividad de CH<sub>4</sub>, rendimiento y ER). A partir de esto, se observó una alta colinealidad entre la productividad y el rendimiento (VIF=6), por lo que esta última fue excluida. De acuerdo a lo anterior, entre las variables restantes (VIF=1), la productividad de CH<sub>4</sub> tuvo una relación moderada

pero significativa con la estructura de las comunidades ( $r^2=0.59$ ,  $p=0.05$ ). En contraste, la ER y la composición de las comunidades, tuvo una relación baja poco significativa ( $r^2 = 0.33$ ,  $p = 0.3$ ) (Fig. 14).

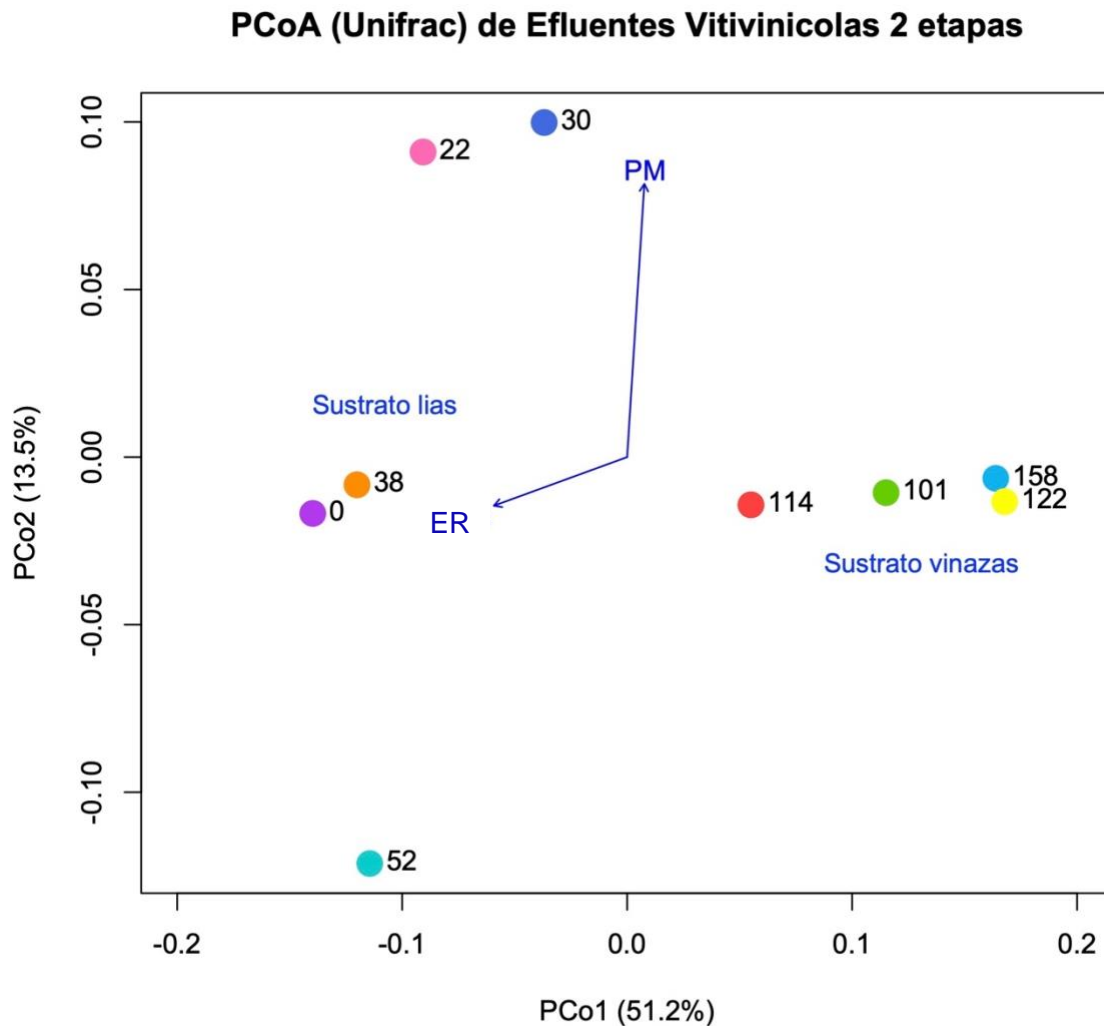


Fig. 14. Diagrama de ordenación del PCoA basado en distancia Unifrac no ponderada de la comunidad microbiana del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas. Se muestra la productividad de  $CH_4$  (ml de  $CH_4$ /l d) (PM), la eficiencia de remoción del sustrato (%) (ER), las comunidades microbianas (círculos) y los días de muestreo (números). El vector representa la dirección del gradiente de las variables PM y ER, y su longitud es proporcional a la correlación entre la ordenación y las variables.

Lo anterior concuerda con los resultados del PERMANOVA basado en la matriz de distancia Unifrac, en el que se sugiere que los dos tipos de efluentes vitivinícolas usados como sustrato y su interacción con la CO, fueron los principales factores abióticos que se relacionaron con la diversidad beta de este reactor ( $r^2=0.55$ ,  $p = 0.003$ ). Sin embargo, el uso de estos dos tipos de efluentes vitivinícolas tuvo un pequeño efecto positivo, pero no significativo en la productividad de CH<sub>4</sub> (Prueba T,  $t_3 = 0.62$ ,  $p = 0.582$ ).

Por otro lado, para comparar las diferencias entre las comunidades a lo largo del tiempo e identificar tendencias, se calculó la diversidad alfa (Tabla 7), a partir de la cual se encontró que la riqueza de ASVs observada (ASVobs) fue de  $640 \pm 76$  ASVs. Además, la mayor cantidad de ASVobs (días 114, 30 y 22), correspondieron a los días en los que se obtuvieron las mayores productividades de CH<sub>4</sub>, por lo que se identificó una relación directamente proporcional, entre la riqueza de ASVobs y la productividad de CH<sub>4</sub>, pero esta fue no significativa (Fig. 15).

*Tabla 7. Diversidad alfa del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas*

Día	ASVobs	Shannon	Simpson	q0	q1	q2
0	603	4.331	0.974	644.912	76.008	39.104
22	653	4.758	0.981	756.511	116.545	51.615
30	705	4.963	0.985	790.880	143.078	64.701
38	567	4.267	0.970	710.014	71.288	32.923
52	573	4.395	0.970	633.254	81.033	32.840
101	644	4.230	0.947	734.829	68.712	19.043
114	806	4.717	0.976	863.857	111.811	42.116
122	630	4.297	0.945	736.567	73.480	18.094
158	582	4.984	0.984	731.259	146.077	63.384

Asimismo, la riqueza estimada con diversidad verdadera de orden  $q=0$  ( ${}^0D$ ) fue de  $733 \pm 70$  ASVs efectivas y presentó la misma tendencia que las ASVobs. Por lo que, al comparar las comunidades entre sí, se encontró que las comunidades asociadas a las menores productividades de  $CH_4$  (días 1, 38 y 52), tuvieron en promedio 17% menos ASVs efectivas que las de mayor productividad (días 22 y 30). De acuerdo a esto, se identificó una relación directamente proporcional y significativa entre  ${}^0D$  y la productividad de  $CH_4$ , a diferencia de las ASVobs que tuvieron una relación moderada no significativa (Fig. 15)

Por otro lado, el índice de Shannon tuvo como valores máximos y mínimos, 4.96 y 4.23 respectivamente. Al transformarse en diversidad verdadera de orden  $q=1$  ( ${}^1D$ ), se encontró que los mayores valores de  ${}^1D$  (143 y 146 ASVs comunes), correspondieron a las comunidades de los días 30 y 158. Esta similitud en el número de ASVs, puede deberse a que estas comunidades se encontraban bajo la misma CO (8.7 y 8.2 g DQO/l d), aunque esta relación fue poco significativa (Fig. 15). Esta baja significancia puede deberse a que estas comunidades pertenecían a TRH distintos (2 y 3 días), así como diferentes efluentes vitivinícolas (lías y vinazas), a pesar de lo cual ambas comunidades presentaron productividades de 1333 y 934 ml de  $CH_4$ /l d, respectivamente.

De igual manera, las comunidades 22 y 114, presentaron valores de  $D^1$  similares (116 y 111 ASVs comunes), y correspondieron a los días con las mayores productividades (1693 y 1055 ml de  $CH_4$ /l d) con ambos tipos de sustratos (lías y vinazas). Además, tuvieron ER similares (69 y 68%), a pesar de estar bajo CO distintas (17.4 y 5.3 g DQO/l d). Sin embargo, esta tendencia directamente proporcional entre la productividad de  $CH_4$  y  $D^1$ , fue poco significativa (Fig. 15).

En cuanto al índice de Simpson, todas las comunidades presentaron valores mayores a 0.94, el cual al ser transformado en diversidad verdadera de orden  $q=2$  ( ${}^2D$ ), se obtuvo la diversidad de especies dominantes en la comunidad. En este caso, las comunidades con las menores productividades generadas tanto con lías (días 1, 38 y 52) como vinazas (días 101 y 122), fueron aquellas que estuvieron dominadas en promedio

por  $35 \pm 4$  y  $19 \pm 1$  ASVs, respectivamente. En caso contrario, las comunidades con las productividades más altas con lías (días 22, 30) y vinazas (días 114 y 158), presentaron en promedio una mayor cantidad de ASVs dominantes ( $58 \pm 9$  y  $53 \pm 15$  ASVs respectivamente).

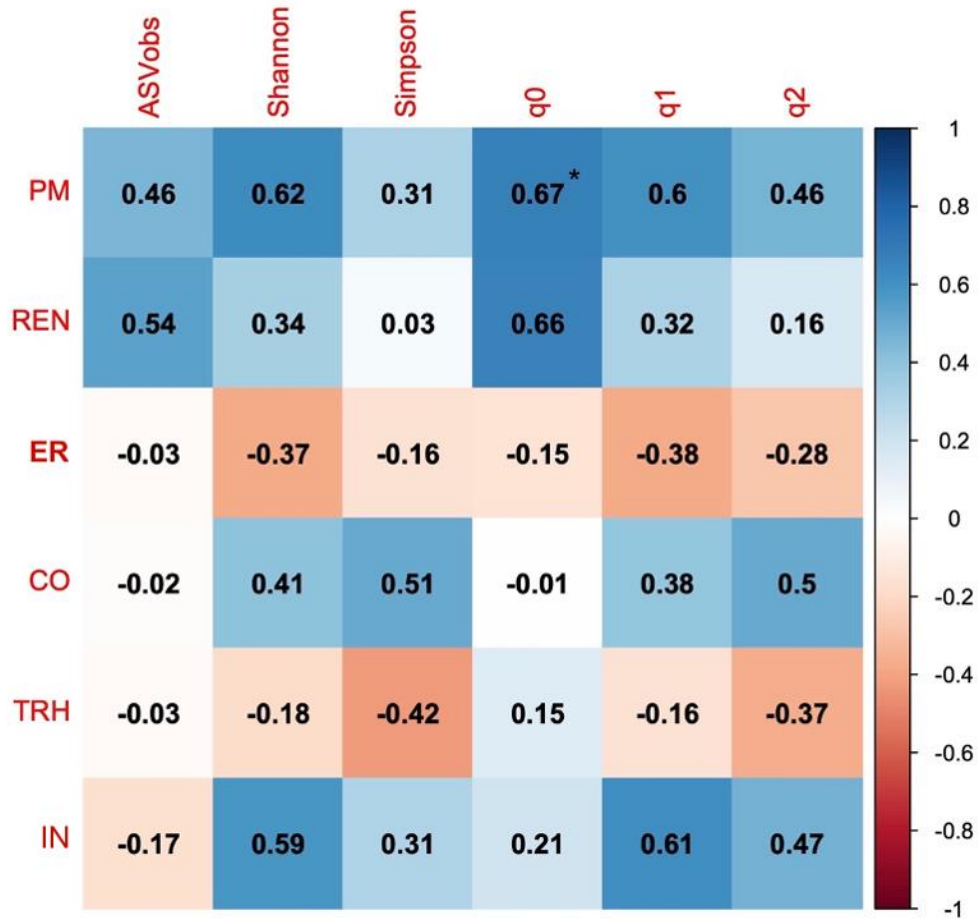


Fig. 15. Correlograma de las métricas de diversidad alfa y las condiciones de operación y variables de respuesta del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas. Se presenta el TRH (d), CO (g DQO/l d) y concentración del influente (g DQO/l) (IN), así como variables de respuesta como productividad de  $CH_4$  (ml de  $CH_4$  / l d) (PM), rendimiento (l  $CH_4$ /g DQO) (REN), eficiencia de remoción(%) (RE). Los números representan el coeficiente de correlación de Pearson. \*Significancia  $p \leq 0.05$ .



Ahora bien, al relacionar la productividad con la diversidad alfa calculada, se realizó un modelo lineal en el que  $^0D$  como predictor de la productividad de  $CH_4$  resultó ser el más adecuado para explicar la variación observada (Anexo 2) . En este caso, es importante mencionar, que las variables tuvieron una transformación logarítmica, a partir de lo cual se obtuvo un modelo que explica significativamente una proporción media de la varianza ( $R^2 = 0.54$ ,  $F_{1,7} = 8.11$ ,  $p = 0.025$ ), y cumple con el supuesto de normalidad de los residuos (Shapiro-Wilk= 0.90407,  $p = 0.2766$ ) (Fig. 16).

Los resultados del modelo lineal indican, que la productividad de  $CH_4$  tuvo una relación directamente proporcional a  $^0D$ , como una medida de la riqueza de ASVs de las comunidades microbianas de este reactor. Por lo tanto, los patrones de riqueza de ASVs, explican moderadamente la productividad de  $CH_4$  e indican que por cada ASV adicional en la comunidad, puede esperarse en promedio un aumento de  $\exp(4.410) = 82$  ml  $CH_4$ /l d.

Si bien, el efecto que tiene una sola ASV en la productividad puede parecer pequeña, en términos de funcionalidad de la comunidad, no lo es. Esto se debe a que algunas ASV pueden llevar a cabo actividades clave en el flujo de energía y por lo tanto la funcionalidad de la comunidad. Esto concuerda con los resultados de Sierocinski et al. (2018), quienes establecieron que métricas de diversidad alfa como la riqueza, pueden asociarse a la productividad.

Esta asociación se debe principalmente, a que al interior de estas comunidades, existen especies con funcionalidades diferenciales, las cuales, al encontrarse bajo constricciones termodinámicas por las condiciones anaerobias, y las presiones selectivas por competencia por los recursos, se desarrollaron como especialistas en nichos metabólicos particulares.

Lo anterior significa que existe poca redundancia metabólica, y fuertes interacciones mutualistas, esto para evitar inhibiciones termodinámicas por compuestos de desecho, por lo que bajo condiciones anaerobias, la riqueza es de gran importancia

para asegurar un eficiente uso de los recursos, lo cual ya ha sido identificado en comunidades metanogénicas (Sierocinski et al., 2018; Sierocinski et al., 2017).

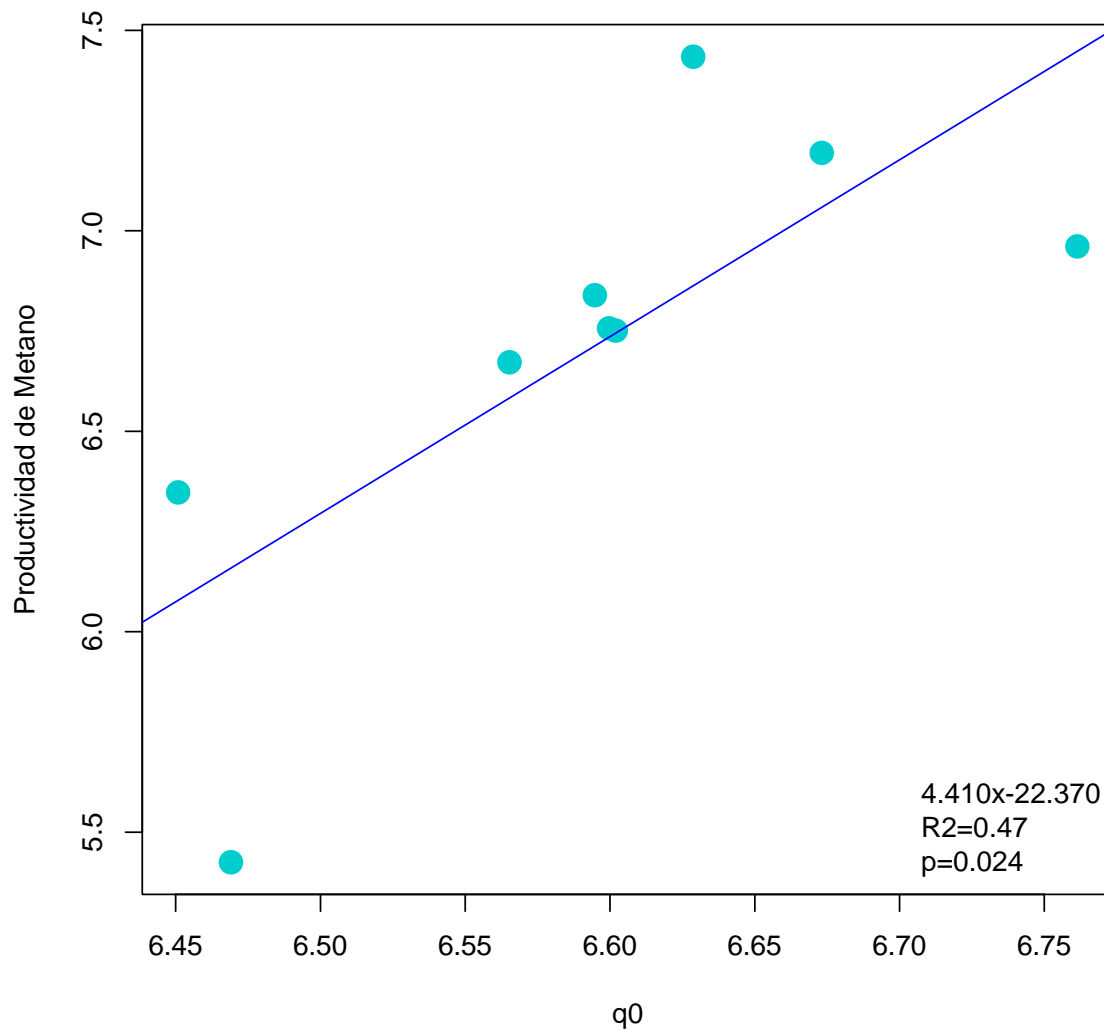


Fig. 16. Modelo lineal del reactor metanogénico del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas. Se presenta la productividad de  $CH_4$  como una función de la medida de diversidad verdadera de orden  $q=0$  ( ${}^0D$ ).

## 6.2.2 Comunidad microbiana del Reactor Metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas.

En este sistema, la calidad del muestreo de las diferentes comunidades fue variable (Fig. 17), aunque la mayor parte de las muestras se acercan a la asíntota, a excepción de dos muestras.

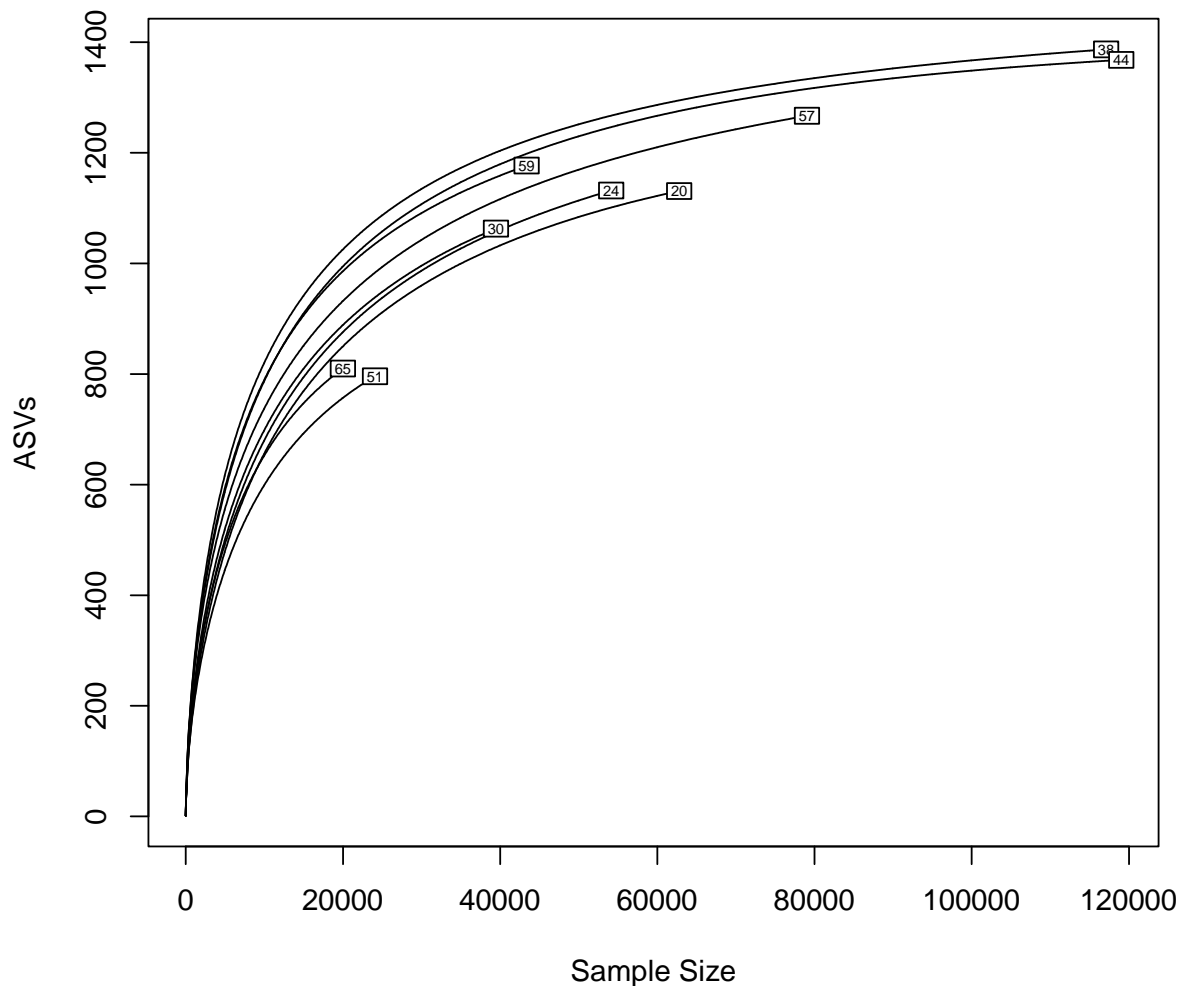


Fig. 17. Curvas de rarefacción de las muestras del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. Los números representan los días de la operación en los que se realizó el muestreo.

A partir del muestreo de la comunidad en el tiempo, se identificaron 1587 ASVs en total, distribuidas en 34 phyla (Fig. 18), de las cuales el 73% pudo ser identificada hasta

género, encontrándose un total de 205. El reactor estuvo dominado principalmente por phyla de bacterias sintróficas oxidadoras de acetato (BSOA) pertenecientes a Synergistota ( $45.31 \pm 8.6\%$ ) y Firmicutes ( $13.66 \pm 5.36\%$ ), los cuales tuvieron la mayor abundancia relativa durante los TRH de 2 y 1 día, en los que se obtuvieron las mayores productividades de  $\text{CH}_4$ .

Lo anterior, puede estar relacionado a una mayor  $\text{CO}$ , ya que ambos phyla pudieron enriquecerse, debido a su capacidad para oxidar acetato en sintrofia con metanógenos hidrogenotróficos (Sitthi et al., 2020). Este enriquecimiento, coincide con lo reportado por Xu et al. (2018), quienes observaron un enriquecimiento de algunos phyla como Firmicutes al aumentar la materia orgánica disponible con la  $\text{CO}$ .

Esta interacción mutualista entre BSOA y arqueas hidrogenotróficas, se evidencia al observar también un enriquecimiento de *Methanobacterium* y *Methanolinea* del phylum Euryarcheota, con el aumento de la  $\text{CO}$ , particularmente al inicio del TRH de 2 días y 1 días, aunque esta tendencia va disminuyendo conforme la comunidad se adapta a las nuevas condiciones generadas por el cambio en la  $\text{CO}$ .

En contraste, durante el aumento de la  $\text{CO}$ , se observó una disminución en la abundancia del metanógenos acetoclásticos como *Methanosaeta* (Halobacterota). Este género ha sido reportado como un especialista con gran afinidad por el acetato, el cual es mucho más eficiente cuando las concentraciones de acetato en el medio son bajas (Conklin et al., 2006; Rincón et al., 2013). Esto concuerda con el aumento de este metabolito durante la operación, el cual fue de  $211 \pm 178$  mg/l durante el TRH de 3 días, y  $>940$  mg/l durante los TRH de 2 y 1 días. Además, las concentraciones de propionato a partir del TRH de 2 días, fueron en promedio 2570 mg/l o 4110 mg  $\text{DQO}_{\text{eq}}/\text{l}$  (Fig. 10), por lo que también pudieron haber inhibido a estos metanógenos.

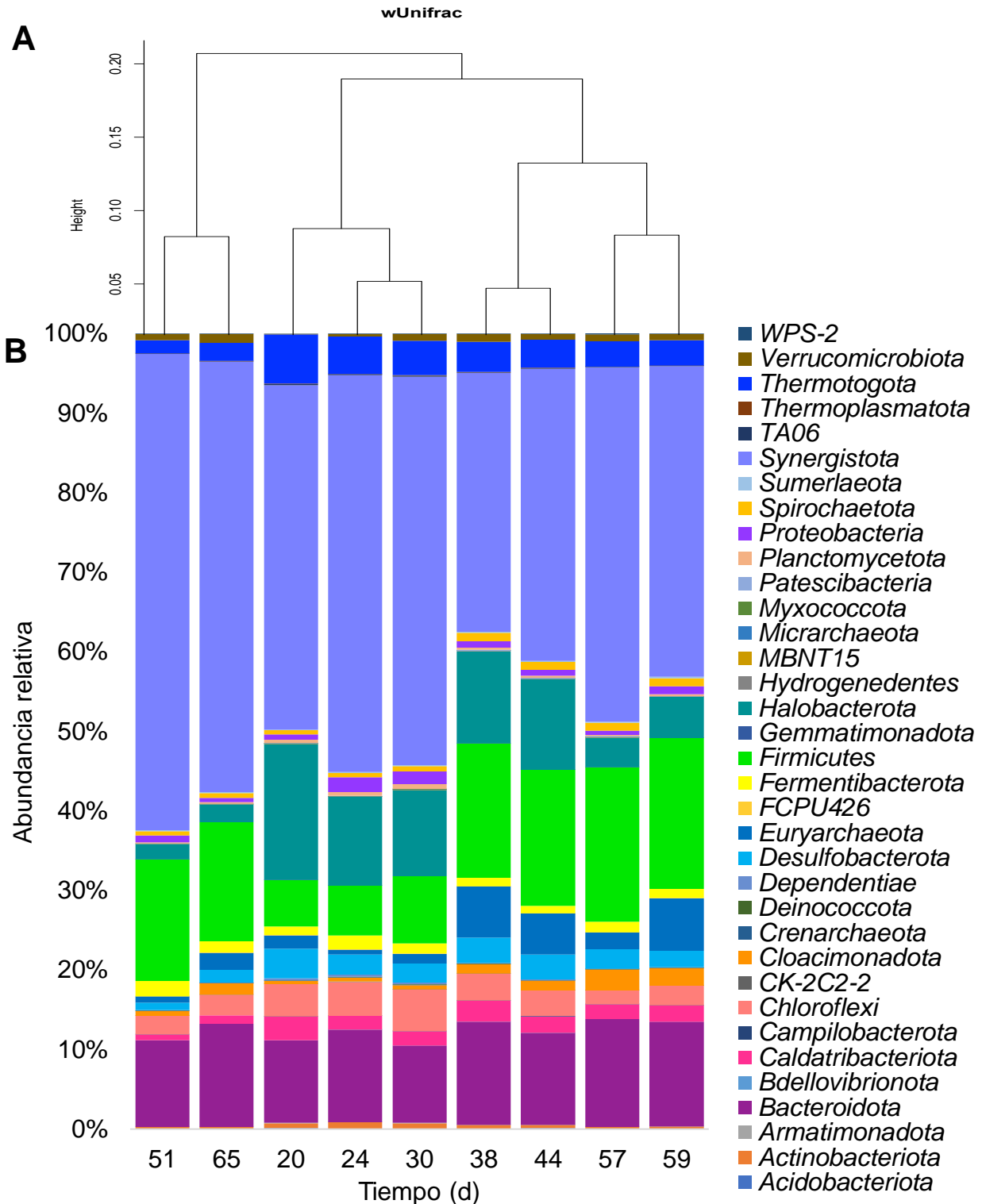


Fig. 18. Comunidad microbiana del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. (A) Dendrograma de la distancia Unifrac ponderada. (B) Abundancia relativa de los phyla identificados.

Sin embargo, gracias a la redundancia metabólica entre metanógenos acetoclásticos y BSOA, este sistema pudo haber mantener la productividad de CH<sub>4</sub> a niveles similares durante los TRH de 2 y 1 días, pero vía hidrogenotrófica en asociación sintrófica con BSOA, ya que es comparable en productividad con la vía acetoclástica (Park et al., 2019).

Por otro lado, dadas las características del sustrato, también se identificaron bacterias anaerobias estrictas como *Proteiniphilum* (Bacteroidota), características por degradar compuestos proteicos y fermentarlos para formar acetato y propionato (Chen y Dong, 2005), así como *Mesotoga* (Thermotogota), característico por reducir compuestos azufrados y oxidar acetato, además de producir poco hidrógeno (Nesbø et al., 2018)

Por otro lado, de acuerdo a la distancia Unifrac ponderada, la estructura de las comunidades formó tres clústeres microbianos (Fig. 18). Uno de ellos estuvo conformado por las comunidades correspondientes al TRH de 3 días (días 20, 24 y 30), en el segundo estuvieron mezcladas las comunidades del TRH de 2 y 1 días (días 38, 44, 57 y 59) y en el tercero las dos comunidades restantes de los TRH de 2 y 1 días (días 51 y 65).

De acuerdo a lo anterior, se analizó la dinámica de las comunidades a través del PCoA basado en distancia Unifrac (Fig. 19), en el que la varianza explicada representa hasta el 46% y en conjunto con el PCo2, el 86% del total observado. En este análisis se observa una clara distinción del clúster conformado por las comunidades del TRH de 3 días (días 20, 24 y 30); en cambio, las comunidades del TRH de 2 días (días 38, 44, 51 y 57) se separan entre sí a lo largo del PCo1. Esta misma tendencia es observada para las muestras del TRH de 1 día (días 59 y 65). Sin embargo, en el PCo2 puede observarse que las comunidades de los días 38, 44, 57 y 59, corresponden a aquellas que tuvieron las mayores productividades de CH<sub>4</sub> con los TRH de 1 y 2 días.

### PCoA (Unifrac) de Efluentes Vitivinícolas 1 etapa

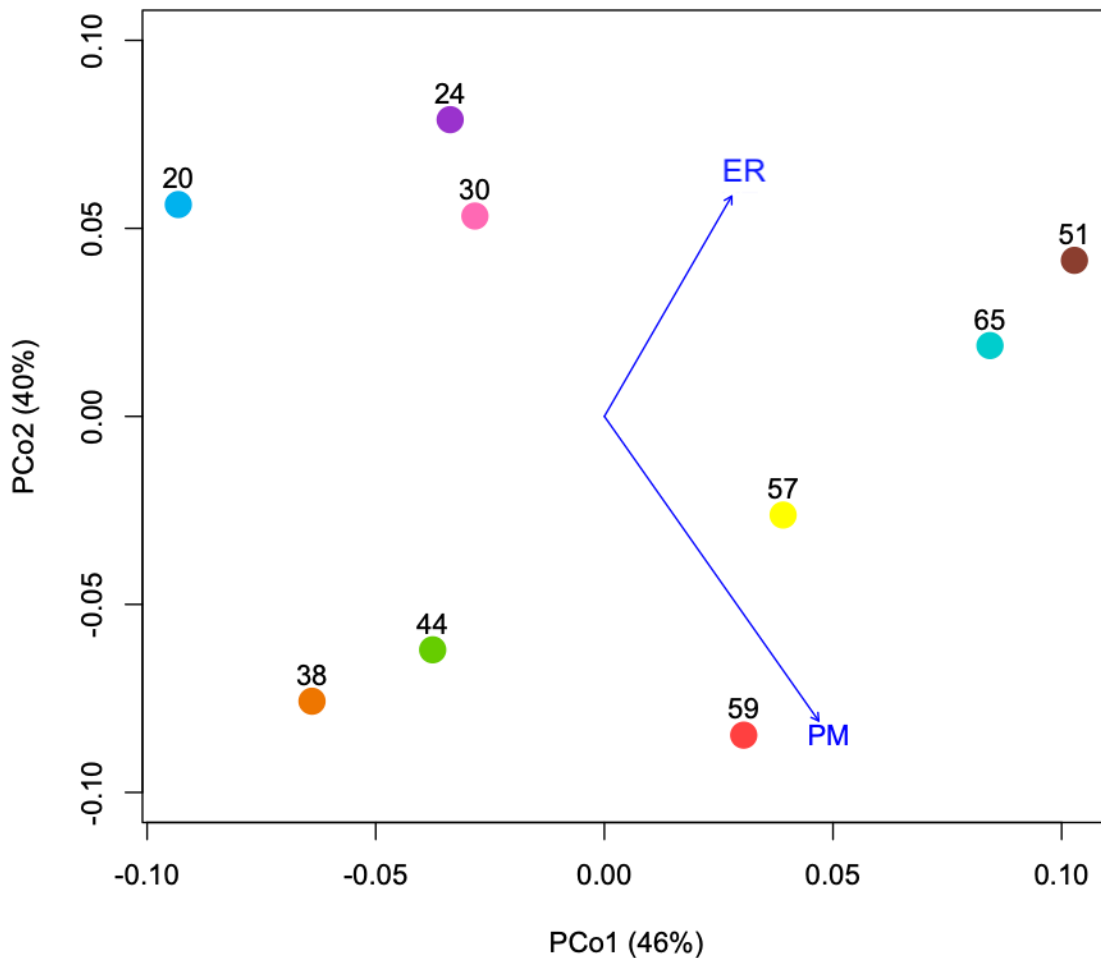


Fig. 19. Diagrama ordenación del Análisis de Coordinados Principales (PCoA) basado en distancia Unifrac ponderada de la comunidad microbiana durante la operación del reactor del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. Se muestra la productividad de  $\text{CH}_4$  (ml de  $\text{CH}_4$ /l d) (PM), la eficiencia de remoción del sustrato (%) (ER), las comunidades microbianas (círculos) y los días de muestreo (números). El vector representa la dirección del gradiente de las variables, y su longitud es proporcional a la correlación entre la ordenación y las variables.

Por otro lado, a pesar de que las comunidades del TRH de 1 día (días 59 y 65), se caracterizaron por tener las mayores productividades (2158 y 1848 ml  $\text{CH}_4$ /l d) durante toda la operación del reactor, ambas divergen entre sí. Esto a pesar de encontrarse bajo

las mismas condiciones de operación. En contraste, las comunidades del clúster 3, ambas posteriores a los picos de productividad asociados al recién aumento de la CO, presentaron mayores similitudes (días 51 y 65), así como aquellas comunidades que conformaron al clúster 2 (días 38, 44, 57 y 59), posteriores a las comunidades asociadas a los picos de productividad con aumento de la CO (clúster 3) (Fig. 18).

Esta similitud entre las comunidades asociadas al aumento de la CO y posterior a esta, puede deberse al efecto que tiene el choque de nutrientes, ya que los microorganismos de manera paulatina, presentan complicaciones para mantener el consumo de la gran cantidad de nutrientes en el medio, debido al daño causado por el estrés osmótico en las membranas celulares, lo que puede disminuir el rendimiento, aunque también existen otros factores (Azevedo et al., 2012).

Entre los factores que suelen describirse en biorreactores, se encuentran las limitaciones por el tipo de mezclado, lo que conlleva a condiciones heterogéneas, ya sea en la concentración del sustrato, el pH, los gases disueltos y otros parámetros, siendo los gradientes de sustrato, uno de los mayores involucrados en la reducción del desempeño. Esto puede deberse a un fenómeno conocido como desbordamiento metabólico o “energy spilling”, el cual es considerado como un “trade off” (Vasilakou et al., 2020).

El fenómeno de “energy spilling”, consiste en que los microorganismos se adaptan a la dinámica ambiental, al incrementar la tasa de asimilación del sustrato, inmediatamente después del aumento de la concentración. A pesar de esto, se ha observado que la tasa disminuye mucho antes de que las concentraciones del sustrato en el medio lo hagan. Esto indica que existen limitaciones intracelulares involucradas, un ejemplo es el aglomerado macromolecular, en el que las macromoléculas ocupan gran parte del espacio intracelular, lo que afecta la tasa de actividad enzimática y por lo tanto el crecimiento (Vasilakou et al., 2020).

De acuerdo a lo anterior, es posible que este fenómeno fuera observado en este reactor, ya que si bien ha sido poco descrito en estudios longitudinales en biorreactores



(Vasilakou et al., 2020), sí se ha establecido en metanógenos (Russell, 2007; Schönheit et al., 1980). Esto se debe a que microorganismos como las arqueas, se encuentran de manera habitual bajo limitaciones energéticas extremas, por lo que suelen ser más eficientes con concentraciones bajas en el medio de precursores de CH<sub>4</sub> como el H<sub>2</sub>, lo cual ya ha sido demostrado experimentalmente (Schönheit et al., 1980).

Por consiguiente, en caso de estar bajo un excedente energético, este es disipado mediante otras actividades metabólicas, diferentes al crecimiento o productividad, con el objeto de mantener un uso energético eficiente (Chen, et al., 2016; Russell, 2007). Esto puede explicar porqué pudo disminuir la productividad observada después del incremento de la CO con el TRH de 1 día en este reactor. Además, concuerda con la formación de isovalerato durante la CO más alta con el TRH de 1 día (Fig. 10 B).

Se ha identificado al isovalerato, como un intermediario clave en la degradación de proteínas y aminoácidos; donde su oxidación es termodinámicamente desfavorable cuando existe una acumulación de otros metabolitos como el acetato, H<sub>2</sub> y formato. Por esta razón, las bacterias sintróficas oxidadoras de isovalerato (BSOI) como Peptococcaceae (Firmicutes) y Syntrophaceae (Desulfobacterota), interactúan con las arqueas (Li et al., 2020).

La acumulación de acetato y por consiguiente la formación de isovalerato, concuerda con lo observado durante los días 59 y 65 del TRH de 1 día (Fig. 10). Además, durante este tiempo, se identificaron individuos de Peptococcaceae y Syntrophus de la familia Syntrophaceae, los cuales tuvieron una abundancia inversamente proporcional a la acumulación de acetato y formación de isovalerato durante el TRH de 1 día (Fig. 10). Esto puede explicar porqué en el día 65, la productividad no se mantuvo igual a la de los primeros días del cambio de CO (Fig. 7).

Por otro lado, en cuanto a los resultados obtenidos a partir del ajuste de los vectores en el espacio de ordenamiento (Fig. 19), se encontró que la productividad de CH<sub>4</sub>, tuvo una relación alta y significativa con la diversidad beta de estas comunidades

( $r^2 = 0.68$ ,  $p = 0.024$ ), así como con el rendimiento ( $r^2 = 0.62$ ,  $p = 0.046$ ). Sin embargo, debido a la colinealidad entre ambos parámetros ( $VIF=15$ ), únicamente se muestra la productividad de  $CH_4$  en el ordenamiento (Fig. 19). En cuanto a la ER, la tendencia fue menor y no significativa ( $r^2= 0.32$ ,  $p = 0.285$ ).

Ahora bien, de acuerdo al PERMANOVA, los factores abióticos que se relacionaron de manera significativa la diversidad beta de la comunidad, fueron las variables de operación como la CO y el TRH. Ambas variables tuvieron una relación moderada y significativa, aunque el TRH mostró ligeramente un mayor efecto ( $r^2= 0.37$ ,  $p = 0.007$ ) con respecto a la CO ( $r^2= 0.28$ ,  $p = 0.049$ ).

Al analizar las diferencias entre las comunidades mediante la diversidad alfa (Tabla 8), se encontró que la riqueza de ASVobs fue de  $1125 \pm 212$  ASVs, mientras que la riqueza calculada ( $^0D$ ), fue de  $1256 \pm 187$  ASVs efectivas. En ambos casos, todas las comunidades presentaron valores  $>1000$  ASVs, a excepción de las comunidades de los días 51 y 65, que se caracterizaron por presentar la menor riqueza.

La baja riqueza de las comunidades de los días 51 y 65, puede relacionarse con que el tamaño de muestra fue menor al del resto de las comunidades (Fig. 16). Esto puede deberse a que los inventarios derivados de técnicas moleculares, son propensos a presentar un número desigual de individuos o secuencias entre muestras, lo que puede afectar también algunas métricas de diversidad como Shannon y Simpson, así como índices de similitud (Budka et al., 2019; Hughes y Hellmann, 2005). Sin embargo, en las métricas de diversidad restantes, esta tendencia no se mantuvo (Tabla 8), e incluso la distancia Unifrac las mostró como comunidades pertenecientes a clústeres distintos (Fig. 18).

Tabla 8. Diversidad alfa del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas

Muestra (d)	ASVobs	Shannon	Simpson	<sup>0</sup> D	<sup>1</sup> D	<sup>2</sup> D
20	1131	4.537	0.972	1242.805	93.366	36.033
24	1132	4.558	0.968	1308.903	95.349	31.705
30	1063	4.699	0.973	1232.323	109.838	36.925
38	1387	5.150	0.985	1450.330	172.350	66.185
44	1368	5.065	0.984	1403.815	158.430	61.061
51	796	4.442	0.967	943.900	84.943	29.953
57	1267	4.963	0.980	1416.659	142.993	49.424
59	1177	5.132	0.985	1350.643	169.325	67.630
65	810	4.732	0.977	962.000	113.575	42.878

Por otro lado, el índice de Shannon estuvo en un rango de 4.442 y 5.150, y al transformarlo en <sup>1</sup>D, se encontró que las comunidades que produjeron la mayor cantidad de metano (días 38, 44 y 59), son aquellas que presentaron la mayor diversidad de especies igualmente comunes (172,158 y 169 ASVs respectivamente), sin embargo, esta relación fue apenas significativa (Pearson  $r = 0.65$ ,  $p = 0.054$ ) (Fig. 20).

Respecto al índice de Simpson, todas las comunidades tuvieron valores mayores a 0.96, y al ser transformado en <sup>2</sup>D, se encontró que las comunidades dominadas por un mayor número de ASVs (>60 ASVs), fueron aquellas que presentaron las mayores productividades de CH<sub>4</sub> (días 30, 38 y 59). Por lo que el grado de dominancia de las comunidades tuvo una gran importancia en la productividad y fue la única métrica significativa (Pearson  $r = 0.68$ ,  $p = 0.042$ ) (Fig. 20). Esta tendencia también fue observada para el rendimiento, aunque apenas significativa (Pearson  $r = 0.65$ ,  $p = 0.059$ ).

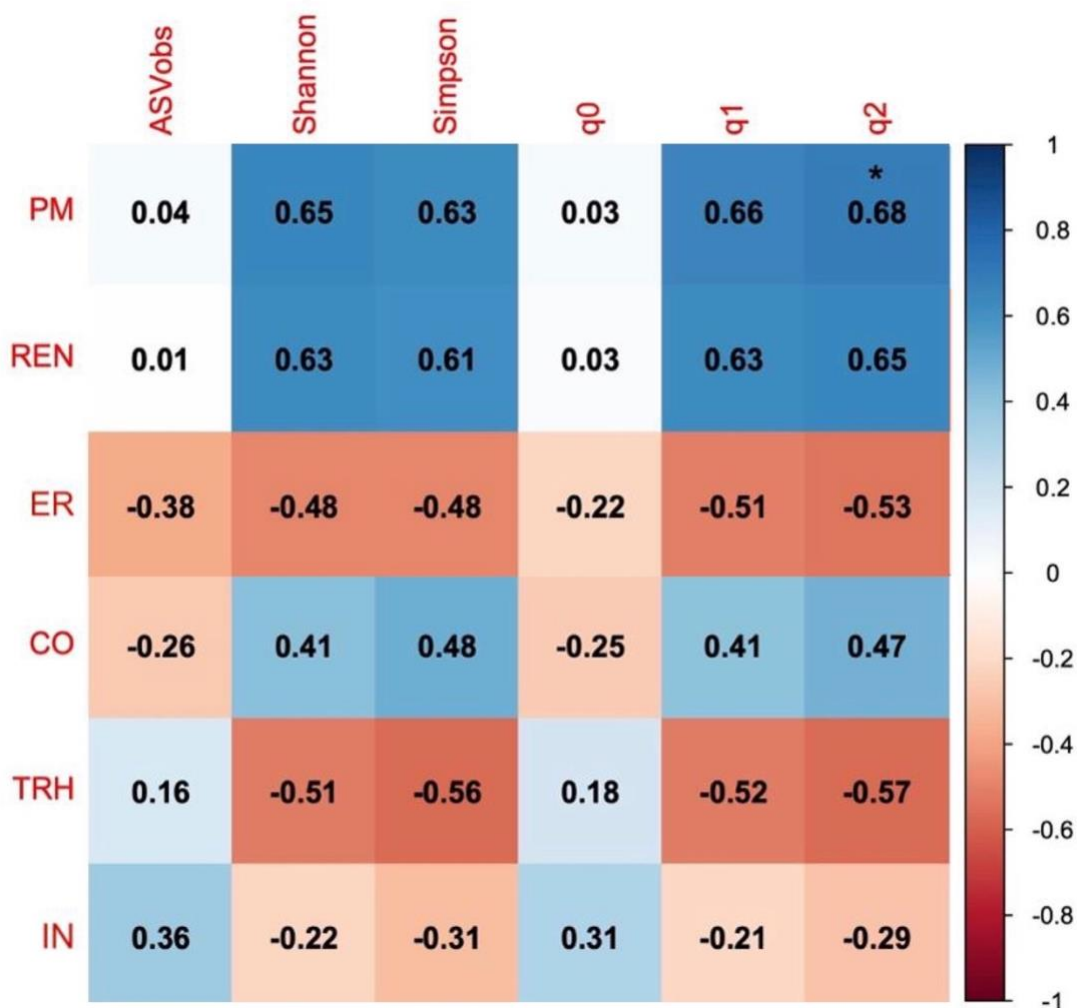


Fig. 20. Correlograma de las métricas de diversidad alfa, condiciones de operación y variables de respuesta del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. Se muestra el TRH (d), CO (g DQO/l d) y concentración del influente (g DQO/l d) (IN), así como variables de respuesta como productividad de CH<sub>4</sub> (ml de CH<sub>4</sub>/l d) (PM), rendimiento (l CH<sub>4</sub>/g DQO) (REN), eficiencia de remoción (%) (RE). Los números representan el coeficiente de correlación de Pearson. \*Significancia  $p \leq 0.05$ .

De acuerdo a las tendencias antes descritas, se procedió a realizar el modelo lineal, usando como predictores de la productividad de CH<sub>4</sub>, a las métricas de diversidad alfa calculadas (Anexo 3). En este caso, la productividad de CH<sub>4</sub> como una función de <sup>2</sup>D, probó ser el mejor modelo (AIC=131.41), al explicar significativamente una proporción media de la varianza ( $R^2 = 0.47$ ,  $F_{1,7} = 6.16$ ,  $p = 0.042$ ; Shapiro-Wilk = 0.96939,  $p = 0.8895$ )

(Fig. 21). Este modelo indica que la productividad de CH<sub>4</sub> del reactor, tuvo una relación directamente proporcional al grado de dominancia que tuvieron las comunidades. Por lo tanto, las comunidades que se encontraron dominadas por un menor número de ASVs, fueron aquellas que tuvieron las productividades menores, ya que por cada ASV dominante adicional, en promedio la productividad de CH<sub>4</sub> aumentó 17 ml de CH<sub>4</sub>/l.d.

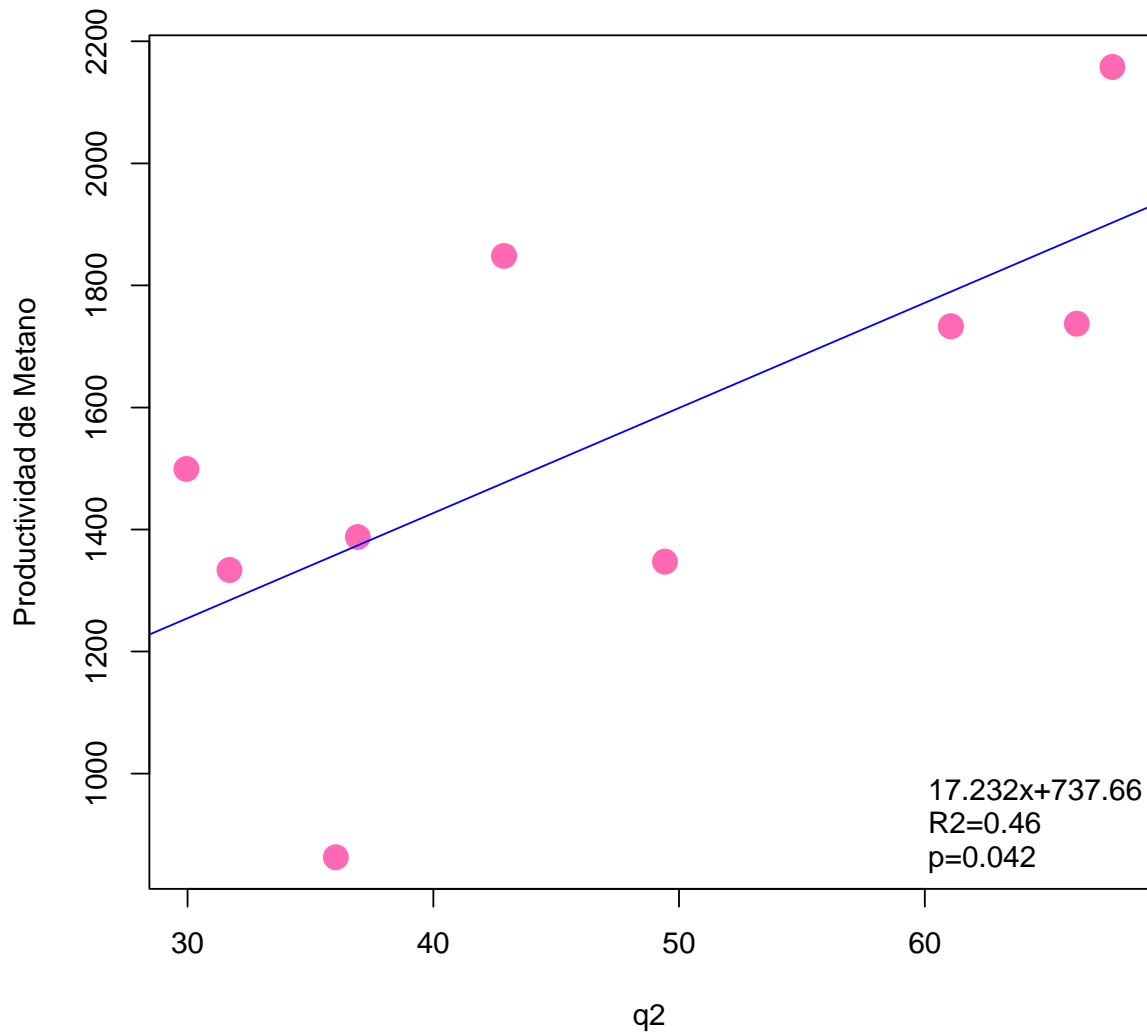


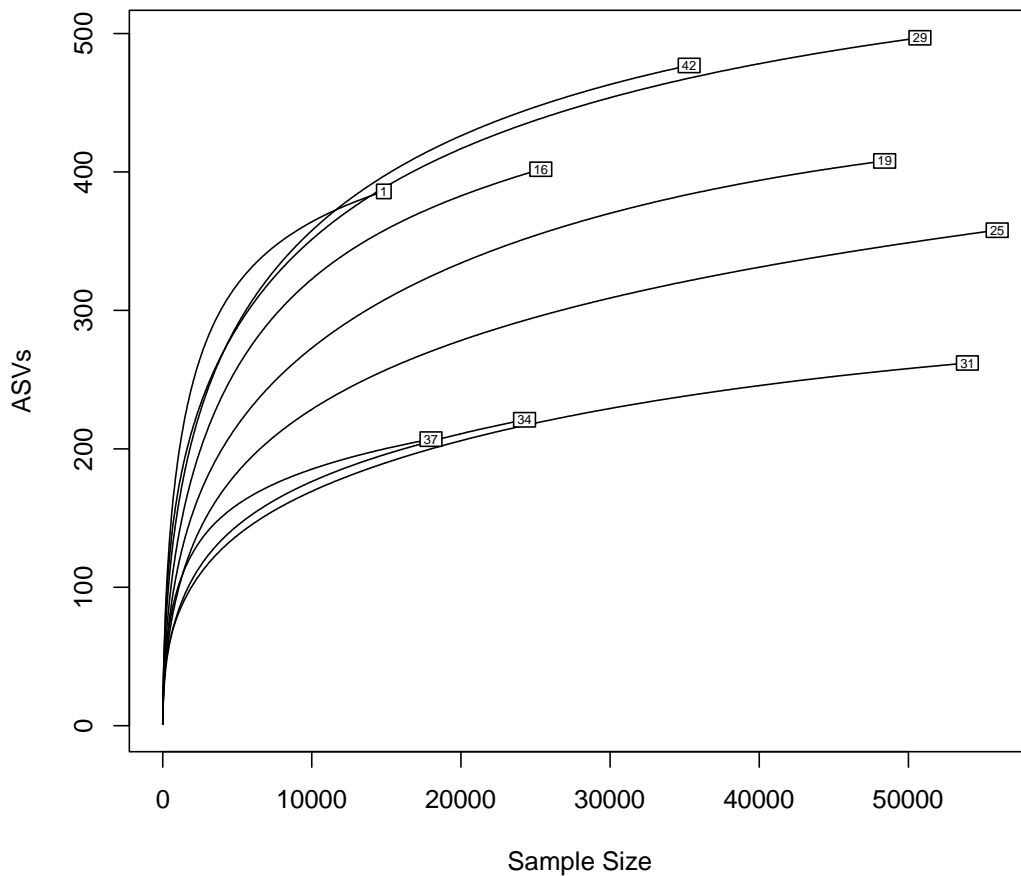
Fig. 21. Modelo lineal del reactor metanogénico del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas. Se presenta la productividad de CH<sub>4</sub> como una función de la medida de diversidad verdadera de orden  $q=2$  ( ${}^2D$ ).

Esta relación entre la productividad y los taxa dominantes, puede deberse a que estos presentan caracteres altamente competitivos, que les confieren ventajas adaptativas. Por lo tanto, permiten la funcionalidad del ecosistema, ya que estos suelen ser más eficientes en el aprovechamiento de los recursos y por lo que aumentan la productividad primaria del ecosistema (Cheng et al., 2018; Jorgensen y Fath, 2014).

Lo anterior, concuerda con que este sistema fue operado en una etapa y los phyla dominantes como Firmicutes y Synergistota, participan en las primeras etapas de la digestión anaerobia, las cuales son etapas limitantes en la productividad de CH<sub>4</sub>, por lo que pudieron determinar la dinámica de la comunidad, y por lo tanto influir en la productividad (Wenjin et al., 2016).

### 6.2.3 Comunidad microbiana del Reactor Metanogénico de Residuos alimenticios

Si bien en este reactor todas las muestras se acercan a la asíntota (Fig. 22), el número de ASVs poco homogénea. Por esta razón, en este caso sí se rarificaron las muestras.



*Fig. 22. Curvas de rarefacción de las muestras del reactor metanogénico de residuos alimenticios. Los números representan el ciclo en el que se tomaron las muestras y se muestran las curvas no rarificadas.*

En este reactor, se identificaron 706 ASVs, pertenecientes a 26 phyla (Fig. 23), de los cuales el 63% se identificó hasta género, con un total de 150. El 94% de la comunidad

microbiana, perteneció a los phyla Firmicutes (57±19%), Synergistota (26±10%), Bacteroidota (7±11%) y Halobacterota (3±4%), los cuales presentaron cambios en sus abundancias relativas a lo largo del tiempo, diferenciando a las comunidades en 3 clústeres de acuerdo a la distancia Unifrac no ponderada (Fig .23).

El primer clúster, estuvo conformado por las comunidades de los ciclos 1, 29 y 42, caracterizados tener las menores productividades (6.4, 10.5 y 66.9 ml de CH<sub>4</sub>/l d). Por otro lado, el segundo clúster estuvo conformado por los ciclos 16 y 19 con productividades de 279.1 y 672.0 ml de CH<sub>4</sub>/l d, respectivamente. Por último, el tercer clúster estuvo conformado por los ciclos 25, 31, 34 y 37 con productividades de 281.0, 677.4, 607.2 y 376.1, respectivamente.

Los phyla bacterias dominantes como Firmicutes y Synergistota, han sido asociados principalmente a la fermentación de carbohidratos, proteínas y aminoácidos para la producción de AGVs como acetato y propionato (Bouanane-Darenfed et al., 2014; Chen y Dong, 2015; Dahle y Birkeland, 2006; Díaz et al., 2007; Hamdi et al., 2015; Slobodkin, 2017), aunque también se identificaron BSOA y BSOP, también capaces de reducir compuestos azufrados como Syntrophobacter (Desulfobacterota) y Mesotoga (Thermotogota).

Respecto a las arqueas, el phylum Halobacterota estuvo conformado principalmente por Methanosaeta, el cual presentó las mayores abundancias relativas durante los ciclos con las menores productividades (clúster 1 y 2). Esta misma tendencia, también se observó por parte de Methanobacterium del phylum Euryarchaeota. Es posible que esta relación inversamente proporcional entre la abundancia relativa de los metanógenos y las productividades de CH<sub>4</sub>, esté relacionado con el esfuerzo de muestreo y/o el secuenciamiento.



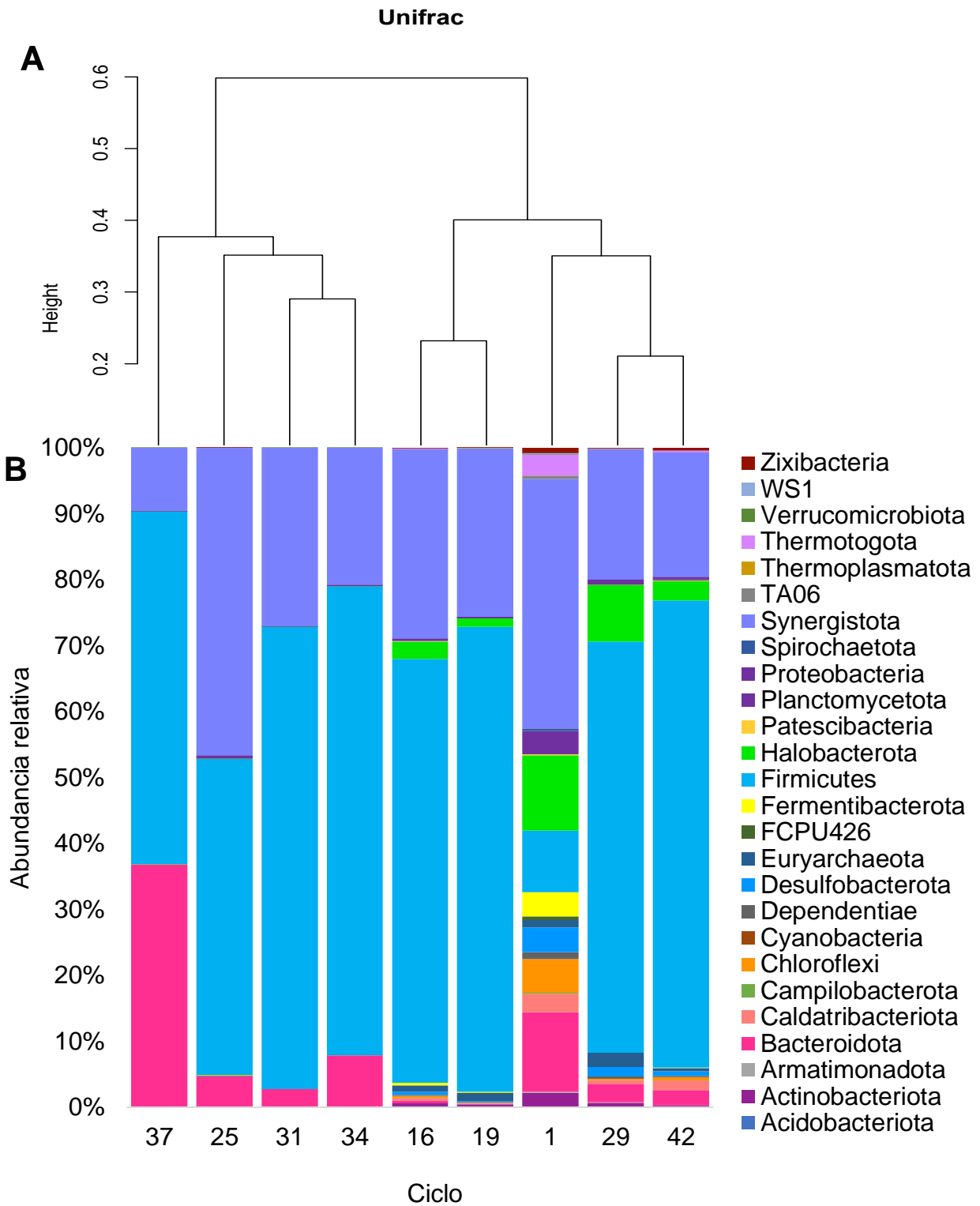


Fig. 23. Comunidad microbiana del reactor de residuos alimenticios. (A) Dendrograma de la distancia Unifrac ponderada. (B) Abundancia relativa de los phyla identificados

Lo anterior, es notorio en los ciclos del tercer clúster (37, 25, 31 y 34), en los que se ubicaron las comunidades con las mayores productividades de CH<sub>4</sub>, donde la abundancia relativa de arqueas fue extremadamente baja (0.004 a 0.1 %). Por lo que es posible que estas no lograran ser muestreadas y/o secuenciadas, ya que su presencia puede ser demostrada por las productividades de CH<sub>4</sub> durante esos ciclos (Fig. 11). Asimismo, en los clústeres 1 y 2, que tuvieron menores productividades, incluso las abundancias máximas llegaron a ser de hasta 8 a 11% en los ciclos 1 y 29, respectivamente. Estos valores concuerdan e incluso exceden las abundancias relativas del 1 al 5 % reportadas por otros trabajos que usan este tipo de sustrato (Koo et al., 2019; Li et al., 2016).

Por otro lado, al analizar la diversidad beta de las comunidades (Fig. 24), mediante el PCoA, se observó que a lo largo de ambos coordinados (PCo1 y PCo2), existe una clara divergencia de las comunidades con respecto al ciclo 1. Además, la productividad de CH<sub>4</sub> estuvo significativamente relacionada con la estructura de las comunidades de los diferentes ciclos ( $r^2=0.773$ ,  $p=0.048$ ). Por otro lado, al relacionar las condiciones de operación como la CO a través del PERMANOVA, se encontró que la diversidad beta de las comunidades estuvo asociada de manera moderada y significativamente a la CO ( $r^2=0.32$ ,  $p=0.028$ ). A pesar de esto, la variabilidad en el Treac durante la operación del reactor, no tuvo un efecto significativo ( $r^2=0.08$ ,  $p=0.611$ ).

### PCoA (Unifrac) de Residuos alimenticios

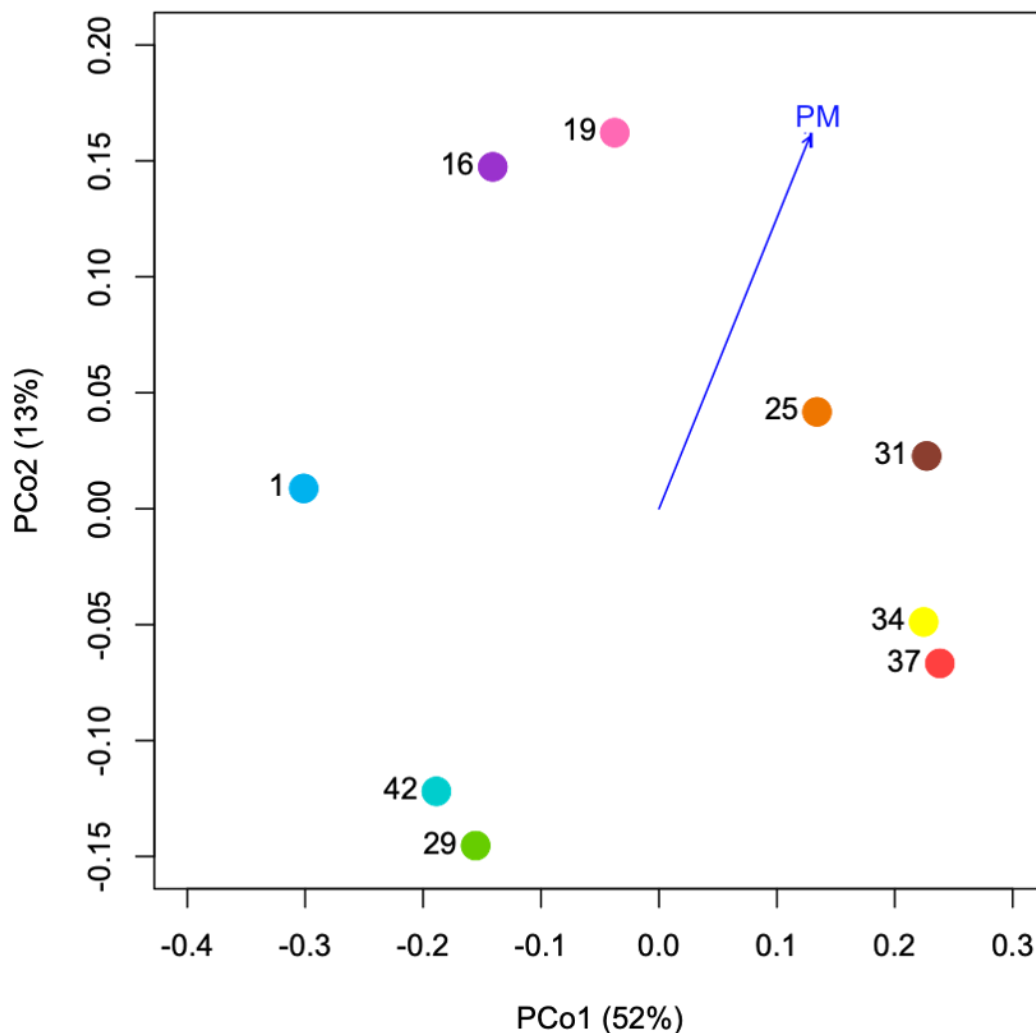


Fig. 24. Diagrama ordenación del Análisis de Coordinados Principales (PCoA) basado en distancia Unifrac no ponderada de la comunidad microbiana durante la operación del reactor de residuos alimenticios. Se muestra la productividad de  $\text{CH}_4$  (ml de  $\text{CH}_4$ /l d) (PM), las comunidades microbianas (círculos) y los ciclos de muestreo (números). El vector representa la dirección del gradiente de la variable PM, y la longitud del vector es proporcional a la correlación entre la ordenación y la variable PM.

Respecto a la diversidad alfa de los diferentes ciclos (Tabla 9), se encontró que la riqueza de ASVs fue de  $297 \pm 85$ , siendo las comunidades 31, 34, 37 y 25, las que

presentaron la menor riqueza ASVobs. A pesar de esto, estas comunidades tuvieron un rendimiento medio (28 a 63 ml de CH<sub>4</sub>/g SV) en comparación con las comunidades 16 y 19 que presentaron el mayor rendimiento (68 ml de CH<sub>4</sub>/g SV). Si bien esta relación entre <sup>0</sup>D y el rendimiento tuvo una relación directamente proporcional, esta no fue significativa (Fig. 25).

La tendencia antes descrita, también fue observada con <sup>0</sup>D, estimándose 363 ± 87 ASVs efectivas, entre las cuales la mayor riqueza fue asociada al ciclo 29. Este se caracterizó por tener la CO más baja (2.04 g SV/l d) y el Treac más largo (10 días), pero las productividades más bajas (10 ml de CH<sub>4</sub>/l d). Sin embargo, a pesar de la relación media entre la CO, el Treac y la productividad con la riqueza de ASVs, esta no fue significativa (Fig. 25).

*Tabla 9. Diversidad alfa del reactor metanogénico de residuos alimenticios*

Ciclo	ASVobs	Shannon	Simpson	q0	q1	q2
1	386	4.550	0.975	426.529	94.593	40.747
16	363	3.811	0.952	426.382	45.192	20.732
19	305	3.602	0.947	378.357	36.688	18.903
25	245	3.284	0.910	304.182	26.679	11.151
29	389	4.454	0.976	488.130	85.976	42.167
31	201	3.414	0.941	285.913	30.394	17.048
34	205	3.192	0.923	285.455	24.344	13.063
37	199	3.456	0.923	236.000	31.688	13.040
42	381	4.150	0.962	436.439	63.457	26.549

Respecto al índice de Shannon, todas las comunidades estuvieron entre 3.192 y 4.550. Al transformarla en <sup>1</sup>D, se encontró que esta medida de diversidad tuvo una relación inversamente proporcional a la productividad de CH<sub>4</sub> (Fig. 25), por lo que las comunidades con el mayor número de ASVs comunes, fueron aquellas que pertenecieron

a los ciclos (1, 20 y 42) que tuvieron las menores productividades (6.41, 10.53 y 66.92 l CH<sub>4</sub>/l d, respectivamente).

Por otro lado, respecto al índice de Simpson, todas las comunidades estuvieron por encima de 0.91, en cambio <sup>2</sup>D siguió la misma tendencia que el índice de Shannon, al presentar comunidades con el mayor número de ASV dominantes en los ciclos con las menores productividades de CH<sub>4</sub> (ciclos 1, 29 y 42). En contraste, el resto de los ciclos, estuvieron en un rango de 11 a 20 ASVs. De acuerdo a esto, <sup>2</sup>D tuvo una relación significativamente alta e inversamente proporcional a la productividad de CH<sub>4</sub> (Fig. 25).

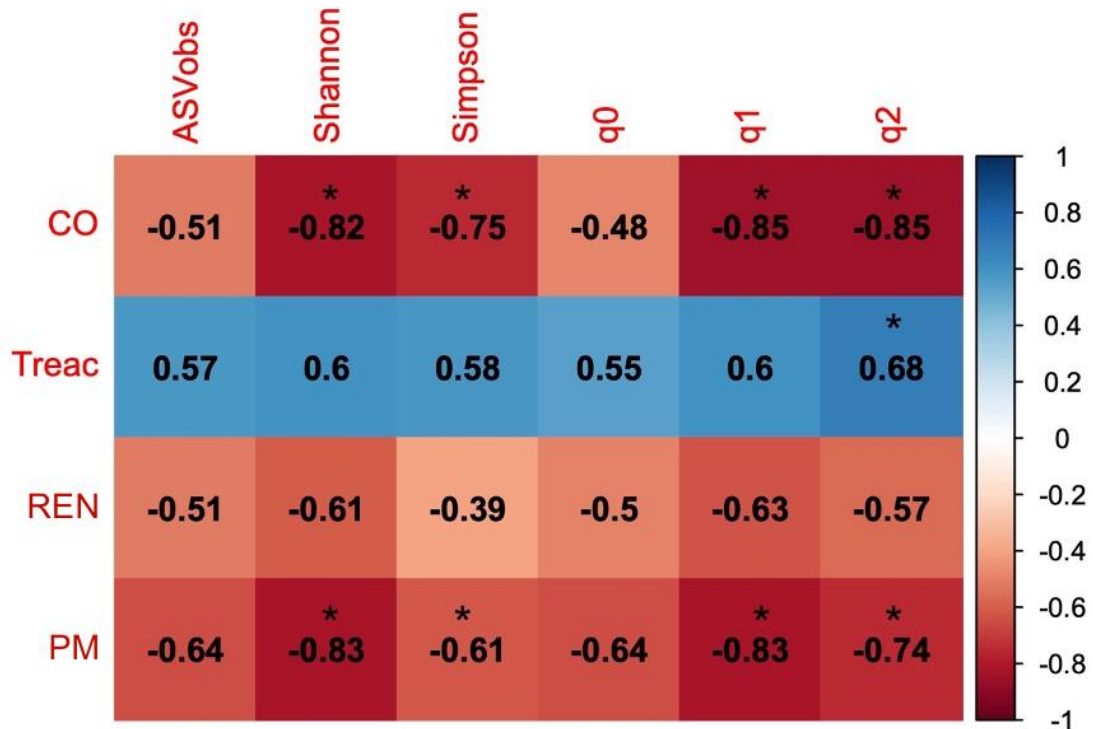


Fig. 25. Correlograma de las métricas de diversidad alfa con las condiciones de operación y variables de repuesta del reactor de residuos alimenticios. Se presenta la CO (g SV/l d) y Tiempo de reacción (h) (Treac), así como variables de respuesta como productividad de CH<sub>4</sub> (ml CH<sub>4</sub>/l d) (PM) y rendimiento (ml de CH<sub>4</sub>/g ST) (REN). Los números representan el coeficiente de correlación de Pearson. \*Significancia P ≤ 0.05.

De acuerdo a los patrones previamente descritos, se realizó un modelo lineal para explicar la productividad de CH<sub>4</sub> usando como variables predictoras las medidas de diversidad verdadera (Anexo 4). Entre estas, la productividad como una función de <sup>1</sup>D (Fig. 26) presentó una relación significativa e inversamente proporcional, y explica más de la mitad de la varianza observada ( $R^2 = 0.68$ ,  $F_{1,7} = 14.98$ ,  $p = 0.006$ ; Shapiro Wilks = 0.96716,  $p = 0.8694$ ).

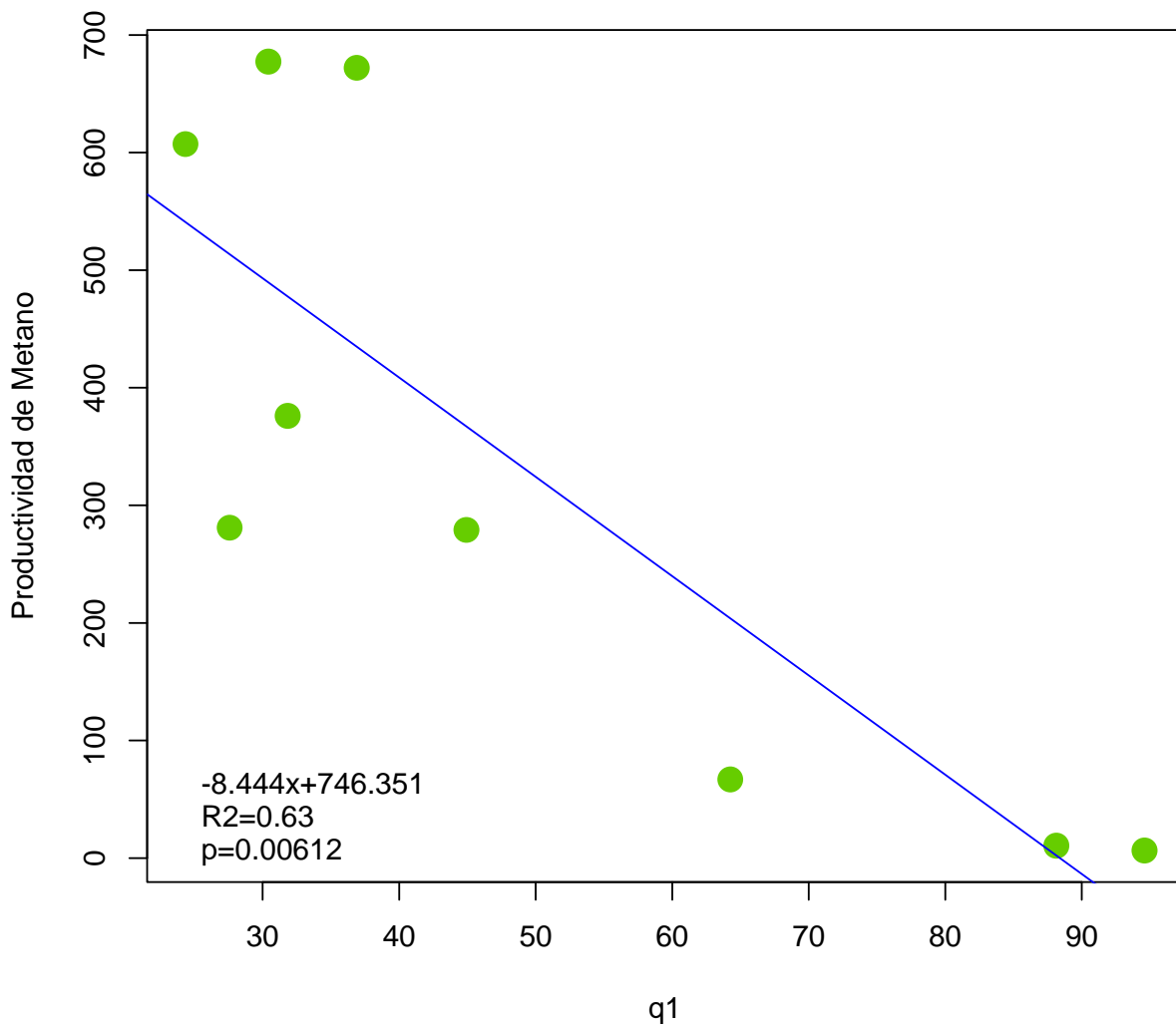


Fig. 26. Modelo lineal del reactor metanogénico de residuos alimenticios. Se presenta la productividad de CH<sub>4</sub> como una función de la medida de diversidad verdadera de orden  $q=1$  (<sup>1</sup>D).

Estos resultados indican que por cada ASV típica, puede esperarse en promedio una disminución en la productividad de 8.44 ml de CH<sub>4</sub>/l d, por lo que entre menos diverso es el núcleo de microorganismos la productividad mejora. Esto puede deberse a que la comunidad inicial al entrar en contacto con el sustrato, se encontró bajo una presión selectiva debido a sus características, ya que los residuos de alimentos suelen ser ricos en proteínas, y por consiguiente en nitrógeno amoniacal. Este último, es altamente tóxico, ya que puede entrar a la células por difusión pasiva, provocando un desbalance de protones, que en arqueas acetotróficas suele haber mayor susceptibilidad (Rui et al., 2015).

Esta interacción entre los microorganismos con el sustrato, pudo haber provocado una pérdida de especies, y al mismo tiempo generar un enriquecimiento de microorganismos especialistas, tolerantes a estas condiciones (Goux et al., 2015). Por esta razón, el núcleo de microorganismos típicos en esta comunidad, puede haberse conformado principalmente por microorganismos altamente especialistas con capacidades proteolíticas.

Sin embargo, si bien una comunidad que tiende hacia una de menor diversidad, puede mejorar las capacidades para la productividad de CH<sub>4</sub>, en comparación con una comunidad más diversa. Esto será así, siempre y cuando las condiciones de operación bajo las que se encuentre la comunidad sean poco variables (Calusinska et al., 2018).

La variabilidad o heterogeneidad ambiental es importante, debido a que una de las características de los microorganismos núcleo, suele ser la capacidad de resistir a las perturbaciones (Rui et al., 2015). Por esta razón, una alta especialización de las comunidades, implica que sean menos resilientes a cambios en las condiciones de operación (Ferguson et al., 2016). De acuerdo a esto, los cambios abruptos en la CO, pudieron afectar las productividades de CH<sub>4</sub> a partir del ciclo 40, para posteriormente decaer por completo (Fig. 10). Para evitar lo anterior, el proceso de aclimatación y el mantenimiento de condiciones de operación estables, como la CO, son importantes para

el desarrollo de una comunidad funcionalmente resistente a las condiciones ambientales, al desarrollar resiliencia y redundancia funcionales (Basak et al., 2021).

Es importante mencionar que, si bien la productividad de CH<sub>4</sub> cesó, la producción de CO<sub>2</sub> aumentó (Fig. 10); posiblemente debido a que a partir del último pico de CO (15 g SV/l d) en el ciclo 30, las relaciones sintróficas necesarias para que las arqueas produzcan CH<sub>4</sub> fueron afectadas. Esto debido a que la tasa de hidrólisis y acidogénesis aumentó, conllevando a una acumulación de AGVs, del cual la comunidad no pudo recuperarse debido al potencial de producir una acidificación irreversible (Wang et al., 2018).

Para evitar la inhibición por una CO alta, los sistemas convencionales de residuos alimenticios húmedos, suelen ser de hasta 4 g SV/l d, con lo que se han llegado a obtener rendimientos >300 ml de CH<sub>4</sub>/g SV. Aunque Nagao et al. (2012), han reportado operaciones estables con CO de 9.2 g SV/l, y rendimientos de 455 ml de CH<sub>4</sub>/g SV.

Sin embargo, en el sistema analizado en el presente estudio (Jiménez-Ocampo et al., 2021), con una CO similar ( $9 \pm 4$  g SV/l d), se obtuvieron rendimientos de apenas  $42 \pm 37$  ml de CH<sub>4</sub>/g SV o  $314 \pm 247$  ml de CH<sub>4</sub>/l d de productividad. Esta diferencia en la productividad con respecto a otros trabajos, puede deberse a la variabilidad en los Treac de 1.04 a 10 días, que provocaron cambios repentinos en la CO, lo que puede estar relacionado con esta baja productividad.

#### **6.2.4 Tendencias en la diversidad alfa de comunidades metanogénicas de la DA**

De acuerdo a los resultados de los reactores de efluentes vitivinícolas, es posible observar que el sistema en una etapa presentó en total una mayor riqueza de ASVs (1587 ASVs), con respecto al sistema en dos etapas (968 ASVs). Esto concuerda con que la digestión anaerobia de un sistema en una etapa, requiere microorganismos



pertenecientes a todos los grupos tróficos (Srisowmeya et al., 2020), particularmente los productores de AGVs y por lo tanto la riqueza esperada sería mayor.

Lo anterior, contrasta con el número de ASVs obtenido a partir del reactor de residuos alimenticios, en el que se identificó un total de 706 ASV. Esta menor cantidad de ASVs, puede deberse a las limitaciones de este sustrato, en la transferencia de masa de la fase sólida a líquida, en la que la hidrólisis de compuestos lipídicos y proteicos juega un papel importante. Esto debido a que puede generar la formación de compuestos inhibitorios para los metanógenos como AGCL, afectando la riqueza de ASVs.

Para evitar una inhibición, se requiere de una adecuada aclimatación de la comunidad microbiana, así como estrategias de operación particulares (Menzel et al., 2020). Sin embargo, Tonanzi et al. (2020), llegaron a identificar de 606 a 91 OTUs durante la DA de residuos alimenticios con CO de 0.8 a 1.7 g SV/l d, respectivamente. Por lo que si bien este dato no puede ser directamente comparado, por las limitaciones de las técnicas de obtención de OTUS, en comparación con las ASVs, sí es posible tomarlo como una referencia para los datos obtenidos en el presente estudio.

Por otro lado, los phyla bacterianos dominantes durante la operación de los reactores fueron Synergistota y Firmicutes, aunque el primero fue predominante con el sustrato soluble (efluentes vitivinícolas), en comparación con el reactor de sustrato particulado (residuos alimenticios), en el que Firmicutes predominó. Esta diferencia, puede relacionarse con las capacidades metabólicas de géneros que se encontraron dominantes en el reactor de residuos alimenticios como *Caldicoprobacter*, capaces de hidrolizar carbohidratos, así como *Tepidimicrobium*, con capacidades proteolíticas (Bouanane-Darenfed et al., 2014; Slobodkin 2017), necesarios para metabolizar un sustrato complejo como los residuos alimenticios.

En contraste, los reactores de efluentes vitivinícolas presentaron un mayor enriquecimiento de microorganismos BSOA con capacidades proteolíticas, pertenecientes a Synergistota (Wilkins et al. 2015 ). Este metabolismo de proteínas a su

vez, puede generar propionato (Menzel et al., 2020), el cual se identificó en el sistema en una y dos etapas y pudo haber limitado las productividades de CH<sub>4</sub>. Aunque en el sistema en una etapa, la acumulación de acetato y la dinámica de las poblaciones de BSOI pudieron haber estado más relacionadas con las productividades obtenidas (Conklin et al., 2006; Rincón et al., 2013; Li et al., 2020), especialmente durante la CO más alta.

A pesar de las diferencias mencionadas en la abundancia relativa de los phyla Firmicutes y Synergistota, estos han sido identificados como parte del núcleo de microorganismos característicos de la DA (Wilkins et al., 2015). Además, las arqueas *Methanosaeta* y *Methanobacterium*, acetoclásticas e hidrogenotróficas respectivamente, fueron los que se encontraron en mayores abundancias en todos los sistemas. Esta similitud entre los phyla dominantes, así como la cercanía entre las productividades obtenidas entre los reactores de efluentes vitivinícolas, puede deberse a que el inóculo usado tenía el mismo origen (De Vrieze et al., 2015; Liu et al., 2017).

Otro factor que pudo influenciar la productividad de CH<sub>4</sub> entre los sistemas en una y dos etapas de efluentes vitivinícolas, es la capacidad de carga o el tamaño poblacional máximo que puede soportar un sistema (Brileya et al., 2014). Esto implica que, al incrementar la disponibilidad de sustrato, las poblaciones presentan un crecimiento exponencial. Debido a que este no puede ser mantenido indefinidamente, las poblaciones se acercan a los límites del sistema, al acumular biomasa, generando un agotamiento de nutrientes y la formación de compuestos inhibitorios, por lo que las comunidades se acercan a una fase estacionaria para después decaer (Mazzoleni et al., 2015).

En este sentido, si bien el cambio de la CO durante la operación reflejó una mayor tasa de conversión del sustrato a CH<sub>4</sub>, ambos reactores se acercaron a la capacidad de carga del sistema, lo que se infiere por las productividades similares. Incluso, esto concuerda con la similitud observada en las comunidades del sistema en una etapa, durante el aumento de la CO en los TRH de 2 y 1 días y los días posteriores, en los que, además, trade offs como el “energy spilling” (Vasilakou et al., 2020) pudieron jugar un

papel importante, indicando que la productividad, no necesariamente es directamente proporcional a la CO.

Por otro lado, a partir del uso de las medidas de diversidad verdadera o números de Hill, fue posible comparar la diversidad alfa de las comunidades en diferentes niveles (riqueza, dominancia y ASVs comunes). Además, la variación explicada por los diferentes modelos (47, 46 y 68%), si bien puede parecer baja, es similar e incluso mayor a lo reportado por otros estudios en los que se han usado métricas de diversidad alfa como variables predictoras (Sierocinski et al, 2018; Werner et al., 2011). Por ejemplo, Werner et al. (2011) determinaron que el 30% de la actividad metanogénica, podía ser explicada a través de coeficiente de Gini. Asimismo, Sierocinski et al. (2018) encontraron que el 47% de la variación observada en la producción de biogás, a partir de diferentes sustratos e inóculos, tuvo una relación lineal con la riqueza de arqueas.

Por último, el uso de las medidas de diversidad verdadera aplicadas a la DA, representaron una herramienta de gran importancia, ya que permitieron identificar tendencias en la diversidad alfa de las comunidades y compararlas entre sí, en especial cuando se investigan diferentes sistemas o condiciones experimentales (Alberdi y Gilbert, 2019), como en el presente trabajo. Con esto, es posible mantener un monitoreo de este proceso desde el punto de vista biológico, lo cual ha tomado relevancia en las últimas décadas, debido a que la diversidad biológica ha dejado de verse puramente como una consecuencia de las condiciones ambientales, sino como un factor con capacidad para explicar la funcionalidad de un ecosistema (Kang et al., 2016).

Asimismo, el uso de medidas de diversidad verdadera, posibilita que este monitoreo se realice bajo un marco de referencia confiable y sistemático, lo cual es necesario en especial en procesos microbianos como la DA, debido a los retos inherentes al estudio de la diversidad de microorganismos. Entre estos, se encuentra su gran diversidad, las técnicas moleculares y de secuenciamiento usadas, el procesamiento de datos, entre otras dificultades técnicas y/o metodológicas, que intervienen en la estimación verdadera de la diversidad de microorganismos (Kang et al., 2016; Modin

et al., 2020). Por esta razón, al estudiar a las comunidades microbianas de la DA, a través de las medidas de diversidad verdadera, es posible contribuir a esclarecer los mecanismos biológicos detrás de la funcionalidad de este proceso.

Es importante denotar que hasta el momento no se tienen registros de análisis de diversidad y funcionalidad de reactores metanogénicos, en los que se comparen con medidas de diversidad verdadera, sistemas en una y dos etapas de sustratos agroindustriales altamente contaminantes como lías y vinazas vitivinícolas, así como sustratos particulados, como los residuos alimenticios, que son generados en grandes cantidades a nivel nacional. A partir de esto, los alcances de la presente investigación, dan pie al desarrollo de nuevas preguntas relacionadas con la funcionalidad de procesos microbianos como la digestión anaerobia, con el objeto de facilitar su aplicación en mayor escala, y así contribuir al cambio hacia el uso de energías limpias y el desarrollo sustentable.

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos durante la presente investigación, fue posible identificar que la dinámica de las comunidades microbianas es clave en la funcionalidad de los sistemas de la digestión anaerobia. Esto fue evidenciado mediante los análisis de ordenamiento con distancia Unifrac, en los que la funcionalidad y/o el desempeño de los reactores, medido en términos de productividad de  $\text{CH}_4$ , fueron relacionados de manera positiva con la dinámica que las comunidades estudiadas tuvieron a lo largo del tiempo. En contraste, la eficiencia de remoción, no se relacionó significativamente con la dinámica de las comunidades, por lo que no representó un buen indicador de la funcionalidad de los sistemas de efluentes vitivinícolas.

Asimismo, de entre las variables de operación utilizadas, se observó que la carga orgánica tuvo una asociación positiva, en todos los reactores estudiados, por lo que fue el principal factor abiótico que se relacionó con la dinámica de las comunidades. Además, cada una de las diferentes comunidades, fueron sensibles de manera diferencial a otras condiciones. Por ejemplo, en el reactor del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas, la interacción de la carga orgánica con el sustrato, que fue cambiado por vinazas en lugar de lías, tuvo una relación positiva moderada con la dinámica de las comunidades. En cambio, en el sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas, el TRH tuvo una relación positiva mayor a la CO.

Por otro lado, respecto a las métricas de diversidad alfa aplicadas, las medidas de diversidad verdadera ( ${}^0\text{D}$ ,  ${}^1\text{D}$ ,  ${}^2\text{D}$ ), demostraron tener una relación significativa con parámetros de desempeño como la productividad de  $\text{CH}_4$ , la cual fue directamente proporcional para los reactores de efluentes vitivinícolas, e inversamente proporcional y para el reactor de residuos alimenticios, respectivamente. Asimismo, la utilidad de las medidas de diversidad verdadera como herramienta para el monitoreo biológico de la DA, se comprobó a través de modelos lineales, que explicaron significativamente la variabilidad observada en la productividad de  $\text{CH}_4$ , debido a los patrones de diversidad

alfa de cada una de las comunidades a diferencia de las métricas de diversidad clásicas que no tuvieron relaciones significativas en los modelos lineales.

Por último, si bien nuestros resultados coinciden con otros trabajos en los que se establece una relación lineal significativa entre la diversidad alfa y la funcionalidad del reactor, en ellos no utilizan medidas de diversidad verdadera, que sí fue motivo de este estudio. Específicamente, en el reactor del sistema en dos etapas de efluentes vitivinícolas, se encontró que la productividad de CH<sub>4</sub> fue directamente proporcional a la riqueza (<sup>0</sup>D), es decir que cada una de las ASVs de la comunidad, indistintamente de su abundancia, fue clave en la funcionalidad del sistema, lo cual puede deberse a las fuertes interacciones sintróficas, necesarias para la conversión de un sustrato proveniente de un reactor acidogénico, conformado principalmente por acetato y otros AGVs a metano.

En cambio, en el reactor del sistema en una etapa de efluentes vitivinícolas, la funcionalidad del reactor estuvo ligada a una comunidad con alto grado de dominancia (<sup>2</sup>D), siendo bacterias con capacidades hidrolíticas y fermentativas de los phyla Firmicutes y Synergistota, determinantes en el flujo de energía, al estar involucradas en las etapas limitantes del proceso completo de digestión anaerobia. En contraste, en el reactor de residuos alimenticios, la diversidad de ASVs típicas (<sup>1</sup>D) tuvo una mayor relevancia, debido a que la funcionalidad estuvo relacionada con una menor diversidad, asociada al desarrollo de un núcleo de microorganismos altamente especialistas en este sustrato.

## 8. REFERENCIAS

- Adolfo, R., y Huertas, P. (2015). Anaerobic digestión: biotechnological mechanisms in waste water treatments and their application in food industry. *Producción + Limpia*, 10(2), 142–159.
- Alberdi, A., y Gilbert, M. T. P. (2019). A guide to the application of Hill numbers to DNA-based diversity analyses. *Molecular Ecology Resources*, 19(4), 804–817.
- Almeida, A., Nafarrate-Rivera, E., Alvarado, A., Cervantes-Ovalle A, Luevanos, M. P. ., Oropeza, R., y Balagurusamy, N. (2011). Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. *Acta Química Mexicana*, 3(6), 14–33.
- Alvarado, A., Montañez-Hernández, L. E., Palacio-Molina, S. L., Oropeza-Navarro, R., Luévanos-Escareño, M. P., y Balagurusamy, N. (2014). Microbial trophic interactions and mcrA gene expression in monitoring of anaerobic digesters. *Frontiers in microbiology*, 5, 597.
- Alzate Moncada, M. S., y Quintero Silva, M. (2016). Characterization of trophic groups throughout an anaerobic digestion process with cattle manure slurry using a low-cost method. *Revista Investigación, Optimización y Nuevos procesos en Ingeniería*, 29(1), 117–123.
- Amha, Y. M., Corbett, M., y Smith, A. L. (2019). Two-Phase Improves Performance of Anaerobic Membrane Bioreactor Treatment of Food Waste at High Organic Loading Rates. *Environmental Science & Technology*, 53(16), 9572–9583.
- Anwar, N., Wang, W., Zhang, J., Li, Y., Chen, C., Liu, G., y Zhang, R. (2016). Effect of sodium salt on anaerobic digestion of kitchen waste. *Water Science and Technology*, 73(8), 1865–1871.
- APHA. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd editi; R. B. Baird, A. D. Eaton, y E. W. Rice, eds.). American Public Health Association.
- Azevedo, N. F., Bragança, S. M., Simes, L. C., Cerqueira, L., Almeida, C., Keevil, C. W., y Vieira, M. J. (2012). Proposal for a method to estimate nutrient shock effects in bacteria. *BMC Research Notes*, 5, 2–7.
- Baek, G., Kim, J., Kim, J., y Lee, C. (2018). Role and potential of direct interspecies electron

- transfer in anaerobic digestion. *Energies*, 11(1).
- Baldi, F., Pecorini, I., y Iannelli, R. (2019). Comparison of single-stage and two-stage anaerobic co-digestion of food waste and activated sludge for hydrogen and methane production. *Renewable Energy*, 143, 1755–1765.
- Barber, R. D. (2016). Methanogenesis: Ecology. *eLS*, (April), 1–9.
- Barros, V. G. de, Duda, R. M., Oliveira, R. A. de, Barros, V. G. de, Duda, R. M., y Oliveira, R. A. de. (2016). Biomethane production from vinasse in upflow anaerobic sludge blanket reactors inoculated with granular sludge. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 628–639.
- Basak, B., Patil, S. M., Saha, S., Kurade, M. B., Ha, G. S., Govindwar, S. P., Lee, S. S., Chang, S. W., Chungb, W. J. y Jeon, B. H. (2021). Rapid recovery of methane yield in organic overloaded-failed anaerobic digesters through bioaugmentation with acclimatized microbial consortium. *Science of the Total Environment*, 764, 144219.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A. Sanders, W. T., Siegrist, H. y Vavilin, V. a. (2002). Anaerobic Digestion Model No.1. *Iwa Publishing*, (1), 1–68.
- Begum, S., Anupaju, G. R., Sridhar, S., Bhargava, S. K., Jegatheesan, V., y Eshtiaghi, N. (2018). Evaluation of single and two stage anaerobic digestion of landfill leachate: Effect of pH and initial organic loading rate on volatile fatty acid (VFA) and biogas production. *Bioresource Technology*, 251, 364–373.
- Ben Said, S., y Or, D. (2017). Synthetic Microbial Ecology: Engineering Habitats for Modular Consortia. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1125.
- Borcard, D., Gillet, F., y Legendre, P. (2011). Numerical Ecology with R. En R. Gentleman, K. Hornik, & G. G. Parmigiani (Eds.), *Use R!*
- Bouanane-Darenfed, A., Fardeau, M.-L., y Ollivier, B. (2014). The Family Caldicoprobacteraceae. En *The Prokaryotes* (pp. 13–17).
- Briley, K. A., Camilleri, L. B., Zane, G. M., Wall, J. D., y Fields, M. W. (2014). Biofilm growth mode promotes maximum carrying capacity and community stability during product inhibition syntrophy. *Frontiers in Microbiology*, 5, 693.
- Budka, A., Łacka, A., y Szoszkiewicz, K. (2019). The use of rarefaction and extrapolation as methods of estimating the effects of river eutrophication on macrophyte diversity.



*Biodiversity and Conservation*, 28(2), 385–400.

- Bueno, P. C., Martín Rubí, J. A., García Giménez, R., y Jiménez Ballesta, R. (2009). Impacts caused by the addition of wine vinasse on some chemical and mineralogical properties of a Luvisol and a Vertisol in La Mancha (Central Spain). *Journal of Soils and Sediments*, 9(2), 121–128.
- Buitrón, G., Martínez-Valdez, F. J., y Ojeda, F. (2019). Biogas Production from a Highly Organic Loaded Winery Effluent Through a Two-Stage Process. *BioEnergy Research*, 12(3), 714–721.
- Cai, M., Wilkins, D., Chen, J., Ng, S. K., Lu, H., Jia, Y., y Lee, P. K. H. (2016). Metagenomic reconstruction of key anaerobic digestion pathways in municipal sludge and industrial wastewater biogas-producing systems. *Frontiers in Microbiology*, 7(778), 1–12.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., y Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.
- Calusinska, M., Goux, X., Fossépré, M., Muller, E. E. L., Wilmes, P., y Delfosse, P. (2018). A year of monitoring 20 mesophilic full-scale bioreactors reveals the existence of stable but different core microbiomes in bio-waste and wastewater anaerobic digestion systems. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 196.
- Cameron, E. S., Schmidt, P. J., Tremblay, B. J. M., Emelko, M. B., y Müller, K. M. (2020). To rarefy or not to rarefy: Enhancing microbial community analysis through next-generation sequencing. *bioRxiv*, 2020.09.09.290049.
- Carmona-Galindo, V. D., y Carmona, T. V. (2015). La Diversidad De Los Análisis De Diversidad. *Bioma*, 14(November), 54–71.
- Cayetano, R. D. A., Kim, G. B., Park, J. H., Kumar, G., y Kim, S. H. (2020). Waste activated sludge treatment in an anaerobic dynamic membrane bioreactor at varying hydraulic retention time: Performance monitoring and microbial community analysis. *International Journal of Energy Research*, 44(15), 12485–12495.
- Cayetano, R. D. A., Park, J., Kim, G.-B., Jung, J.-H., y Kim, S.-H. (2021). Enhanced anaerobic digestion of waste-activated sludge via bioaugmentation strategy—Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states (PICRUSt2) analysis through hydrolytic enzymes and possible linkage to system

- Chao, A., Chiu, C. H., y Jost, L. (2014). Unifying species diversity, phylogenetic diversity, functional diversity, and related similarity and differentiation measures through hill numbers. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45, 297–324.
- Chen, S. y Dong, X. (2015). Proteiniphilum. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–2. John Wiley and Sons.
- Chen, S., y Dong, X. (2005). Proteiniphilum acetatigenes gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(6), 2257–2261.
- Chen, W.-H., Lu, G., Bork, P., Hu, S., y Lercher, M. J. (2016). Energy efficiency trade-offs drive nucleotide usage in transcribed regions. *Nature Communications*, 7(1), 11334.
- Cheng, Y., Zhang, C., Zhao, X., y von Gadow, K. (2018). Biomass-dominant species shape the productivity-diversity relationship in two temperate forests. *Annals of Forest Science*, 75(4), 97.
- Ciprian, P. (2014). A tool for computing diversity and consideration on differences between diversity indices. *Journal of Landscape Management*, 5(2), 78–82.
- Conklin, A., Stensel, H. D., y Ferguson, J. (2006). Growth Kinetics and Competition Between Methanosarcina and Methanosaeta in Mesophilic Anaerobic Digestion. *Water Environment Research*, 78(5), 486–496.
- Corrales, L. C., Antolinez Romero, D. M., Bohórquez Macías, J. A., y Corredor Vargas, A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*, 13(23), 55–81.
- Dahle, H., y Birkeland, N.-K. (2006). Thermovirga lienii gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic, anaerobic, amino-acid-degrading bacterium isolated from a North Sea oil well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1539–1545.
- Daly, A. J., Baetens, J. M., y De Baets, B. (2018). Ecological diversity: Measuring the unmeasurable. *Mathematics*, 6(7).
- David, B., Federico, B., Cristina, C., Marco, G., Federico, M., y Paolo, P. (2019). Biohythane Production From Food Wastes. *Biohydrogen*, 347–368.
- De Vrieze, J., Christiaens, M. E. R., Walraedt, D., Devooght, A., Ijaz, U. Z., y Boon, N. (2017). Microbial community redundancy in anaerobic digestion drives process

- recovery after salinity exposure. *Water Research*, 111, 109–117.
- De Vrieze, J., Gildemyn, S., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D. H., Verstraete, W., y Boon, N. (2015). Inoculum selection is crucial to ensure operational stability in anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(1), 189–199. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6046-3>
- De Vrieze, J., y Verstraete, W. (2016). Perspectives for microbial community composition in anaerobic digestion: from abundance and activity to connectivity. *Environmental microbiology*, 18(9), 2797–2809.
- Díaz, C., Baena, S., Fardeau, M.-L., y Patel, B. K. C. (2007). *Aminiphilus circumscriptus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic amino-acid-degrading bacterium from an upflow anaerobic sludge reactor. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 8), 1914–1918.
- Dries, J., De Smul, A., Goethals, L., Grootaerd, H., y Verstraete, W. (1998). High rate biological treatment of sulfate-rich wastewater in an acetate-fed EGSB reactor. *Biodegradation*, 9(2), 103–111.
- Enzmann, F., Mayer, F., Rother, M., y Holtmann, D. (2018). Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. *AMB Express*, 8(1), 1.
- Escalante, A. E., Rebolleda-Gómez, M., Benítez, M., y Travisano, M. (2015). Ecological perspectives on synthetic biology: Insights from microbial population biology. *Frontiers in Microbiology*, 6(FEB), 1–10.
- Escamilla, L. F. (2018). *Influencia de compuestos lignocelulosicos contenidos en residuos sólidos orgánicos municipales sobre la producción biogás*. UNAM.
- España-Gamboa, E. I., Mijangos-Cortés, J. O., Hernández-Zárate, G., Maldonado, J. A. D., y Alzate-Gaviria, L. M. (2012). Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 82.
- Feng, Q., Song, Y. C., Kim, D. H., Kim, M. S., y Kim, D. H. (2019). Influence of the temperature and hydraulic retention time in bioelectrochemical anaerobic digestion of sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(4), 2170–2179.
- Ferguson, R. M. W., Coulon, F., y Villa, R. (2016). Organic loading rate: A promising microbial management tool in anaerobic digestion. *Water Research*, 100(November), 348–356.

- Ferguson, R. M. W., Coulon, F., y Villa, R. (2018). Understanding microbial ecology can help improve biogas production in AD. *Science of The Total Environment*, 642, 754–763.
- Fernandes, B. S., Saavedra, N. K., Maintinguer, S. I., Sette, L. D., Oliveira, V. M., Varesche, M. B. A., y Zaiat, M. (2013). The Effect of Biomass Immobilization Support Material and Bed Porosity on Hydrogen Production in an Upflow Anaerobic Packed-Bed Bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170(6), 1348–1366.
- Fontana, A., Campanaro, S., Treu, L., Kougias, P. G., Cappa, F., Morelli, L., y Angelidaki, I. (2018). Performance and genome-centric metagenomics of thermophilic single and two-stage anaerobic digesters treating cheese wastes. *Water Research*.
- Fujinawa, K., Asai, Y., Miyahara, M., Kouzuma, A., Abe, T., y Watanabe, K. (2016). Genomic features of uncultured methylotrophs in activated-sludge microbiomes grown under different enrichment procedures. *Scientific Reports*, 6(1), 26650.
- García-Lozano, M., Hernández-De Lira, I. O., Huber, D. H., y Balagurusamy, N. (2019). Spatial Variations of Bacterial Communities of an Anaerobic Lagoon-Type Biodigester Fed with Dairy Manure. *Processes*, 7(7), 408.
- García-Morales, R., Moreno, C. E., y Bello-Gutiérrez, J. (2011). Renovando las medidas para evaluar la diversidad en comunidades ecológicas: El número de especies efectivas de murciélagos en el sureste de Tabasco, México. *Therya*, 2(3), 205–215.
- García-Ruiz, M. J., Castellano-Hinojosa, A., Armato, C., González-Martínez, A., González-López, J., y Osorio, F. (2019). Biogas Production and Microbial Community Structure in a Stable-Stage of a Two-Stage Anaerobic Digester. *AIChE Journal*, (February).
- Garcia, N. H., Mattioli, A., Gil, A., Frison, N., Battista, F., y Bolzonella, D. (2019). Evaluation of the methane potential of different agricultural and food processing substrates for improved biogas production in rural areas. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 112(May), 1–10.
- Gasol, J. M., y Kirchman, D. L. (2018). *Microbial ecology of the oceans* (3rd edition). John Wiley & Sons.
- Gómez Camacho, C. E., Ruggeri, B., Mangialardi, L., Persico, M., y Luongo Malavé, A. C. (2019). Continuous two-step anaerobic digestion (TSAD) of organic market waste: rationalising process parameters. *International Journal of Energy and Environmental*

*Engineering*, 10(4), 413–427.

- Goux, X., Calusinska, M., Lemaigre, S., Marynowska, M., Klocke, M., Udelhoven, T., Benizri, E. y Delfosse, P. (2015). Microbial community dynamics in replicate anaerobic digesters exposed sequentially to increasing organic loading rate, acidosis, and process recovery. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1–18.
- Granada, C. E., Hasan, C., Marder, M., Konrad, O., Vargas, L. K., Passaglia, L. M. P. M., Giongo A., de Oliveira R. R., Pereira, L. de M., de Jesus Trindade, F. y Sperotto, R. A. (2018). Biogas from slaughterhouse wastewater anaerobic digestion is driven by the archaeal family Methanobacteriaceae and bacterial families Porphyromonadaceae and Tissierellaceae. *Renewable Energy*, 118, 840–846.
- Guisande González, C., Barreiro Felpeto, A., y Maneiro Estraviz, I. (2000). *Tratamiento de datos*. Ediciones Díaz de Santos.
- Guo, J., Peng, Y., Ni, B.-J., Han, X., Fan, L., y Yuan, Z. (2015). Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 33.
- Hagos, K., Zong, J., Li, D., Liu, C., y Lu, X. (2017). Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 1485–1496.
- Halffter, G., y Moreno, C. E. (2005). Significado biológico de las Diversidades Alfa, Beta y Gamma. *m3m: Monografías Terce Milenio*, 4(Nov), 5–18.
- Hamdi, O., Ben Hania, W., Postec, A., Bouallagui, H., Hamdi, M., Bonin, P., Ollivier, B. y Fardeau, M.-L. (2015). *Aminobacterium thunnarium* sp. nov., a mesophilic, amino acid-degrading bacterium isolated from an anaerobic sludge digester, pertaining to the phylum Synergistetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt\_2), 609–614.
- Hernández, M., Oropeza, R., Sierra Campos, E., y Balagurusamy, N. (2014). Metanógenos: Una Perspectiva de su Fisiología con Respecto a Evolución de la Vida. En M. C. Cueto, N. De la Fuente, y M. Luévanos (Eds.), *Fronteras en microbiología aplicada* (pp. 151–184).
- Hill, M. O. (1973). Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences.

*Ecology*, 54(2), 427–432.

- Houari, A. El, Ranchou-Peyruse, M., Ranchou-Peyruse, A., Bennisse, R., Bouterfas, R., Urriza, M. S. G., Qatibi, A. I. y Guyoneaud, R. (2020). Microorganisms Abundance and Diversity in Municipal Anaerobic Sewage Sludge Digesters from. *Processes*, 8(1284), 1–22.
- Huang, W., Wang, Z., Zhou, Y., y Ng, W. J. (2015). The role of hydrogenotrophic methanogens in an acidogenic reactor. *Chemosphere*, 140, 40–46.
- Hughes, J. B., y Hellmann, J. J. (2005). The application of rarefaction techniques to molecular inventories of microbial diversity. *Methods in Enzymology*, 397(1995), 292–308.
- Jain, S., Jain, S., Wolf, I. T., Lee, J., y Tong, Y. W. (2015). A comprehensive review on operating parameters and different pretreatment methodologies for anaerobic digestion of municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 142–154.
- Jenkins, S. R., y Moore, R. C. (1977). A Proposed Modification to the Classical Method of Calculating Alkalinity in Natural Waters. *American Water Works Association*, 69(1), 56–60.
- Jiménez-Ocampo, U. E., Vargas, A., Murillo-Herrera, A. I., Carrillo-Reyes, J., y Moreno-Andrade, I. (2021). Valorización energética de residuos sólidos orgánicos en un reactor discontinuo secuencial. *XXXVII Congreso interamericano virtual de ingeniería sanitaria y ambiental*, 765–769.
- Jorgensen, S E, y Fath, B. D. (2014). *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier Science.
- Jorgensen, Sven E., Bastianoni, S., Müller, F., Patten, B. C., Fath, B. D., Marques, J. C., Nielsen, S., Tiezzi, E., y Ulanowicz, R. E. (2007). Ecosystem principles have applications. En *A New Ecology: Systems Perspective* (1st edition, pp. 199–241).
- Jost, L. (2006). Entropy and diversity. *Oikos*, 2(113).
- Jost, L. (2010). The relation between evenness and diversity. *Diversity*, 2(2), 207–232.
- Jumas-Bilak, E., y Marchandin, H. (2014). The Phylum Synergistetes. En *The Prokaryotes* (pp. 931–954).
- Junicke, H. (2015). *Quantifying electron fluxes in methanogenic microbial communities dissertation*. Universidad Técnica Delft.

- Kang, H.-J., Lee, S.-H., Lim, T.-G., y Park, H.-D. (2019). Effect of inoculum concentration on methanogenesis by direct interspecies electron transfer: Performance and microbial community composition. *Bioresource Technology*, 291, 121881.
- Kang, S., Rodrigues, J. L. M., Ng, J. P., y Gentry, T. J. (2016). Hill number as a bacterial diversity measure framework with high-throughput sequence data. *Scientific Reports*, 6(1), 38263.
- Karimi, B., Maron, P. A., Chemidlin-Prevost Boure, N., Bernard, N., Gilbert, D., & Ranjard, L. (2017). Microbial diversity and ecological networks as indicators of environmental quality. *Environmental Chemistry Letters*, 15(2), 265–281.
- Keyser, M., Witthuhn, R. C., Ronquest, L. C., y Britz, T. J. (2003). Treatment of winery effluent with upflow anaerobic sludge blanket (UASB) - Granular sludges enriched with *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnology Letters*, 25(22), 1893–1898.
- Khafipour, A., Jordaan, E. M., Flores-Orozco, D., Khafipour, E., Levin, D. B., Sparling, R., y Cicek, N. (2020). Response of Microbial Community to Induced Failure of Anaerobic Digesters Through Overloading With Propionic Acid Followed by Process Recovery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(December), 1–15.
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J. H., Kim, H. B. y Isaacson, R. E. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J. Microbiol. Biotechnol*, 27(12), 2089–2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kim, M.-S., Cha, J., y Kim, D.-H. (2013). Fermentative Biohydrogen Production from Solid Wastes. *Biohydrogen*, 259–283.
- Konopka, A., Lindemann, S., & Fredrickson, J. (2015). Dynamics in microbial communities: Unraveling mechanisms to identify principles. *ISME Journal*, 9(7), 1488–1495.
- Koo, T., Yulisa, A., y Hwang, S. (2019). Microbial community structure in full scale anaerobic mono-and co-digesters treating food waste and animal waste. *Bioresource Technology*, 282(2019), 439–446.
- la Riviere, J. W. M. (2013). Microbial ecology of liquid waste treatment. En Marion Alexander (Ed.), *Advances in microbial ecology. Volume 1* (p. 268). New York: Plenum Press.
- Leboffe, M., y Piearch, B. (2015). *Microbiology: Laboratory Theory and Application*. Morton Publishing Company.

- Lee Harvey. (2019). Social Research Glossary. Recuperado el 23 de mayo de 2020, de Quality Research International website:
- Legendre, P., y Legendre, L. (2003). *Numerical Ecology* (2nd edition). Elsevier Science
- Leinster, T., y Cobbold, C. A. (2012). Measuring diversity: The importance of species similarity. *Ecology*, 93(3), 477–489.
- Li, J., Wang, H. Z., Yi, Y., Gou, M., Nobu, M. K., Chen, Y. T., y Tang, Y. Q. (2020). Response of Isovalerate-Degrading Methanogenic Microbial Community to Inhibitors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(3), 1010–1026.
- Li, L., He, Q., Ma, Y., Wang, X., y Peng, X. (2016). A mesophilic anaerobic digester for treating food waste: process stability and microbial community analysis using pyrosequencing. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 65.
- Li, W., Loh, K.-C., Zhang, J., Tong, Y. W., y Dai, Y. (2018). Two-stage anaerobic digestion of food waste and horticultural waste in high-solid system. *Applied Energy*, 209, 400–408.
- Liu, J., Meng, Z., Liu, X., y Zhang, X.-H. (2019). Microbial assembly, interaction, functioning, activity and diversification: a review derived from community compositional data. *Marine Life Science & Technology*, 1(1), 112–128.
- Liu, T., Schnürer, A., Björkmalm, J., Willquist, K., y Kreuger, E. (2020). Diversity and abundance of microbial communities in uasb reactors during methane production from hydrolyzed wheat straw and lucerne. *Microorganisms*, 8(9), 1–27.
- Liu, T., Sun, L., Müller, B., y Schnürer, A. (2017). Importance of inoculum source and initial community structure for biogas production from agricultural substrates. *Bioresource Technology*, 245, 768–777.
- Liu, Y., y Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 171–189.
- Lozupone, C., y Knight, R. (2005). UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8228–8235.
- Lucas, R., Groeneveld, J., Harms, H., Johst, K., Frank, K., y Kleinstaub, S. (2017). A critical evaluation of ecological indices for the comparative analysis of microbial



- communities based on molecular datasets. *FEMS microbiology ecology*, 93(1), 1–15.
- Lv, Z., Chen, Z., Chen, X., Liang, J., Jiang, J., y Loake, G. J. (2019). Effects of various feedstocks on isotope fractionation of biogas and microbial community structure during anaerobic digestion. *Waste Management*, 84, 211–219.
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., y Whitman, W. B. (2018). Methanogenesis. *Current Biology*, 28(13), R727–R732.
- Marques, J. C. C. (2008). Coastal and Estuarine Environments. *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set*, 619–630.
- Martín-González, L., Font, X., y Vicent, T. (2013). Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. *Biochemical Engineering Journal*, 76, 1–5.
- Mazzoleni, S., Landi, C., Carteni, F., de Alteriis, E., Giannino, F., Paciello, L., y Parascandola, P. (2015). A novel process-based model of microbial growth: self-inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* aerobic fed-batch cultures. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 109.
- McAnulty, M. J., Vepachedu, V. R., Wood, T. K., y Ferry, J. G. (2013). Biofuels: Microbially Generated Methane and Hydrogen. *eLS*.
- McKnight, D. T., Huerlimann, R., Bower, D. S., Schwarzkopf, L., Alford, R. A., y Zenger, K. R. (2019). Methods for normalizing microbiome data: An ecological perspective. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(3), 389–400.
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4).
- McMurdie, P. J., y Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Computational Biology*, 10(4).
- Menzel, T., Neubauer, P., y Junne, S. (2020). Role of microbial hydrolysis in anaerobic digestion. *Energies*, 13(21).
- Modin, O., Liébana, R., Sabeh-Alam, S., Wilén, B.-M. M., Suarez, C., Hermansson, M. y Persson, F. (2020). Hill-based Dissimilarity Indices and Null Models for Analysis of Microbial Community Assembly. *Microbiome*, 8(1), 1–35.
- Moletta, R. (2005). Winery and distillery wastewater treatment by anaerobic digestion. *Water Practice and Technology*, 51(1), 137–144.

- Moreno, C. E., Barragán, F., Pineda, E., y Pavón, N. P. (2011). Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1249–1261.
- Morris, B. E. L., Henneberger, R., Huber, H., y Moissl-Eichinger, C. (2013). Microbial syntrophy: Interaction for the common good. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(3), 384–406.
- Morris, E. K., Caruso, T., Buscot, F., Fischer, M., Hancock, C., Maier, T. S., Meiners, T., Muller, C., Obermaier, E., Prati, D., Socher, S. A., Sonnemann, I., Waschke N., Wubet, T., Wurst, S. y Rillig, M. C. (2014). Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and evolution*, 4(18), 3514–3524.
- Mota, V. T., Santos, F. S., Araújo, T. A., y Amaral, M. C. S. (2015). Evaluation of titration methods for volatile fatty acids measurement: Effect of the bicarbonate interference and feasibility for the monitoring of anaerobic reactors. *Water Practice and Technology*, 10(3), 486–495.
- Mukhuba, M., Roopnarain, A., Moeletsi, M. E., Adeleke, R., y Moeletsi, M. E. (2019). Metagenomic insights into the microbial community and biogas production pattern during anaerobic digestion of cow dung and mixed food waste. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, (December).
- Musa, M. A., Idrus, S., Hasfalina, C. M., y Daud, N. N. N. (2018). Effect of Organic Loading Rate on Anaerobic Digestion Performance of Mesophilic (UASB) Reactor Using Cattle Slaughterhouse Wastewater as Substrate. *International journal of environmental research and public health*, 15(10).
- Nagao, N., Tajima, N., Kawai, M., Niwa, C., Kurosawa, N., Matsuyama, T., Yusoff, F. M. y Toda, T. (2012). Maximum organic loading rate for the single-stage wet anaerobic digestion of food waste. *Bioresource Technology*, 118, 210–218.
- Nesbø, C. L., Charchuk, R., Pollo, S. M. J., Budwill, K., Kublanov, I. V., Haverkamp, T. H. A., y Foght, J. (2018). Genomic insights into metabolism and phylogeography of the mesophilic Thermotogae genus Mesotoga. *bioRxiv*, 322537.
- Nigam, P. S., y Pandey, A. (2009). *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation : utilisation of agro-residues*. Springer.

- Ning, D., Deng, Y., Tiedje, J. M., y Zhou, J. (2019). A general framework for quantitatively assessing ecological stochasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(34), 16892–16898.
- Okoro-Shekwaga, C. K., Ross, A. B., y Camargo-Valero, M. A. (2019). Improving the biomethane yield from food waste by boosting hydrogenotrophic methanogenesis. *Applied Energy*, 254, 113629.
- Okpiliya, F. I. (2012). Ecological Diversity Indices: Any Hope for One Again? *Journal of Environment and Earth Science*, 2(10), 45–52.
- Oksanen, A. J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., Hara, R. B. O., Simpson, G. L., Solymos, P., y Stevens, M. H. H. (2012). *Community Ecology Package* (p. 263).
- Panikov, N. (2010). Microbial Ecology. En L. K. Wang, V. Ivanov, J.-H. Tay, y Y.-T. Hung (Eds.), *Handbook of Environmental Engineering Environmental Biotechnology* (pp. 1689–1699).
- Pap, B., Györkei, Á., Boboescu, I. Z., Nagy, I. K., Bíró, T., Kondorosi, É., y Maróti, G. (2015). Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. *Bioresource Technology*, 177, 375–380.
- Parada, A. E., Needham, D. M., y Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403–1414.
- Paradis, E., y Schliep, K. (2019). Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3), 526–528.
- Park, M. J., Jo, J. H., Park, D., Lee, D. S., y Park, J. M. (2010). Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(12), 6194–6202.
- Park, S.-G., Rhee, C., Shin, S. G., Shin, J., Mohamed, H. O., Choi, Y.-J., y Chae, K.-J. (2019). Methanogenesis stimulation and inhibition for the production of different target electrobiofuels in microbial electrolysis cells through an on-demand control strategy using the coenzyme M and 2-bromoethanesulfonate. *Environment*

*International*, 131, 105006.

- Petta, L., De Gisi, S., Casella, P., Farina, R., y Notarnicola, M. (2017). Evaluation of the treatability of a winery distillery (vinasse) wastewater by UASB, anoxic-aerobic UF-MBR and chemical precipitation/adsorption. *Journal of Environmental Management*, 201, 177–189.
- Pramanik, S. K., Suja, F. B., Zain, S. M., y Pramanik, B. K. (2019). The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. *Bioresource Technology Reports*, 100310.
- Promnuana, K., y O-Thong, S. (2017). Biological hydrogen sulfide and sulfate Removal from rubber smoked sheet wastewater for enhanced biogas production. *Energy Procedia*, 138, 569–574.
- Rajendran, K., Mahapatra, D., Venkatraman, A. V., Muthuswamy, S., y Pugazhendhi, A. (2020). Advancing anaerobic digestion through two-stage processes: Current developments and future trends. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 123(January), 109746.
- Regueiro, L., Lema, J. M., y Carballa, M. (2015). Key microbial communities steering the functioning of anaerobic digesters during hydraulic and organic overloading shocks. *Bioresource Technology*, 197, 208–216.
- Rincón, B., Portillo, M. C., González, J. M., y Borja, R. (2013). Microbial community dynamics in the two-stage anaerobic digestion process of two-phase olive mill residue. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10(4), 635–644.
- Rivière, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Camacho, P y Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *The ISME Journal*, 3(6), 700–714.
- Rodríguez, J., Mañunga, T., y Cárdenas, C. (2012). Influencia de las fracciones de materia orgánica sobre el desempeño de un sistema de tratamiento de agua residual de una industria papelera. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 447–455.
- Rui, J., Li, J., Zhang, S., Yan, X., Wang, Y., y Li, X. (2015). The core populations and co-occurrence patterns of prokaryotic communities in household biogas digesters.

*Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 158.

- Russell, J. B. (2007). The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(1–3), 1–11.
- Santillan, E., Seshan, H., Constancias, F., Drautz-Moses, D. I., y Wuertz, S. (2019). Frequency of disturbance alters diversity, function, and underlying assembly mechanisms of complex bacterial communities. *npj Biofilms and Microbiomes*, 5(1).
- Schnürer, A., Bohn, I., y Moestedt, J. (2016). Protocol for Start-Up and Operation of CSTR Biogas Processes. En T. J. McGenity (Ed.), *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*.
- Schönheit, P., Moll, J., y Thauer, R. K. (1980). Growth parameters ( $K_s$ ,  $\mu_{max}$ ,  $Y_s$ ) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Archives of Microbiology*, 127(1), 59–65.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026.
- Schuchmann, K., y Müller, V. (2016). Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4056–4069.
- Secretaría de Energía [SENER]. (2017). *Mapa de Ruta Tecnológica Biogás*.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H., Huber, D. H., Langenheder, S., Lennon, J. T., Martiny, J. B. H., Matulich, K. L., Schmidt, T. M. y Handelsman, J. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology*, 3(DEC), 1–19.
- Shaw, G. T.-W., Weng, C.-Y., Chen, C.-Y., Weng, F. C.-H., y Wang, D. (2019). A systematic approach re-analyzing the effects of temperature disturbance on the microbial community of mesophilic anaerobic digestion. *Scientific Reports*, 9(1), 6560.
- Sierocinski, P., Bayer, F., Yvon-Durocher, G., Burdon, M., Großkopf, T., Alston, M., Swarbreck D., Hobbs, P. J., Soyer, O. S. y Buckling, A. (2018). Biodiversity–function relationships in methanogenic communities. *Molecular Ecology*, 27(22), 4641–4651.
- Sierocinski, P., Milferstedt, K., Bayer, F., Großkopf, T., Alston, M., Bastkowski, S., Swarbreck, D., Hobbs, P. J., Soyer, O. S., Hamelin, J. y Buckling, A. (2017). A Single Community Dominates Structure and Function of a Mixture of Multiple Methanogenic Communities. *Current Biology*, 27(21), 3390–3395.e4.
- Singh, B., Baudh, K., y Bux, F. (Eds.). (2015). *Algae and environmental sustainability*.

Springer.

- Sitthi, S., Hatamoto, M., Watari, T., y Yamaguchi, T. (2020). Enhancing anaerobic syntrophic propionate degradation using modified polyvinyl alcohol gel beads. *Heliyon*, 6(12), e05665.
- Slobodkin, A. (2017). Tepidimicrobium. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–6).
- Smith, K. S., y Ingram-Smith, C. (2007). Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends in Microbiology*, 15(4), 150–155.
- Snell-Castro, R., Méndez-Acosta, H. O., Arreola-Vargas, J., González-Álvarez, V., Pintado-González, M., González-Morales, M. T., y Godon, J. J. (2019). Active prokaryotic population dynamics exhibit high correlation to reactor performance during methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana var. azul bagasse. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 1618–1630.
- Sousa, R. M. O. F., Amaral, C., Fernandes, J. M. C., Fraga, I., Semitela, S., Braga, F., Coimbra, A. M., Dias, A. A., Bezerra, R. M. y Sampaio, A. (2019). Hazardous impact of vinasse from distilled winemaking by-products in terrestrial plants and aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183(June), 109493.
- Srisowmeya, G., Chakravarthy, M., y Nandhini Devi, G. (2020). Critical considerations in two-stage anaerobic digestion of food waste – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119(November 2019), 109587.
- Stroud, J. T., Bush, M. R., Ladd, M. C., Nowicki, R. J., Shantz, A. A., y Sweatman, J. (2015). Is a community still a community? Reviewing definitions of key terms in community ecology. *Ecology and Evolution*, 5(21), 4757–4765.
- Sun, L., Liu, T., Müller, B., y Schnürer, A. (2016). The microbial community structure in industrial biogas plants influences the degradation rate of straw and cellulose in batch tests. *Biotechnology for biofuels*, 9, 128.
- Tao, Y., Ersahin, M. E., Ghasimi, D. S. M., Ozgun, H., Wang, H., Zhang, X., Guoa, M., Yangf, Y., Stuckey, D. C. y van Lier, J. B. (2020). Biogas productivity of anaerobic digestion process is governed by a core bacterial microbiota. *Chemical Engineering Journal*, 380, 122425.
- Thauer, R. K., Kaster, A. K., Seedorf, H., Buckel, W., y Hedderich, R. (2008). Methanogenic

- archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 579–591.
- Tonanzi, B., Braguglia, C. M., Gallipoli, A., Montecchio, D., Pagliaccia, P., Rossetti, S., y Gianico, A. (2020). Anaerobic digestion of mixed urban biowaste: The microbial community shift towards stability. *New Biotechnology*, 55, 108–117.
- Tukangan, W., Hupfauf, S., Gómez-Brandón, M., Insam, H., Salvenmoser, W., Prasertsan, P., P., Cheirsilp, B. y O-Thong, S. (2021). Symbiotic Bacteroides and Clostridium-rich methanogenic consortium enhanced biogas production of high-solid anaerobic digestion systems. *Bioresource Technology Reports*, 14(February).
- Valverde Valdés, T., Meave del Castillo, J. A., Carabias, L., y Cano Santana, Z. (2005). *Ecología y medio ambiente*. Pearson Educación.
- Vargas-Morales, G., Chamy, R., y García-Gen, S. (2018). A VFA-based controller for anaerobic digestion of industrial winery wastewater. *Water Science and Technology*, 78(9), 1871–1878.
- Vasilakou, E., van Loosdrecht, M. C. M., y Wahl, S. A. (2020). Escherichia coli metabolism under short-term repetitive substrate dynamics: adaptation and trade-offs. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 116.
- Venkiteshwaran, K., Bocher, B., Maki, J., y Zitomer, D. (2015). Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function: Supplementary Issue: Water Microbiology. *Microbiology Insights*, 8s2, MBI.S33593.
- Vital-Jacome, M. A., y Buitrón, G. (2021). Thermophilic anaerobic digestion of winery effluents in a two-stage process and the effect of the feeding frequency on methane production. *Chemosphere*, 272.
- Vital-Jacome, M., Cazares-Granillo, M., Carrillo-Reyes, J., y Buitron, G. (2020). Characterization and anaerobic digestion of Mexican highly concentrated wine by-products and effluents. *Water Science and Technology*, 2, 1–10.
- Vlyssides, A., Barampouti, E. M., Mai, S., Stamatoglou, A., y Tsimas, E. (2010). Alternative biological systems for the treatment of vinasse from wine. *Water Science and Technology*, 62(12), 2899–2904.
- Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L., y Jiang, B. (2018). Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production—A review.

- Bioresource Technology*, 248, 29–36.
- Wang, Y., Zhang, Y., Wang, J., y Meng, L. (2009). Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy*, 33(5), 848–853.
- Wenjin, L., Knops, J. M. H., Brassil, C. E., Lu, J., Qi, W., Li, J., Liu, M., Chang, S. y Li, W. (2016). Functional group dominance and not productivity drives species richness. *Plant Ecology and Diversity*, 9(2), 141–150.
- Werner, J. J., Knights, D., Garcia, M. L., Scalfone, N. B., Smith, S., Yarasheski, K., Cummings, T. A., Beers, A. R., Knight, R. y Angenent, L. T. (2011). Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), 4158–4163.
- Wilkins, D., Rao, S., Lu, X., & Lee, P. K. H. (2015). Effects of sludge inoculum and organic feedstock on active microbial communities and methane yield during anaerobic digestion. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1114.
- Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., y Kovács, K. L. (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for biofuels*, 5, 41.
- Wolfe, R. S. (1993). An Historical Overview of Methanogens. En J. Ferry (Ed.), *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. Springer US.
- Wu, Y., Kovalovszki, A., Pan, J., Lin, C., Liu, H., Duan, N., y Angelidaki, I. (2019). Early warning indicators for mesophilic anaerobic digestion of corn stalk: A combined experimental and simulation approach. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–15.
- Xu, R., Yang, Z. H., Zheng, Y., Liu, J. B., Xiong, W. P., Zhang, Y. R., Lu, Y., Xue, W., J. y Fan, C. Z. (2018). Organic loading rate and hydraulic retention time shape distinct ecological networks of anaerobic digestion related microbiome. *Bioresource Technology*, 262, 184–193.
- Yeshitela, K. (2008). *Effects of anthropogenic disturbance on the diversity of foliicolous lichens in tropical rainforests of East Africa: Godere (Ethiopia), Budongo (Uganda) and Kakamega (Kenya)*. Cuvillier Verlag, Gottingeng.
- Zamora Figueroa, A. C. (2018). Microbial Diversity: Genetic Diversity Vs Functional



- Diversity. *Journal of microbiology and experimentation*, 6(1), 6–8.
- Zhang, Le, Loh, K.-C., Lim, J. W., y Zhang, J. (2019). Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 100, 110–126.
- Zhang, Lei, y Jahng, D. (2010). Enhanced anaerobic digestion of piggery wastewater by ammonia stripping: Effects of alkali types. *Journal of Hazardous Materials*, 182(1–3), 536–543.
- Zhang, Liguo, Ban, Q., y Li, J. (2018). Microbial community dynamics at high organic loading rates revealed by pyrosequencing during sugar refinery wastewater treatment in a UASB reactor. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 12(4), 1–12.
- Zhijing, Y., Shavandi, A., Harrison, R., y Bekhit, A. E.-D. (2018). Characterization of Phenolic Compounds in Wine Lees. *Antioxidants*, 7(4), 48.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Cálculo de métricas de diversidad alfa

Métrica de diversidad	Ecuación	Nota	Referencia
Sobs	$\sum_{i=1}^S p_i^0$	Donde: S es el número de especies observadas $p_i$ es la abundancia relativa de las especies	Alberdi y Gilbert, (2019)
Estimador de riqueza no paramétrico Chao 1	$S = Sobs + \frac{n1(n1 - 1)}{2(n2 + 1)}$	Donde: $n1$ y $n2$ son el número de OTUs con 1 y 2 secuencias respectivamente.	Zhang et al. (2019)
Shannon	$H' = - \sum_{i=1}^{Sobs} \frac{ni}{N} \ln \frac{ni}{N}$	Donde: $S_{obs}$ es el número de OTUs observadas $ni$ es el número de secuencias de la OTU i $N$ es el número total de secuencias	Zhang et al. (2019)
Simpson	$D_1 = \frac{\sum_{i=1}^{Sobs} ni(ni - 1)}{N(N - 1)}$	Donde: $S_{obs}$ es el número de OTUs observadas $ni$ es el número de secuencias en no.1 de la OTU $N$ es el número total de secuencias	Zhang et al. (2019)

<p>Transformación de los índices clásicos en Diversidad Verdadera de orden <math>q</math> (<math>{}^qD</math>)</p>	${}^qD = \left( \sum_{i=1}^s p_i^q \right)^{\frac{1}{(1-q)}}$	<p>Donde:  <math>p_i</math> es la abundancia relativa de las especies  <math>S</math> es el número de especies observadas  <math>q</math> es el orden de diversidad</p>	<p>Moreno et al. (2011)</p>
<p>Diversidad de orden cero (<math>{}^0D</math>)</p>	${}^0D = \left( \sum_{i=1}^s p_i^0 \right)^{\frac{1}{(1-0)}}$	<p>Donde:  <math>p_i</math> es la abundancia relativa de las especies  <math>S</math> es el número de especies observadas</p>	<p>Alberdi y Gilbert, (2019)</p>
<p>Diversidad de orden 1 (<math>{}^1D</math>)</p>	${}^1D = \sum_{i=1}^s p_i \log p_i$	<p><math>p_i</math> es la abundancia relativa de especies  <math>S</math> es el número de especies observadas  <math>H'</math> es el índice de Shannon</p>	<p>Alberdi y Gilbert, (2019)</p>
<p>Diversidad de orden 2 (<math>{}^2D</math>)</p>	${}^2D = \left( \sum_{i=1}^s p_i^2 \right)^{\frac{1}{(1-2)}}$	<p>Donde:  <math>p_i</math> es la abundancia relativa de especies  <math>S</math> es el número de especies observadas  <math>D_1</math> es el índice de Simpson</p>	<p>Alberdi y Gilbert, (2019)</p>
	<p>o</p> ${}^2D = \frac{1}{1 - D_1}$		

**Anexo 2. Modelos del reactor de efluentes vitivinícolas del sistema en dos etapas**

Variable dependiente: Productividad de Metano****				
Modelo	1	2	3	4
<sup>0</sup> D	4.410**			-22.310
<sup>1</sup> D		1.031		
<sup>2</sup> D			0.309	7.247
Constante	-22.370*	2.020	5.592**	153.843
Observaciones	9	9	9	9
R <sup>2</sup>	0.537	0.303	0.062	0.568
R <sup>2</sup> ajustada	0.470	0.204	-0.072	0.309
Error estándar residual	0.417	0.511	0.593	0.476
	(df = 7)	(df = 7)	(df = 7)	(df = 5)
Estadístico F	8.108**	3.044	0.466	2.192
	(df = 1; 7)	(df = 1; 7)	(df = 1; 7)	(df = 3; 5)

Nota \*p<0.1; \*\*p<0.05; \*\*\*p<0.01

\*\*\*\*variables con transformación logarítmica

**Anexo 3. Modelos del reactor de efluentes vitivinícolas del sistema en una etapa**

Variable dependiente: Productividad de Metano			
Modelo	1	2	3
<sup>0</sup> D	0.064		
<sup>1</sup> D		7.142*	
<sup>2</sup> D			17.232**
Constante	1,464.628	640.501	737.660*
Observaciones	9	9	9
R <sup>2</sup>	0.001	0.433	0.468
R <sup>2</sup> ajustada	-0.142	0.351	0.392
Error estándar residual (df = 7)	399.151	300.845	291.227
Estadístico F (df = 1; 7)	0.007	5.335*	6.163**

Nota \*p<0.1; \*\*p<0.05; \*\*\*p<0.01

#### Anexo 4. Modelos del reactor de residuos alimenticios

Modelo	Variables dependientes					
	Productividad de Metano			Rendimiento		
	1	2	3	4	5	6
<sup>0</sup> D	-1.560*			-0.092		
<sup>1</sup> D		-8.444***			-0.487*	
<sup>2</sup> D			-16.999**			-0.989
Constante	973.843*	746.351**	717.577**	71.945**	58.039**	56.590**
	*	*	*		*	*
Observaciones	9	9	9	9	9	9
R <sup>2</sup>	0.415	0.682	0.548	0.249	0.392	0.321
R <sup>2</sup> ajustada	0.331	0.636	0.483	0.142	0.305	0.224
Error estándar residual (df = 7)	223.469	164.876	196.479	19.257	17.329	18.311
Estadístico F (df = 1; 7)	4.967*	14.984***	8.480**	2.319	4.508*	3.306

Nota \*p<0.1; \*\*p<0.05; \*\*\*p<0