



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

REVISIÓN Y ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA
ECOLÓGICA DE CONSORCIOS PROCARIONTES ASOCIADOS A
BIORREACTORES PRODUCTORES DE HIDRÓGENO Y DE
DIGESTIÓN ANAEROBIA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

PRESENTA:
MARCELO NAVARRO DÍAZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ

2015

Ciudad Universitaria, C. U.



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.

1. Datos del alumno

Navarro

Díaz

Marcelo

5643-3729

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

30618056

2. Datos del tutor

Doctora

Ana Elena

Escalante

Hernández

3. Datos del sinodal 1

M. en C.

Fabiola

Ramírez

Corona

4. Datos del sinodal 2

Doctora

Luciana

Raggi

Hoyos

5. Datos del sinodal 3

Doctora

Idania

Valdez

Vazquez

6. Datos del sinodal 4

Doctora

Mariana

Benítez

Keinrad

7. Datos del trabajo escrito.

Revisión y análisis comparativo de la estructura ecológica de consorcios procariontes asociados a biorreactores productores de hidrógeno y de digestión anaerobia.

65 páginas

2015

Agradecimientos Académicos

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants”

Isaac Newton.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas a la educación superior a través de la Facultad de Ciencias. Por darme una formación integral y de excelente calidad tanto en lo académico como en lo humano. Trabajaré día a día para poner su nombre en alto y retribuirle, tanto a la Universidad como a mi país, todo lo otorgado.

Al Instituto de Ecología por abrirme un espacio de trabajo, aprendizaje y convivencia excelentes.

A mi tutora, la doctora Ana Elena Escalante Hernández, por darme su confianza para integrarme a su equipo de trabajo y por su tiempo, paciencia y enseñanzas para que pudiera finalizar este trabajo.

A la doctora Mariana Benítez Keinrad por todo su apoyo durante la realización de este trabajo, especialmente al inicio cuando no sabía nada acerca de la inferencia y análisis de redes. También por aceptar formar parte de mi sínodo y darme valiosos comentarios y correcciones para mejorar este trabajo.

A la doctora Idania Valdez Vazquez por formar parte de mi sínodo, por darme la oportunidad de incorporarme a su proyecto de investigación y por la oportunidad de asistir al Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana del Hidrógeno.

A la maestra Fabiola Ramírez Corona por aceptar formar parte de mi sínodo y tomarse el tiempo de leer este trabajo dándome valiosos comentarios. Igualmente, me gustaría agradecerle por sus grandiosas clases de biología evolutiva; seguirán presentes en mi vida científica hasta el final.

A la doctora Luciana Raggi Hoyos por ser parte de mi sínodo y por los comentarios hechos hacia este trabajo ayudando a mejorarlo inmensamente.

A los 68 profesores que tuve durante la carrera, porque de todos aprendí mucho tanto en lo académico como en lo personal.

Apoyo Económico

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado a la doctora Idania Valdez Vazquez por parte del CONACYT. Proyecto No. 168921:

“ESTUDIO ECOLÓGICO Y EVOLUTIVO DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE COMUNIDADES HIDROGENOGENÉNICAS SOMETIDAS A PERTURBACIONES AMBIENTALES”

Igualmente, agradezco la *Beca de Titulación* otorgada por la Subsecretaría de Educación Superior (SES) de la Secretaría de Educación Pública (SEP), a través de la Coordinación Nacional de Becas de Educación Superior (CNBES).

Agradecimientos Personales

A mis padres. Gracias por su amor y apoyo incondicionales. Por enseñarme, con el ejemplo, a trabajar duro con honestidad y valor. Por sus empujones, que me enseñaron a caminar y me han llevado a terminar mi carrera universitaria. Mi agradecimiento, amor y admiración hacia ustedes son infinitos.

A mi tía Josefina por enseñarme que el amor se demuestra con acciones y por ser un soporte indispensable en mi vida y en la de mi familia.

A mis tíos Guillermo y Maricarmen por su cariño y por hacerme sentir que siempre puedo contar con ustedes.

A la familia Navarro Martínez y Piña Navarro por demostrarme su amor y apoyo todo el tiempo. Por los domingos en familia, por su amistad y por ayudarme a crecer.

A mis amigos del británico (Jazmín, Andrés y Luis), con los que crecí y que se han convertido en mis hermanos.

A mis amigos de la facultad. A Laura y Erika por compartir conmigo en las partes más divertidas de la carrera y la vida, pero también las más difíciles. Gracias por ayudarme a ser mejor persona y por su cariño y apoyo en todos los momentos. También quiero agradecer a quienes fueron indispensables en este camino: Angie, Diana, Humberto, las esporas (Yaz, Ale, Adriana, Andrea y Mariana), Sandra y Lalo.

A mis compañeros de laboratorio (Tere, Ale, Juan, Horacio, Héctor y Alberto) por su compañerismo y su apoyo y comentarios hacia este trabajo.

A todos los compañeros con los que compartí los salones de la facultad, por lo que aprendí de ellos en lo académico y en lo personal.

"Science is not perfect, it is often misused. It's only a tool, but it is the best tool we have. Self-correcting, ever changing, applicable to everything. With this tool we vanquish the impossible."

Carl Sagan (Cosmos).

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
Combustibles fósiles: contaminación y cambio climático global.....	3
Producción de biogás.....	5
Contexto económico, social y medioambiental del desarrollo de biocombustibles.....	11
Ecología de los biorreactores.....	12
Inferencia y Análisis de redes.....	16
Justificación.....	19
Objetivos.....	20
Hipótesis.....	21
Método.....	22
Construcción de bases de datos.....	23
Procesamiento de secuencias.....	25
Análisis multivariados y estadísticos de la composición microbiana.....	25
Inferencia y análisis de redes.....	26
Resultados	29
Análisis multivariados y estadísticos de la composición microbiana.....	29
Inferencia y análisis de redes.....	33
Discusión.....	39
Análisis multivariados y estadísticos de la composición microbiana.....	40
Análisis de redes	43
Conclusiones y Perspectivas	46
Bibliografía General	48
Anexos	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la producción de biogás.....	6
Figura 2. Pasos de la digestión anaerobia.....	7
Figura 3. Ejemplo de un análisis de componentes principales que modela la relación entre las variables ambientales del hábitat de varias especies del orden Hymenoptera.....	14
Figura 4. Ejemplo de un análisis de correspondencias canónico que modela la abundancia de especies de plantas marinas y algunas variables ambientales.....	15
Figura 5. Características de las redes de mundo pequeño	19
Figura 6. Flujo de trabajo seguido.....	23
Figura 7. Gráfica del análisis de componentes principales modelando la relación entre las variables ambientales.....	30
Figura 8. Gráfica del análisis de correspondencias canónico modelando la relación entre las variables ambientales y los OTUs (nivel de familia).....	31
Figura 9. Gráfica del análisis de correspondencias canónico modelando la relación entre el origen del inóculo, el rendimiento de hidrógeno, temperatura, riqueza y los OTUs (nivel de familia).....	32
Figura 10. Red de co-ocurrencias de las comunidades hidrogenogénicas (red de fermentación oscura)	35
Figura 11. Red de co-ocurrencias de las comunidades metanogénicas (red de digestión anaerobia)	35
Figura 12. Análisis de modularidad de la red de co-ocurrencias de consorcios productores de hidrógeno.....	36
Figura 13. Análisis de modularidad de la red de co-ocurrencias de consorcios de digestión anaerobia	37
Figura 14. Intersección entre las redes de comunidades productoras de hidrógeno y de digestión anaerobia	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de los contaminantes producidos por diversos combustibles.....	5
Tabla 2. Ejemplos de las reacciones químicas en la digestión anaerobia	8
Tabla 3. Interacciones y funciones conocidas en las comunidades hidrogenogénicas	12
Tabla 4. Atributos topológicos de las redes estudiados comúnmente.....	16
Tabla 5. Ejemplo de matriz en formato GMT.	25
Tabla 6. Análisis de especies indicadoras.....	33
Tabla 7. Atributos topológicos de las redes inferidas.	37
Tabla 8. Análisis de robustez de ambas redes.....	38
Tabla 9. Parámetros de las redes aleatorias y la red regular generadas por cada red inferida	39

Resumen

La producción de hidrógeno por medio de la fermentación oscura es un proceso con potencial para disminuir el uso de combustibles fósiles y de biorremediación. Últimamente, la fermentación oscura ha recibido mucha atención debido a las cualidades del hidrógeno como combustible limpio y eficiente; sin embargo, el proceso enfrenta algunos retos como la inestabilidad de los biorreactores (dispositivos que mantienen un ambiente biológicamente activo) y el bajo rendimiento. La fermentación oscura deriva de la digestión anaerobia, proceso por el cual se produce biogás rico en metano, inhibiendo a las arqueas metanógenas por medio de pretratamientos al inóculo. Estos pretratamientos eliminan una gran parte de la diversidad original pero, las consecuencias de esto en la estabilidad y estructura de los consorcios resultantes se desconocen.

Con el fin de mejorar el entendimiento de estos consorcios, en este trabajo se reunió información acerca de la composición microbiana, parámetros de cultivo y rendimiento de los biorreactores en experimentos de fermentación oscura. Con estos datos se realizaron análisis estadísticos multivariados que permitieran entender la relación entre las variables ambientales, el rendimiento de la producción de hidrógeno y la composición de las comunidades microbianas. Por otra parte, se infirieron las redes ecológicas de co-ocurrencia de las comunidades asociadas a la digestión anaerobia y a la fermentación oscura para compararlas e identificar cambios en su estructura que pudieran tener relación con la robustez de las comunidades.

Los resultados muestran que la presencia de algunas familias de bacterias se relaciona con el rendimiento de hidrógeno ya sea positiva (*Symbiobacteraceae*, *Geobacteraceae*, *Tissierellaceae*, *Ruminococaceae*, y *Oxalobacteraceae*) o negativamente (*Bacillaceae*, *Lactobacillaceae* y *Sporolactobacillaceae*). Por otra parte, no se pudo establecer el papel de algunas familias en estas comunidades (*Veillonaceae*, *Streptococaceae* y *Pseudomonadaceae*), aunque algunas se han asociado a mejorar las condiciones en los biorreactores (mantenimiento de condiciones anaerobias en los reactores o por formación de biopelículas). En cuanto al análisis de redes, ambas (digestión

anaerobia y fermentación oscura) tienen propiedades que concuerdan con otras redes reales (distribución de grado ajustable a una ley de potencias y de mundo pequeño). Además, los parámetros topológicos de ambas redes indican que los nodos de la red de digestión anaerobia están mayormente conectados entre sí y la red de fermentación oscura es mucho más central. Ambas propiedades sugieren que la red de digestión anaerobia es más robusta ante la eliminación aleatoria de nodos y podría serlo a la invasión de otras especies ya que el análisis de robustez mostró que la red de digestión anaerobia tiene un mayor coeficiente de robustez y una menor vulnerabilidad promedio. Estos resultados podrían ayudar a explicar la estabilidad operacional de las comunidades de digestión anaerobia a largo plazo y, en contraste, la inestabilidad de las comunidades de fermentación oscura.

Introducción

Combustibles fósiles: contaminación y cambio climático global

El cambio climático global es un problema grave que requiere de una estrategia multidisciplinaria a nivel mundial para su solución. El objetivo principal es disminuir la dependencia en los combustibles fósiles que hoy en día constituyen la mayor parte de la energía usada (IEA, 2012). El uso de combustibles fósiles genera contaminantes y gases de efecto invernadero asociados al cambio climático global, se estima que de seguir con la tendencia actual de emisiones la temperatura aumente hasta 3.5°C en promedio para el 2035 (IEA, 2011). Aunado a esto, el inevitable agotamiento de combustibles fósiles y el aumento de su precio hacen urgente desarrollar nuevas formas de energía para lograr un desarrollo sostenible. Ecológicamente, el cambio climático afecta a todos los niveles de organización (Bellard *et al.*, 2012) y ya se han documentado ejemplos de cambios significativos en la ubicación altitudinal de comunidades vegetales y las consecuencias negativas de estos cambios (Brusca *et al.*, 2013). Es por esto que, como parte de la estrategia para reducir las emisiones de CO₂, recientemente se han investigado formas de generar combustibles cuyo uso no genere gases de efecto invernadero y que provengan de fuentes renovables.

En este contexto, los biocombustibles pueden ayudar a reducir el uso de combustibles fósiles ya que son producidos a partir de materia orgánica renovable y, en general, contaminan menos que los combustibles de origen fósil (Potters *et al.*, 2010). Los biocombustibles primarios son aquellos producidos a partir de materia orgánica que es usada directamente como fuente de energía (e.g. leña), mientras que los secundarios son los que conllevan la transformación de materia orgánica para obtener combustible como la fermentación de azúcares para obtener bioetanol (Salvi *et al.*, 2013). La primera generación de biocombustibles secundarios (e.g. bioetanol y biodiesel) tienen como principal desventaja el uso de recursos utilizados para la producción de alimento de consumo humano por lo que la crisis alimentaria actual hace poco viable y ética su

producción (Guo *et al.*, 2010). Las siguientes generaciones de biocombustibles plantean el uso de recursos renovables y de bajo costo; por ejemplo, la producción de biogás rico en metano o hidrógeno a partir de materia orgánica de desecho (Salvi *et al.*, 2013).

El metano (CH_4) es un combustible de alta energía (~ 50 kJ/kg; Das, 1996) y con una baja emisión de CO_2 y CO (Adewole *et al.*, 2013; Tabla 1). Se puede usar como combustible en casas y negocios, en automóviles, para generar electricidad y productos químicos (Chandra *et al.*, 2012; Weiland, 2010). El metano puede producirse mediante la hidrogenación de CO_2 usando la reacción de Sabatier (Walspurger *et al.*, 2014), por “hydrocracking” del petróleo o extraerse del subsuelo en forma de gas natural que contiene al menos 70% de metano (Wade, 2004).

El hidrógeno molecular (H_2) tiene casi 3 veces más energía por kilogramo (141.9 kJ/kg) que la gasolina y el gas natural (Das, 1996) y su combustión sólo genera óxidos de nitrógeno (NO_x ; causantes de lluvia ácida) y agua (Tabla 1). El hidrógeno se puede usar para generar electricidad, en vehículos de transporte (i.e. automóviles, aviones, barcos, etc.) y como fuente de energía para el sector doméstico, comercial e industrial (Momirlan y Veziroglu, 2005). Aunque el hidrógeno es el elemento más abundante en el universo, es difícil encontrarlo como hidrógeno molecular ya que generalmente se encuentra asociado al oxígeno en el agua o formando parte de hidrocarburos. Para separar el hidrógeno de otros elementos se usan métodos como el reformado de metano y la electrólisis de agua (Salvi *et al.*, 2013).

Tabla 1. Comparación De Los Contaminantes Producidos Por Diversos Combustibles (Modificada De Momirlan Y Veziroglu, 2005). La Cruz Indica Producción Del Contaminante.

Contaminantes	H ₂ O	Monóxido de carbono	Dióxido de carbono	Partículas de carbono	Metales Pesados	Radioactividad	NO _x
Combustibles							
Carbón		×	×	×	×	×	×
Petróleo		×	×		×		×
Gas Natural (CH ₄)		×	×				×
Energía Nuclear						×	
Hidrógeno	×						×

Producción de biogás

Actualmente, los métodos usados para producir metano e hidrógeno requieren grandes cantidades de energía y no son sostenibles. La producción de biogás es una estrategia con potencial para reemplazar a los combustibles fósiles pues es posible producir gas combustible poco contaminante a partir de fuentes renovables. El método más importante en la producción de biogás es la digestión anaerobia y, un subtipo de ésta, la fermentación oscura se usa principalmente en la producción de gas rico en hidrógeno.

Digestión anaerobia

La transformación de materia orgánica en metano ocurre naturalmente como parte de la descomposición de materia orgánica en la cadena trófica de ambientes anaerobios (Gerardi, 2003). Este procedimiento, llamado digestión anaerobia, consiste en la heterofermentación de materia orgánica (restos de plantas y animales) y sus productos son metano, alcoholes, CO₂ y nuevas células procariontes. Aunque generalmente se asocia la digestión anaerobia al tratamiento de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales, también es utilizada para convertir materia orgánica compleja (e.g. proveniente de materia lignocelulósica) para la producción de

biogás. La digestión anaerobia para la producción de biogás tiene varias ventajas además de producir combustible (Figura 1): el digestato resultante es un buen fertilizante; es posible disminuir la contaminación del agua y reducir el contenido de patógenos; es posible tratar residuos orgánicos sólidos; pueden llevarse a cabo independiente y domésticamente; y tiene un requerimiento de energía mínimo (Chandra *et al.*, 2012; Show *et al.*, 2012).

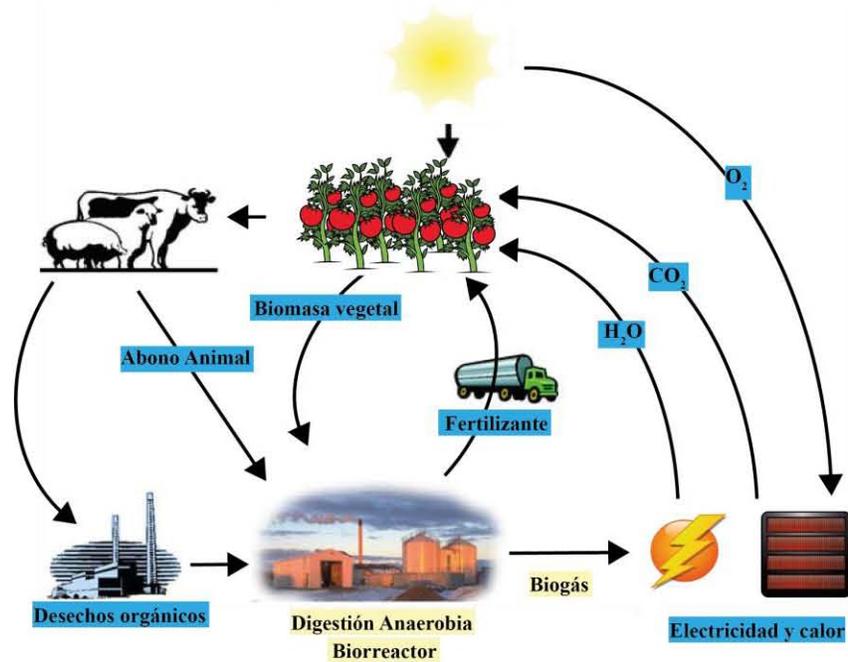


Figura 1. Ciclo de la producción de biogás (Modificada de Holm-Nielsen *et al.*, 2009).

El proceso de digestión anaerobia comprende cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Figura 2). La hidrólisis hace metabólicamente disponibles los polímeros al transformarlos en monómeros por medio de la liberación de enzimas extracelulares (e.g. celulasas, celobiasas, xilanasas, lipasas y proteasas; Weiland, 2010) y es por lo tanto considerado un paso limitante en la digestión anaerobia (Vavilin *et al.*, 2008).

Durante la acidogénesis los monómeros son fermentados para producir ácidos grasos volátiles de distintas longitudes, alcoholes, CO₂ y H₂ (Chandra *et al.*, 2012). Los ácidos grasos y el

hidrógeno son intermediarios y precursores del metano (Figura 2), por lo que este paso es esencial en la producción de sustratos para el último paso de la digestión anaerobia.

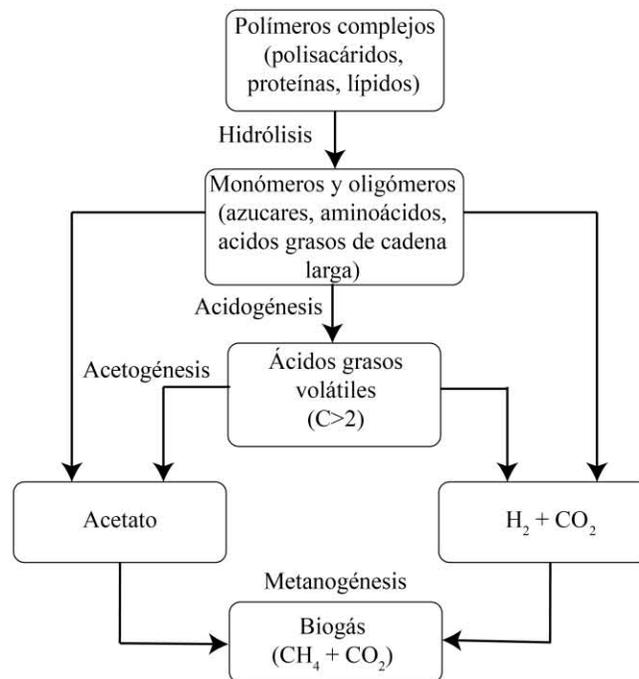


Figura 2. Pasos de la digestión anaerobia. (Modificada de Chandra *et al.*, 2012).

La acetogénesis comprende la formación de acetato a partir de varios sustratos y rutas, por ejemplo: los ácidos grasos más grandes son convertidos en acetato e hidrógeno (Weiland, 2010), las azúcares son transformadas sólo en acetato (homoacetogénesis; Müller, 2003) y el CO₂ es reducido por hidrógeno (Chandra *et al.*, 2012). En la digestión anaerobia, la acetogénesis también es un paso limitante pues el acetato es el principal sustrato para la producción de metano (Chandra *et al.*, 2012).

La metanogénesis es la producción de metano por parte de arqueas metanógenas. Este proceso puede ser de tres tipos (Chandra *et al.*, 2012): acetoclástica (acetato como sustrato), hidrogenotrófica (CO₂ y H₂ como sustrato) y metilotrófica (metanol como sustrato). La metanogénesis tiene un papel muy importante en la digestión anaerobia pues consume el H₂ que inhibe el metabolismo de las bacterias productoras de hidrógeno y de las acetógenas (Weiland,

2010). Cada etapa puede ser realizada por grupos de organismos diferentes o uno mismo puede participar en más de una etapa (Tabla 2).

Tabla 2. Ejemplos de las reacciones químicas en la digestión anaerobia. El fondo oscuro indica producción de hidrógeno.

Etapa	Producto	Reacción	Organismo
<i>Hidrólisis</i>	Monómeros	Substratos complejos → Monómeros	Varios
<i>Acidogénesis</i>	Propionato	Glucosa + 2H ₂ → Propionato + 2H ₂ O + 4 ATP	<i>Propionibacterium</i> sp. (Chu et al., 2010).
	Lactato	Glucosa → 2 Lactato + 2ATP	<i>Lactobacillus</i> sp.(Sikora et al., 2013)
	Etanol	Glucosa → 2 Etanol + 2CO ₂ + 2ATP	<i>Escherichia coli</i> (Clark, 1989)
	Butanol	2 Hexosa → Butanol + Acetona + 5CO ₂ + 4H ₂	<i>Clostridium acetobutylicum</i> (Madigan et al., 2012)
	Butirato	Glucosa → -Butirato + 2CO ₂ + 2H ₂ + 3ATP	<i>Clostridium butyricum</i> (Madigan et al., 2012)
<i>Acetogénesis</i>	Acetato	4H ₂ + 2HCO ₃ ⁻ + H ⁺ → CH ₃ COO ⁻ + 4H ₂ O	<i>Clostridium aceticum</i> (Hawkes et al., 2007)
	Acetato	Glucosa + 2H ₂ O → 2Acetato + 2CO ₂ + 4H ₂	Clostridiaceae (Hawkes et al., 2007)
<i>Metanogénesis</i>	Metano	Acetato → CH ₄ + CO ₂	<i>Methanosarcina</i> sp. (Aiyuk et al., 2006)
	Metano	H ₂ +CO ₂ → CH ₄	<i>Methanococcus</i> sp. (Weiland, 2010)
	Metano	Metanol → CH ₄ + H ₂ O	Thermoplasmata (Poulsen et al., 2013)

Fermentación oscura

Aunque el hidrógeno es el elemento más abundante del universo, su producción a partir de métodos sostenibles sigue siendo un reto. Los métodos de producción de biohidrógeno se dividen en dos categorías: los procesos dependientes de luz y los independientes de luz. Los métodos dependientes de luz son la fotólisis directa e indirecta y la fotofermentación. Dentro de los métodos independientes de luz, la fermentación oscura es uno de los que tiene mayor potencial.

La fermentación oscura es un subtipo de la digestión anaerobia donde la fase metanogénica es inhibida. En comparación con los métodos dependientes de luz, la fermentación oscura tiene varias ventajas pues no requiere de infraestructura especializada para captar la luz solar, tiene un bajo costo operacional (Kim *et al.*, 2011a) y los microorganismos asociados a este proceso pueden usar directamente residuos orgánicos de desecho (e.g. residuos de comida, aguas residuales domésticas o industriales) como fuente de energía y carbono para producir hidrógeno (Show *et al.*, 2012). Además la fermentación oscura puede integrarse a otros procesos como la fotofermentación para usar los ácidos grasos volátiles resultantes para generar más hidrógeno (Show *et al.*, 2012).

En la fermentación oscura pueden usarse cultivos puros o mixtos. Los cultivos mixtos tienen ventajas considerables con respecto a los cultivos puros: no requieren de condiciones de esterilidad, tienen una combinación de rutas metabólicas que les permiten degradar un mayor rango de sustratos y en ellos existen mutualismos que pueden incrementar la producción de hidrógeno (Hung *et al.*, 2011).

Los inóculos para cultivos mixtos se pueden obtener de ambientes anaerobios (e.g. rizósfera, zonas intermareales (Doi *et al.*, 2010), rumen (Nissilä *et al.*, 2011), estiércol (Merlino *et al.*, 2013), lodos activados usados en el tratamientos de aguas (Kotay y Das, 2009) y digestores anaerobios (Merlino *et al.*, 2013). En el caso de cultivos termófilos los inóculos pueden extraerse de

aguas termales (Mäkinen *et al.*, 2012). Los cultivos termófilos disminuyen el riesgo de contaminación por metanógenos (Rittmann y Herwig, 2012) y la temperatura favorece la estequiometría de la producción de hidrógeno lo que puede implicar mayor rendimiento (incrementando las tasas de las reacciones químicas y enzimáticas, haciendo más favorable la termodinámica de la producción de hidrógeno y haciéndola menos sensible a la presión parcial de hidrógeno; Groenestijn, 2002). La desventaja es que se requiere mucha energía para mantener la temperatura óptima en estos cultivos (>60°), aunque esta puede ser subsanada usando aguas residuales industriales que se desechan a altas temperaturas (Roy *et al.*, 2012).

Los substratos que se pueden usar en la fermentación oscura incluyen medios definidos con azúcares como fuente de carbono o indefinidos, como residuos industriales; residuos alimenticios; aguas negras o residuos lignocelulósicos. En las comunidades microbianas usadas como inóculos en la fermentación oscura existen varios géneros de organismos que no son productores de hidrógeno o que lo usan como fuente de energía para producir metano. Con el objetivo de eliminar estos organismos de los cultivos se usan pretratamientos químicos, físicos y térmicos. Los pretratamientos químicos incluyen inhibidores de las arqueas metanogénicas (e.g. el acetileno y el bromoetanolsulfonato; Valdez-Vazquez y Poggi-Varaldo, 2009). Los pretratamientos físicos incluyen el congelamiento del inóculo, mientras que los térmicos la ebullición del mismo. Estos últimos pretratamientos aprovechan la capacidad de los mayores productores de hidrógeno (género *Clostridium*) de formar esporas. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que se puede prescindir del pretratamiento para la producción de hidrógeno para la selección de las comunidades hidrogenogénicas (Kim *et al.*, 2011b).

Las condiciones de operación del bioreactor afectan el crecimiento de la comunidad de microorganismos y por lo tanto la producción de hidrógeno; por lo que el estricto control de la temperatura, pH, concentración de sustrato y tiempo de dilución son indispensables para el óptimo funcionamiento del bioreactor. En el caso del pH de los bioreactores generalmente se

mantiene por debajo de 6 pues los metanógenos crecen en un rango limitado de pH (entre 6.8 y 7.2; Kannaiah Goud y Venkata Mohan, 2012) mientras que los productores de hidrógeno crecen en un rango mayor (4.5-6.7; Hawkes *et al.*, 2007). El tiempo de dilución es importante pues los microorganismos crecen a diferentes velocidades por lo que su manejo puede dar lugar a la desaparición o dominancia de ciertos grupos (Madigan *et al.*, 2012).

Contexto económico, social y medioambiental del desarrollo de biocombustibles

Es importante destacar que la implementación de toda tecnología debe hacerse teniendo en cuenta el contexto social, económico y medioambiental en el cual se desarrollan. En ese sentido, los biocombustibles no son la excepción, ya que la integración de la industria energética con la agricultura puede poner en riesgo la seguridad alimentaria y el desarrollo sostenible. Por una parte el uso de cultivos de consumo humano (e.g. maíz, trigo o soya) para la producción de biocombustibles incrementa los precios de estos (Naylor *et al.*, 2007). Por otra parte, el uso de grandes extensiones de tierra para el cultivo de cultivos energéticos (como especies del género *Jatropha*, de mijo o pastos) promueve la competencia por suelo con cultivos de consumo humano lo que puede aumentar los precios de los últimos si los cultivos energéticos son más rentables (Naylor *et al.*, 2007). Ambas situaciones pueden poner en peligro la seguridad alimentaria de muchas personas, por lo que debe preponderarse el desarrollo de la producción de biogás a partir de materia orgánica de desecho. También hay que tener en cuenta que la participación de empresas como Exxon o Shell (que ya realizan investigación acerca de biocombustibles; Clarke y James, 2015; Porretto, 2009) podría ejercer presión para que las situaciones anteriormente descritas sucedan. Por lo tanto, hay que considerar el desarrollo conjunto de plataformas que permitan la producción de biocombustibles de forma doméstica e independiente.

La producción de biogás también conlleva la producción de residuos sólidos conocidos con el nombre de digestato. Este digestato puede ser usado como composta previo tratamiento para remover el nitrógeno excedente (Mela y Canali, 2014). Aplicar esta medida así como la

verificación de la presencia de patógenos es fundamental para la implementación de esta tecnología. De esta forma, deben desarrollarse nuevas políticas que integren la producción de biogás y los aspectos sociales, ambientales y económicos para asegurar que el uso de esta tecnología sea realmente sostenible y responsable.

Ecología de los biorreactores

Debido a que la producción de biogás está asociada a la dinámica de las comunidades cultivadas en los biorreactores, entender la dinámica de las comunidades, así como las interacciones entre sus miembros, es de suma importancia para entender las causas de las fallas en los biorreactores y optimizar el proceso. Algunos aspectos de la ecología microbiana de las comunidades metanogénicas e hidrogenogénicas han sido identificados, encontrándose interacciones que favorecen o disminuyen la producción de hidrógeno y metano (Tabla 3). Por otra parte, hay varios organismos cuya función no ha sido identificada, por lo que hace falta ahondar más en la investigación de estos organismos.

Tabla 3. Interacciones y funciones conocidas en las comunidades de bacterias hidrogenogénicas (Hung *et al.*, 2011; Weiland, 2010).

Interacción/ función	Efecto	Grupos
<i>Formación de gránulos o biopelículas por exopolisacáridos</i>	Retención de biomasa y células bacterianas.	<i>Streptococcus, Bacillus</i>
<i>Consumo de oxígeno</i>	Condiciones anaeróbicas del biorreactor. Previene la inhibición de anaerobias estrictas. Aumento en la producción de hidrógeno y metano.	<i>Enterobacter, Bacillus, Klebsiella</i>
<i>Degradación de substratos complejos.</i>	Substratos simples disponibles para otros microorganismos.	<i>Bifidobacterium, Pseudomonas</i>
<i>Competencia por substrato</i>	Substrato no disponible para los productores de hidrógeno.	<i>Clostridium, Lactobacillus</i> , homoacetógenos, productores de propionato.

<i>Inhibición por bacteriocinas</i>	Inhibición de bacterias del género <i>Clostridium</i> por bacteriocinas producidas por bacterias del género <i>Lactobacillus</i> . Disminución de la producción de hidrógeno.	<i>Bacterias productoras de ácido láctico</i> (Hung <i>et al.</i> , 2011; Thuault <i>et al.</i> , 1991).
<i>Producción de hidrógeno</i>	Hidrógeno usado como sustrato por las metanógenas.	Clostridiaceae
<i>Consumo de hidrógeno</i>	Disminución de la presión parcial de hidrógeno que permite el crecimiento de las bacterias productoras de hidrógeno y de las acetogénicas. Producción de metano y bajo rendimiento de hidrógeno.	Metanógenos

Uno de los problemas que enfrenta la producción de biohidrógeno es la inestabilidad y el bajo rendimiento en los biorreactores. Por ejemplo, se ha identificado un patrón en estos reactores donde el inicio de la producción de hidrógeno es rápido y luego la producción decrece rápidamente (Koskinen *et al.*, 2007); esta inestabilidad se ha encontrado, incluso, usando medios definidos (Jo *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2001). Se ha demostrado que los cambios en las comunidad son los responsables de la inestabilidad y el rendimiento de hidrógeno aunque no se sabe si es por cambios en el metabolismo de algunas poblaciones, por cambios en la composición de poblaciones o por ambos (Prasertsan *et al.*, 2009). Debido a esto, y para esclarecer las causas de la estabilidad y el bajo rendimiento, es indispensable entender la dinámica, composición, demografía y las interacciones de las comunidades microbianas de biorreactores a profundidad.

Además de estudiar cualitativamente la ecología de las comunidades microbianas de biorreactores, es importante tratar de establecer relaciones cuantitativas y estadísticas entre la diversidad y la función de estas comunidades. En ecología, se han usado diferentes acercamientos para establecer este tipo de relaciones, por ejemplo, los análisis multivariados u ordenaciones. Estos análisis son útiles pues permiten resumir grandes cantidades de información proveniente de

múltiples muestreos estadística y visualmente, ayudando a encontrar patrones que es imposible dilucidar estudiando los experimentos por separado. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, estos análisis han sido poco usados para el análisis de la ecología microbiana de biorreactores.

Uno de los análisis multivariados más usado en ecología es el análisis de componentes principales (PCA). Este análisis calcula variables sintéticas (componentes principales) a partir de combinaciones lineales entre las variables originales y que permiten explicar la mayor proporción de varianza de los datos originales (Ramette, 2007). Su objetivo es representar las variables sintéticas (en forma de vectores) y las muestras en un nuevo sistema de coordenadas donde la mayor parte de la varianza esté representada. Este método puede ayudar a establecer relaciones intramuestras que ayuden a establecer patrones entre las variables estudiadas (dado por el ángulo entre los vectores de las variables; Ramette, 2007). Por ejemplo, en un estudio (Novak *et al.*, 2010) acerca del nicho de especies de insectos del orden Hymenoptera se realizó un análisis de componentes principales usando las variables ambientales de las cuevas donde habitan estos organismos. El resultado se muestra en la figura 3 donde podemos observar una relación (dada el ángulo entre los ejes de esas variables) entre la temperatura del suelo y el aire así como entre la humedad del substrato y del aire.

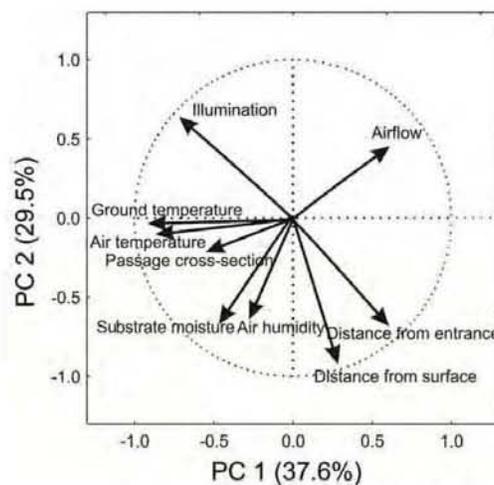


Figura 3. Ejemplo de un análisis de componentes principales que modela la relación entre las variables ambientales del hábitat de varias especies del orden Hymenoptera. Tomada de (Novak *et al.*, 2010)

Otro de los métodos de ordenación más usados en ecología es el análisis de correspondencias canónicas (CCA). Este análisis se basa en relaciones unimodales entre especies y variables ambientales para modelar la respuesta a la variación ambiental como una simplificación matemática que permite la estimación de un gran número de parámetros en un número pequeño de ejes de ordenación (Ramette, 2007). Este análisis permite identificar factores ambientales que influyen la diversidad de especies, además, se pueden generar hipótesis acerca de si existe una respuesta particular de algunas especies a la variación específica en alguna variable (lo que se conoce como especies indicadoras; Ramette, 2007). Estas hipótesis pueden probarse por medio de experimentos o por medio del análisis estadístico de especies indicadoras (De Cáceres y Legendre, 2009). Por ejemplo en la figura 4 se muestra un análisis de correspondencias canónico que modela la relación entre variables ambientales y especies de plantas marinas. En este estudio (Grewell, 2008) se encuentra que la abundancia de algunas de estas especies es explicada por algunas de las variables ambientales estudiadas; esto se interpreta por la posición de los centroides que representan las especies (en forma de cruces) en relación a los vectores de las variables.

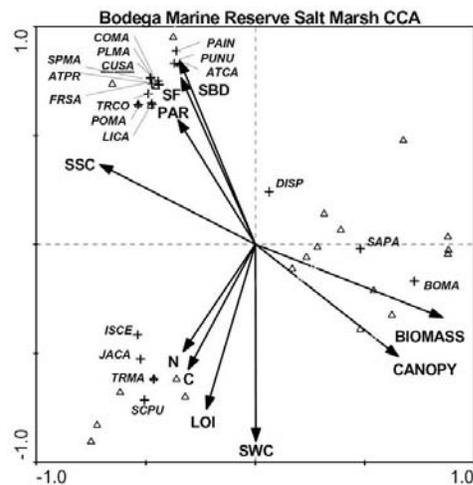


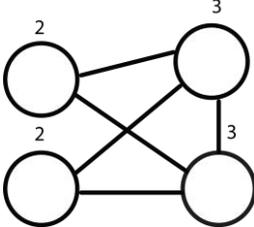
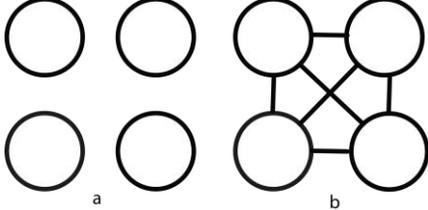
Figura 4. Ejemplo de un análisis de correspondencias canónico que modela la abundancia de especies de plantas marinas y algunas variables ambientales. Tomada de (Grewell, 2008).

Inferencia y Análisis de redes

La inferencia y análisis de redes ha sido propuesto como un acercamiento para analizar sistemas complejos (como comunidades ecológicas) logrando una perspectiva holística que sería imposible obtener analizando los componentes de los sistemas de forma aislada. Las redes son gráficas formadas por nodos o vértices (que representan elementos de la red) y aristas (que representan interacciones entre los entes). Las propiedades topológicas de las redes pueden ser importantes para predecir el funcionamiento de los sistemas (Newman, 2003) y su robustez (la persistencia de características de interés en la respuesta de un sistema ante perturbaciones; Dunne, 2005). Algunos de los atributos topológicos más estudiados en las redes complejas se describen en la Tabla 4.

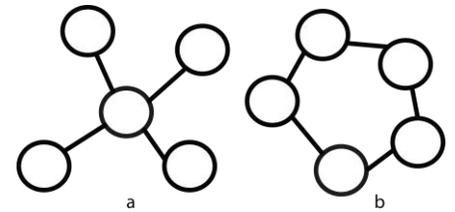
En ecología, los análisis de redes han sido empleados para modelar las redes tróficas en las comunidades y hacer inferencias acerca de su estabilidad (Proulx *et al.*, 2005). Por ejemplo, se ha puesto mucha atención en redes de las interacciones entre plantas y animales y cómo estas relaciones pueden influir en el desarrollo y mantenimiento de la biodiversidad (Bascompte y Jordano, 2007).

Tabla 4. Atributos topológicos de las redes estudiados comúnmente.

Atributo	Descripción	Ejemplo
<i>Grado</i>	El grado de un nodo se refiere al número de conexiones que tiene con otros nodos. El grado promedio de una red es el promedio del grado de todos los nodos que la conforman. La red de ejemplo tiene un grado promedio de 2.5.	
<i>Densidad</i>	Indica la proporción de conexiones reales con respecto a las posibles (Kasthurirathna <i>et al.</i> , 2014). Una “red” de nodos aislados (red <i>a</i>) tendría una densidad igual a 0, mientras que un <i>clique</i> (una red donde cada par de nodos está conectado; red <i>b</i>) tiene una densidad de 1.	

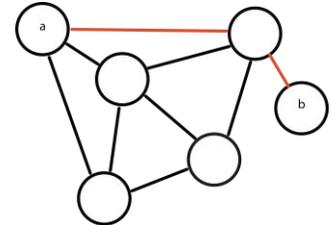
Centralización

Indica que tan desigual es la distribución de centralidad de los nodos; es decir hasta qué punto las aristas se distribuyen alrededor de puntos focales o *hubs* (Dong y Horvath, 2007). Redes con forma de estrella (red *a*) tienen un valor de 1, mientras que redes regulares (red *b*) tienen centralidades cercanas a 0.



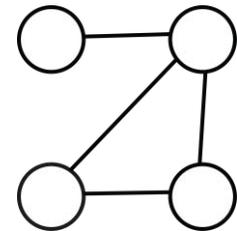
Longitud de Camino Promedio

Es la longitud promedio de los caminos más pequeños entre todos los pares de nodos en una red (Kasthurirathna *et al.*, 2014). En la red de ejemplo se marca el camino más corto entre el nodo *a* y el nodo *b*; el promedio de esos caminos más cortos es la longitud de camino promedio (1.4 en la red de ejemplo).



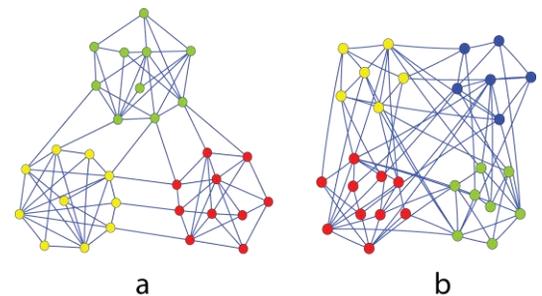
Conectancia

Indica la proporción de conexiones reales con respecto al número de nodos (Dunne *et al.*, 2002). Se obtiene con la fórmula $conectancia = \frac{L}{S^2}$ donde *L* es el número de aristas y *S* el número de nodos. En el caso de la red de ejemplo esta tiene 4 aristas y 4 vértices por lo que tiene una conectancia de 0.25.



Modularidad

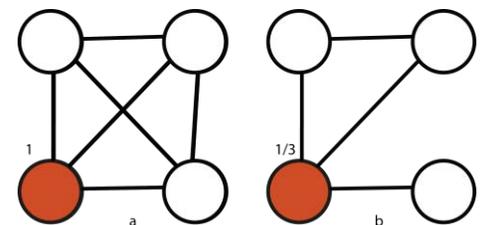
Indica hasta qué punto una red se puede separar en sub-redes independientes (Kasthurirathna *et al.*, 2014). Una mayor modularidad indica una estructura interna sofisticada (Bastian *et al.*, 2009). La red de ejemplo *a* tiene una estructura modular mientras que la red *b* no la tiene.



(Tomada de Wang y Zhang, 2007)

Coefficiente de Agrupamiento

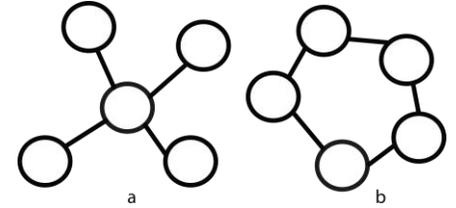
Es el promedio del coeficiente de agrupamiento de todos los nodos de la red. Este se define como la fracción de pares de vecinos de un nodo que están conectados entre sí (Dong y Horvath, 2007). En la red *a*, el nodo marcado tiene un coeficiente de agrupamiento de 1 pues existe una conexión



entre todos sus vecinos. Por otra parte en la red *b* el nodo marcado tiene un coeficiente de agrupamiento de 1/3 pues sólo existe 1 conexión de 3 posibles entre sus vecinos.

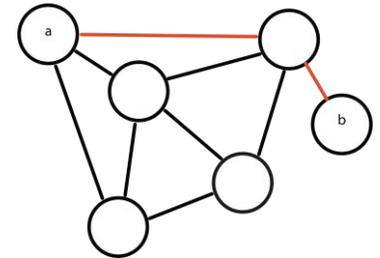
Heterogeneidad

Refleja la tendencia de una red a tener nodos muy conectados (Dong y Horvath, 2007). Una red con forma de estrella tendría una heterogeneidad de 1 (red *a*) mientras que la red regular *b* tendría una heterogeneidad baja.



Diámetro

Es la máxima longitud de los caminos más cortos entre dos nodos (Shannon *et al.*, 2003). La red de ejemplo tiene un diámetro de 2 pues esa es la distancia más larga entre todos los caminos más cortos entre los nodos.



En ecología microbiana, a falta de información directamente observable acerca de las interacciones entre los organismos, el análisis de redes se ha tomado recientemente como una herramienta importante para hacer inferencias acerca del nicho o importancia de los distintos grupos de una comunidad, así como de características sistémicas de las comunidades (Barberán *et al.*, 2012). A excepción de algunas redes de microorganismos generadas a partir de organismos cultivables (Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2014), estas suelen ser inferidas por medios estadísticos que permiten reconocer patrones de co-ocurrencia y co-exclusión entre los grupos. La construcción de redes puede hacerse por medio de datos de abundancia o de presencia ausencia (Faust y Raes, 2012). Los índices de correlación de Pearson y Spearman han sido usados para analizar las relaciones pareadas en la abundancia de OTUs, como las comunidades del microbioma humano (Faust *et al.*, 2012); mientras que la distribución hipergeométrica se ha usado para datos de presencia/ausencia (Faust y Raes, 2012; Freilich *et al.*, 2010). Nuevas aproximaciones basadas en métodos de la mecánica estadística pueden ser usados para inferir redes a partir de sets de observaciones aisladas de los miembros que interactúan en sistemas de diversa naturaleza (Clark *et al.*, 2012).

Las redes complejas muestran características distintivas en cuanto a su estructura, por ejemplo, en cuanto a su distribución de grado y la forma en la que se conectan los miembros de estas redes. Debido a estas propiedades estas redes han sido llamadas redes libres de escala y de mundo pequeño. Las redes libres de escala tienen una distribución de grado donde se observan pocos nodos con un grado alto y una gran cantidad de nodos con un grado bajo; además, esta distribución se puede ajustar bien a una ley de potencias (Newman, 2003). Algunas de las redes complejas como el internet y algunas redes tróficas presentan esta característica (Bascompte y Jordano, 2007). Por otro lado, las redes de mundo pequeño son redes en las que la mayoría de los nodos no son vecinos unos de los otros pero en las que existe un camino entre nodos relativamente pequeño (Newman, 2003). Estas redes (Figura 5) se caracterizan por tener un coeficiente de agrupamiento alto (parecido a una red regular, es decir, una red cuyos nodos están conectados de acuerdo a un patrón) pero una longitud de camino promedio bajo (parecido a una red aleatoria, cuyos nodos se conectan totalmente al azar; Watts y Strogatz, 1998). Ejemplos de redes de mundo pequeño son la red neural de *Caenorhabditis elegans* (Watts y Strogatz, 1998), algunas redes tróficas (Deng *et al.*, 2012) y redes ecológicas de microorganismos (Faust y Raes, 2012).

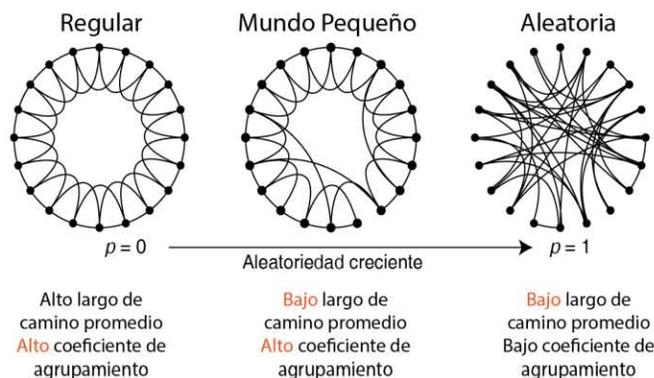


Figura 5. Características de las redes de mundo pequeño (Modificada de Watts y Strogatz, 1998).

Justificación

Tanto la digestión anaerobia, como la producción de biohidrógeno, son procesos con potencial de biorremediación y producción de combustibles como resultado de procesos sostenibles (Aiyuk *et*

al., 2006; Momirlan y Veziroglu, 2005). Estos procesos requieren de salvar algunos obstáculos que tienen que ver con la estabilidad del proceso y la optimización de las condiciones de cultivo. Se ha analizado extensivamente el efecto que tienen las condiciones de cultivo en la producción de hidrógeno y de forma superficial la dinámica de las comunidades responsables. Sin embargo, se han dejado de lado las interacciones que ocurren entre los organismos así como el papel que juegan algunos grupos de microorganismos. Este trabajo plantea reunir información de una cantidad representativa de comunidades procariontes en biorreactores y, por medio de análisis estadísticos y de redes, contribuir al entendimiento de las relaciones entre las especies de estas comunidades. El análisis de las redes de interacciones ecológicas podría ayudar a inferir la importancia de éstas para la comunidad y su estabilidad en distintas condiciones. Esta información es de suma importancia para optimizar el manejo de los biorreactores (Hung *et al.*, 2011).

Objetivos

Objetivo General

Identificar elementos sistémicos clave en el funcionamiento de reactores de digestión anaerobia y de reactores productores de hidrógeno mediante análisis estadísticos multivariados y de redes sobre la estructura ecológica y las interacciones bióticas de las comunidades procariontes presentes en biorreactores.

Objetivos Particulares

- Realizar una revisión bibliográfica de experimentos de fermentación oscura y de digestión anaerobia y elaborar de una base de los datos de la composición y las variables ambientales.
- Analizar estadísticamente la relación entre las variables ambientales y la estructura de las comunidades hidrogenogénicas.

- Reconstruir las redes de co-ocurrencias entre los miembros de las comunidades anaerobias e hidrogenogénicas.
- Analizar topológicamente ambas redes para describir las comunidades en términos de su robustez y de las interacciones entre sus miembros.
- Comparar ambas redes para encontrar cambios significativos entre la estructura de los dos tipos de comunidades.

Hipótesis

Considerando que las comunidades procariontes productoras de hidrógeno son derivadas de comunidades procariontes de digestión anaerobia, se plantearon las siguientes hipótesis:

Análisis Multivariados

H₀: Si el funcionamiento de los reactores productores de hidrógeno no depende de la composición microbiana, los análisis multivariados y estadísticos no mostrarán relaciones entre el rendimiento de hidrógeno y los grupos de procariontes analizados.

H_A: Si el funcionamiento de los reactores productores de hidrógeno depende de la composición microbiana, los análisis multivariados y estadísticos mostrarán relaciones entre el rendimiento de hidrógeno y los grupos de procariontes analizados.

Análisis de redes

H₀: Si la inestabilidad de las comunidades de reactores productores de hidrógeno no se debe a cambios en las propiedades sistémicas de las comunidades procariontes presentes debido a los pretratamientos, entonces no se identificarán cambios ni en los atributos topológicos ni en la robustez de la red de interacciones ecológicas entre las comunidades de digestión anaerobia y las de fermentación oscura.

HA: Si la inestabilidad de las comunidades de reactores productores de hidrógeno se debe a cambios en las propiedades sistémicas de las comunidades procariontes presentes debido a los pretratamientos, entonces se identificarán cambios en los atributos topológicos y en la robustez de la red de interacciones ecológicas entre las comunidades de digestión anaerobia y las de fermentación oscura.

Método

El flujo de trabajo seguido se muestra en la Figura 6. Por una parte, el método busca encontrar patrones que relacionen la función de los biorreactores productores de hidrógeno con la estructura de sus comunidades microbianas. Para esto, se realizó una revisión de la literatura registrando información de desempeño del reactor, parámetros operacionales y composición de las comunidades en el punto de máxima producción de hidrógeno; con esta información se llevaron a cabo análisis ecológicos y multivariados. Por otro lado, para encontrar cambios significativos en las estructuras de las comunidades microbianas productoras de hidrógeno y de las de digestión anaerobia (de las que se originan las primeras) se infirieron las redes ecológicas de ambos tipos de comunidades usando información de la composición de ambos tipos de comunidades en el punto de mejor desempeño en ambos tipos de reactores. El método se dividió en: i) construcción de las bases de datos y procesamiento de secuencias, ii) análisis multivariados e inferencia y iii) análisis de las redes ecológicas.

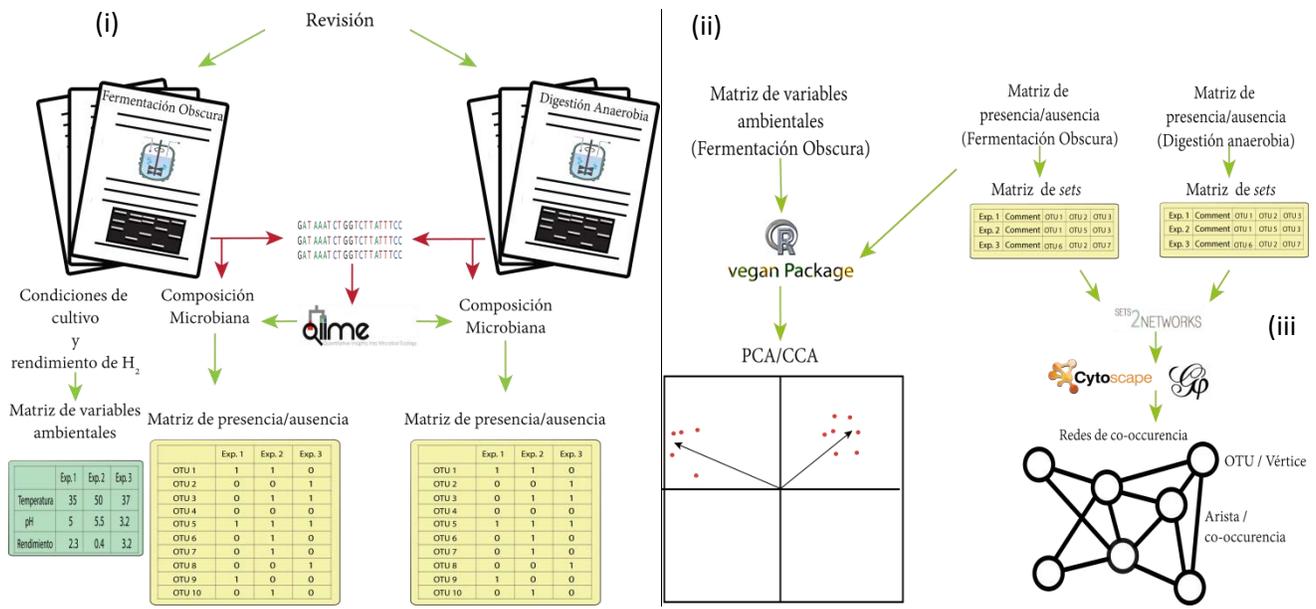


Figura 6. Flujo de trabajo seguido. (i) Construcción de las bases de datos, (ii) análisis multivariados, (iii) inferencia de redes.

Construcción de bases de datos.

Se realizó una búsqueda en *Scopus* (<http://www.scopus.com>) usando las palabras clave “Microbial” y “Dark Fermentation” para buscar experimentos de producción de hidrógeno por fermentación oscura. Para los experimentos de digestión anaerobia se usaron las palabras “Microbial” y “Anaerobic Digestion”. Para incluir un experimento dentro de la base de datos de la revisión, éste debía reportar la comunidad microbiana y, para los experimentos de fermentación oscura, el desempeño del reactor y los parámetros operacionales (temperatura y pH). Cada publicación revisada podía aportar más de un experimento a la base de datos si cumplía con los requisitos. La digestión anaerobia puede llevarse a cabo en al menos dos reactores separados (uno para las fases acidogénicas y otro para la metanogénesis), sin embargo, en esta revisión, y para poder asumir interacción entre los miembros de las comunidades, sólo se incluyeron experimentos donde todo el proceso se realizara en un sólo biorreactor. Para los experimentos de fermentación oscura obtuve los siguientes datos:

- a) Rendimiento de hidrógeno cuando se reportaba en moles de hidrógeno por moles de glucosa o hexosa consumida. Cuando se reportaban mililitros de hidrógeno estos se convirtieron a moles (tomando que 1 mol de H₂ = 22,400 ml) y cuando se reportaban gramos de glucosa estos se convirtieron a moles por medio de su masa molar (tomando que 1mol = 180.1 g). Finalmente, cuando el substrato se reportó en demanda química de oxígeno (COD) se usó la relación de 1.07 g COD iguales a 1 g de glucosa (Comeau, 2008).
- b) Temperatura en °C.
- c) pH
- d) Origen del inóculo. Clasificación en: digestores anaerobios, lodos activados, zonas intermareales, suelo, composta (incluye estiércol y rumen) y aguas termales.

Para el registro de los integrantes de las comunidades microbianas de ambos tipos de experimentos se consideraron los siguientes criterios:

- a) Reportes por medio de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE's) con identificación por marcadores o secuenciación y listados de especies por electroforesis capilar de polimorfismo de conformación de cadena simple (CE-SSCP's) y metagenómica de amplicones de 16S y de DNA total.
- b) Cuando se reportaban las secuencias del gen 16S rRNA para cada banda (o su pariente más cercano en el *Genbank*; Benson *et al.*, 2013)) se registraron los números de acceso de aquellas con una longitud de al menos 1000 pares de bases; en caso contrario, (menos de 1000 pares de bases) sólo se registraron la identidad de su pariente más cercano en el *Genbank*. En el caso de secuencias menores a 1000 pares de bases y que no contaban con un pariente identificado en el *Genbank* sólo se consideraron como un OTU en la cuenta total de especies por experimento (riqueza).

Procesamiento de secuencias

Las secuencias registradas fueron procesadas para su identificación usando el script *de novo assignment* implementado por *QIIME* (Caporaso *et al.*, 2010). El algoritmo (ver Anexo 1 para referencia de uso) agrupa las secuencias en clusters basados en similitud (95%; para aumentar la capacidad del análisis de detectar patrones). Posteriormente, toma una secuencia representativa de cada clúster y la usa para asignar la taxonomía a todo el clúster usando la base *Greengenes* especializada en el gen 16S rRNA (McDonald *et al.*, 2012). Para extender y facilitar el uso de este script usando datos de incidencia, se diseñó un script en *Python* que aplica los resultados a una base de datos proporcionada por el usuario usando los archivos generados por *QIIME*. Esta base de datos debe estar en formato *GMT* (Tabla 5) y contener una relación de muestras y el identificador de cada secuencia reportada en cada muestra (ver Anexo 2 para referencia de uso).

Tabla 5. Ejemplo de matriz en formato *GMT*.

Experimento 1	Comentario	OTU 1	OTU 2	OTU 3	OTU 4
Experimento 2	Comentario	OTU 1	OTU 5	OTU 6	
Experimento 3	Comentario	OTU 2	OTU 7	OTU 8	OTU 9

Análisis multivariados y estadísticos de la composición microbiana

Para analizar la hipótesis concerniente a la relación entre las condiciones de cultivo, el rendimiento de hidrógeno y la composición microbiana, se realizaron análisis multivariados. Específicamente, con los datos del rendimiento y operacionales de los biorreactores productores de hidrógeno se realizaron un análisis de componentes principales (PCA) y para relacionar la composición de la comunidad con la función y las variables ambientales un análisis de correspondencias canónico (CCA). Para relacionar la presencia de algunos OTUs con las variaciones en la producción de hidrógeno se hizo un análisis de especies indicadoras. Para esto, se categorizó el rendimiento de hidrógeno (usando 3 cuantiles) en producción “Baja”, “Media” y “Alta”. Todos los análisis se

llevaron a cabo usando *R* versión 3.1.2 (R Core Team, 2013), el paquete *vegan* (para los análisis multivariados; ver anexo 3 para referencia de uso) versión 2.0-10 (Oksanen *et al.*, 2013) y el paquete *indicspecies* (para el análisis de especies indicadoras; ver Anexo 3 para referencia de uso) versión 1.7.2 (De Cáceres y Legendre, 2009).

Inferencia y análisis de redes.

Para probar si había cambios en las propiedades sistémicas entre las comunidades a causa de los pretratamientos, se infirieron las redes ecológicas de los consorcios productores de metano y de los de hidrógeno. Posteriormente se realizó un análisis de robustez a ambas redes para probar si los cambios en las propiedades topológicas de ambas redes afectaban su robustez. Para inferir las redes ecológicas de ambos tipos de comunidades se utilizó el algoritmo *Sets2Networks* (Clark *et al.*, 2012). Este algoritmo asigna una probabilidad a cada arista entre dos vértices de formar parte de la red original usando, como única información, las co-ocurrencias en los *conjuntos* (cada *conjunto* es un observación donde se reportan n elementos juntos). Estos sets son muestreos independientes donde se reportaron n elementos que se asume interactúan en una red más grande que no está reportada *per se* (no se conoce), por lo que cada *conjunto* representaría una sub-red. Primero, cada *conjunto* de observaciones es tomado como una subgráfica aleatoria de tipo Bernoulli mínimamente conectada (i.e. una gráfica en la que cada nodo n está o no conectado con una probabilidad independiente p y en la que cada arista tiene la misma probabilidad de aparecer). Luego, la superposición de todas las gráficas aleatorias es tomada como un proceso de Bernoulli (i.e. la repetición de ensayos de Bernoulli) donde cada arista está sujeta a un ensayo de Bernoulli (i.e. un experimento aleatorio con sólo dos resultados) con probabilidades correspondientes a las gráficas aleatorias generadas por cada elemento (*conjunto*) del total de *conjuntos* (C). En esta aproximación, la probabilidad de que cada arista aparezca en la red original está dada por la siguiente fórmula:

$$p_{ij} = 1 - \Pi_k \left(1 - \frac{2\alpha}{n_{ij,k}}\right)$$

Donde $n_{ij,k}$ es igual al tamaño de los k elementos de C a los que los vértices v_i y v_j pertenecen y α es un parámetro que permite especificar la confianza de que las subredes estén localmente conectadas. El script que implementa este algoritmo utiliza matrices en formato *GMT* (ver ejemplo en Tabla 5) como entrada de datos, por lo que la matrices de presencia/ausencia fueron convertidas a *GMT*. Las probabilidades para todas las aristas posibles en ambas redes están reportadas en los Anexos 4 y 5. Para considerar una arista dentro de la red se tomaron sólo aquellos con una p de al menos 0.7 como se reportó en el artículo original del método (Clark *et al.*, 2012).

El análisis de las redes inferidas se realizó usando *Cytoscape* (Shannon *et al.*, 2003) y la modularidad usando *Gephi* (Bastian *et al.*, 2009). Para comparación de algunos parámetros se generó una red regular y 100 redes aleatorias por cada red inferida usando un modelo de redes de mundo pequeño (Complexity Explorer Project, 2013). Estas redes fueron generadas con características de grado y número de nodos similares a las redes inferidas. Promedí el coeficiente de agrupamiento y el camino promedio de las 100 redes para detectar si las redes inferidas tenían algunas propiedades de mundo pequeño. Finalmente, medí la conectancia, por ser un parámetro importante de las redes ecológicas, (Dunne *et al.*, 2002) usando la siguiente fórmula:

$$Conectancia = \frac{L}{S^2}$$

Donde L es el número de aristas y S el número de nodos.

Análisis de Robustez

Para medir la robustez ante la eliminación individual de nodos se midió el coeficiente de robustez (Piraveenan *et al.*, 2012) en ambas redes. Primero, la eliminación de los nodos se realizó

aleatoriamente (10,000 ensayos) y en un segundo análisis, los nodos se eliminaron siguiendo un orden decreciente de acuerdo a su grado. El coeficiente de robustez (R) mide que tan rápido se desintegra una red ante la pérdida individual y acumulativa de nodos (Piraveenan *et al.*, 2012) y se obtiene por medio de la siguiente fórmula:

$$R = \frac{200 \sum_k^N S_k - 100S_0}{N^2}$$

Dónde S_k es igual al componente más grande de la red después de eliminar k nodos; S_0 es el componente más grande de la red original y N , es igual al número de nodos de la red original.

De igual manera, se midió la vulnerabilidad promedio de ambas redes (Costa *et al.*, 2007). Esta medida es el promedio de la vulnerabilidad de cada nodo en las redes que se obtiene usando la siguiente fórmula:

$$V = \frac{E - E_i}{E}$$

Donde E es la eficiencia de la red original y E_i es la eficiencia de la red después de remover el nodo i . La eficiencia de una red es una medida que indica qué tan bien fluye la información en una red, suponiendo que ésta fluye mejor cuando existe una distancia baja entre nodos (Costa *et al.*, 2007). Por lo tanto la vulnerabilidad tiene que ver con cuanto cambia esta eficiencia cuando se remueven ciertos nodos. La eficiencia se obtiene por medio de la siguiente fórmula:

$$E = \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i \neq j} \frac{1}{d_{ij}}$$

Donde N es el número de nodos en la red y d_{ij} es el camino más corto en los nodos i y j . Tanto el coeficiente de robustez como la vulnerabilidad promedio fueron implementados en *Python* (ver Anexo 6) usando el paquete *NetworksX* (Hagberg *et al.*, 2008).

Resultados

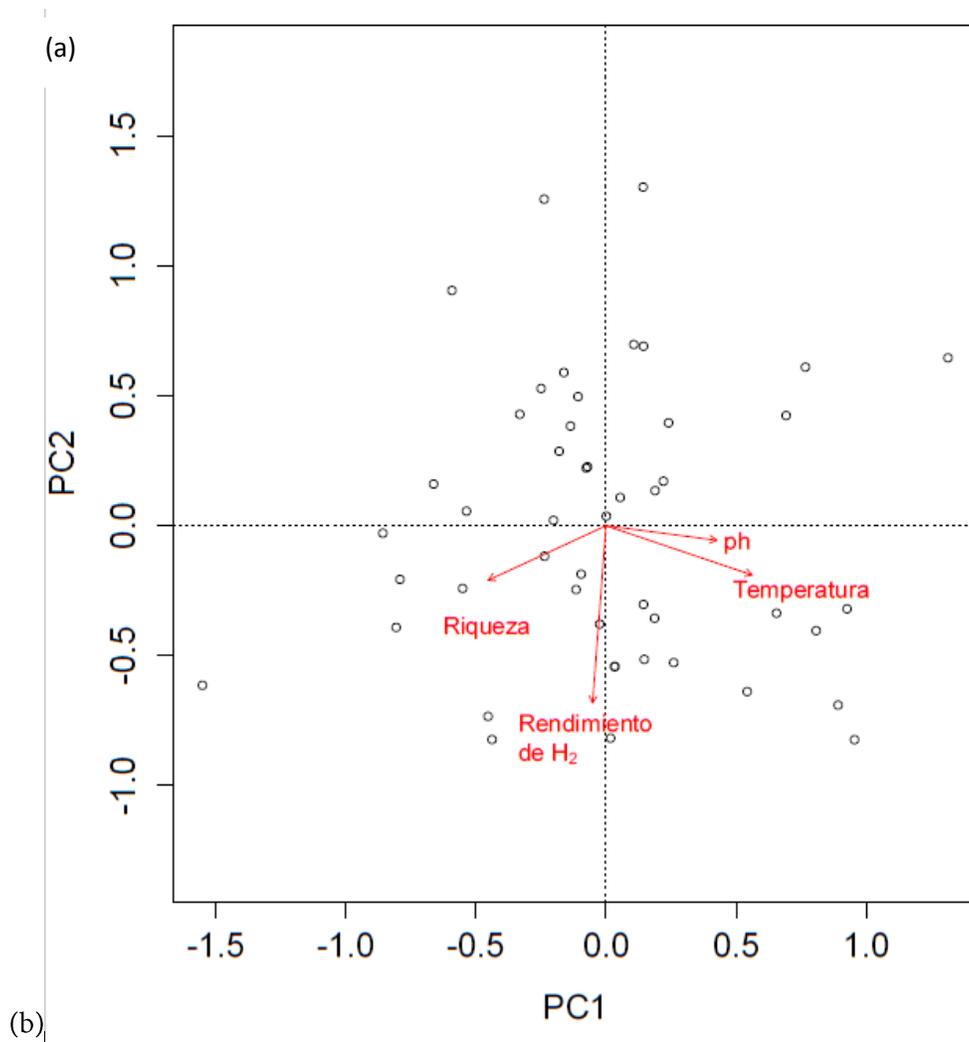
Para los experimentos de fermentación oscura se analizaron 48 experimentos de 43 publicaciones para los análisis multivariados y de especies indicadoras (Anexos 7 y 8) y 103 experimentos de 101 publicaciones para la inferencia de la red (Anexo 9). En total se identificaron 404 OTUs diferentes a nivel de especie en 61 familias. Para los experimentos de digestión anaerobia se analizaron 122 experimentos de 118 publicaciones para la inferencia de la red (Anexo 10). En total se identificaron 1189 OTUs a nivel de especies en 165 familias.

Análisis multivariados y estadísticos de la composición microbiana

El análisis de componentes principales (Figura 7) no muestra una agrupación de los experimentos de acuerdo a las variables ambientales. Sin embargo, los vectores de las variables escaladas sugieren una relación positiva (ángulo entre los ejes de las variables menor a 90°) entre la temperatura y la riqueza de especies con el rendimiento de hidrógeno.

El análisis de correspondencias canónico (CCA, Figura 8) entre las variables ambientales y las familias tampoco muestra una agrupación de las familias de procariontes alrededor de las variables estudiadas. Por una parte, muestra las mismas relaciones descritas entre las variables ambientales en el PCA y por otra, asocia algunas familias positiva (*Symbiobacteraceae*, *Ruminococcaceae*, *Tissierellaceae*, *Geobacteraceae* y *Oxalobacteraceae*) y negativamente (*Bacillaceae*, *Lactobacillaceae* y *Sporolactobacillaceae*) al vector de rendimiento de hidrógeno.

El CCA que incluye el origen del inóculo (Figura 9) muestra que los dos tipos de inóculo mayormente asociados positivamente al rendimiento de hidrógeno son los lodos activados y la composta. Igualmente, los lodos activados fueron asociados a mayor riqueza en los biorreactores.



Variable	Correlación	p-value
Temperatura - PC1	0.7728857	1.223092e-10
pH - PCA1	0.5856995	1.224449e-05
Riqueza - PC1	-0.6234019	2.213958e-06
Rendimiento de Hidrógeno – PC2	0.9385104	7.059118e-23
Riqueza – PC2	0.2886963	4.658872e-02

Figura 7. (a) Gráfica del análisis de componentes principales. Los puntos representan los distintos experimentos analizados y los vectores las variables ambientales. El primer componente (PC1) explica el 33.35 % de la varianza, involucrando principalmente pH, temperatura y riqueza. El segundo componente (PC2) explica el 25.96 % de la varianza involucrando principalmente rendimiento de hidrógeno. Datos de 48 experimentos. (b) Correlaciones entre las variables y los componentes principales.

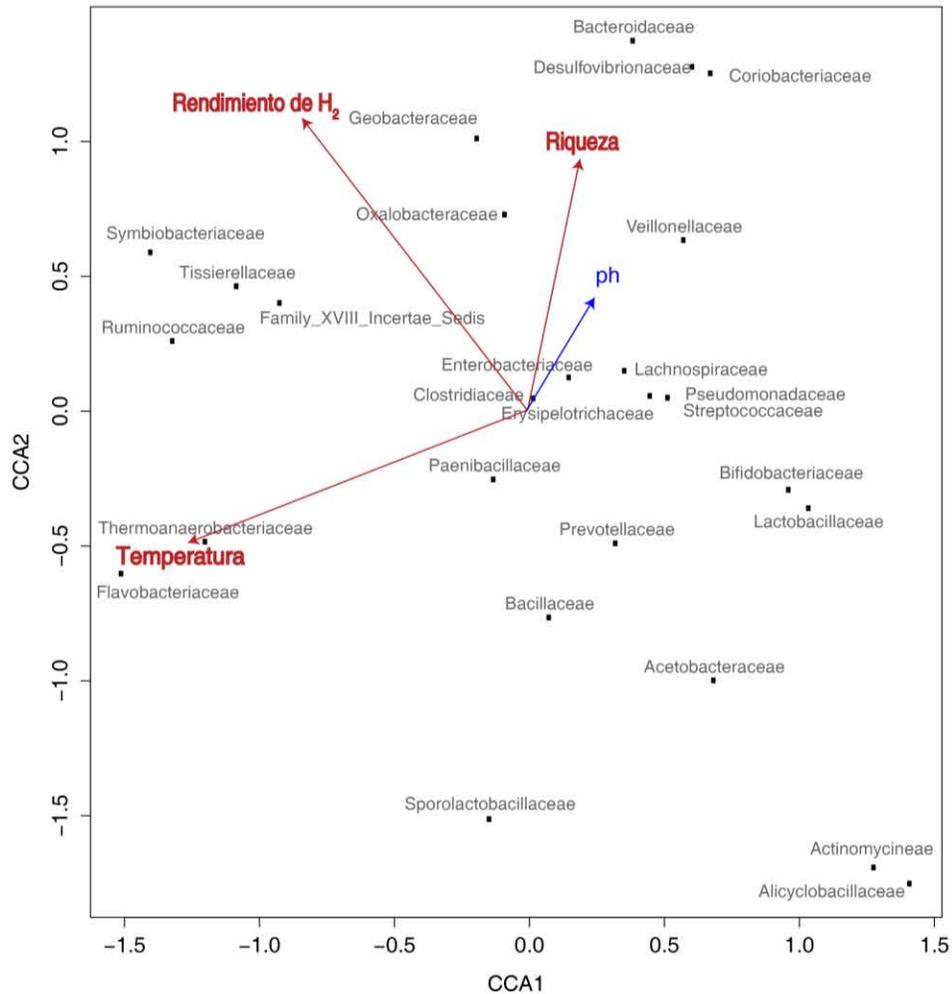


Figura 8. Gráfica del análisis de correspondencias canónico modelando la relación entre las variables ambientales y los OTUs (nivel de familia). Los puntos representan las distintas familias y los vectores las variables ambientales. El primer eje (CCA1) explica el 5.07% de la varianza, involucrando principalmente rendimiento de hidrógeno y temperatura. El segundo eje (CCA2) explica el 3.74% de la varianza involucrando principalmente riqueza y pH. Datos de 48 experimentos. Significancia de las variables independientes (p-values): 0.005; Rendimiento de hidrógeno: 0.04; temperatura: 0.01.

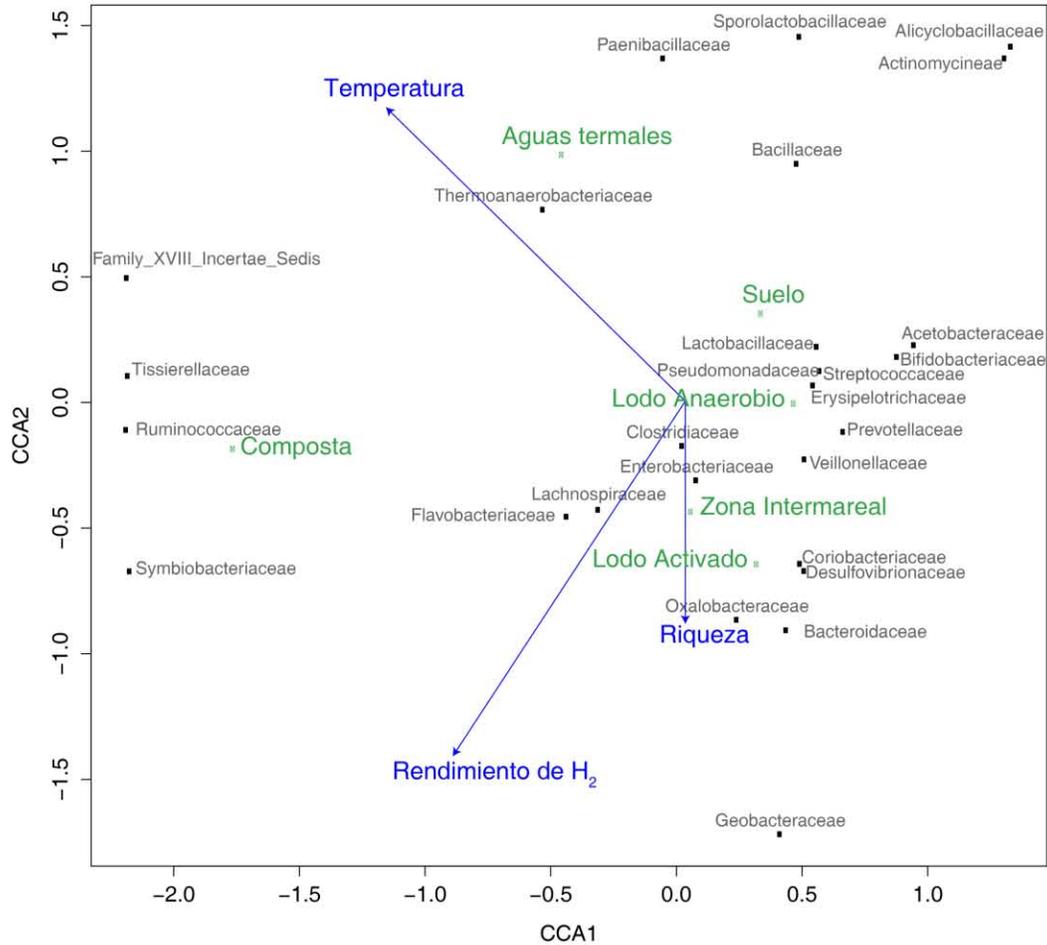


Figura 9. Gráfica del análisis de correspondencias canónico modelando la relación entre el origen del inóculo, el rendimiento de hidrógeno, temperatura, riqueza y los OTUs (nivel de familia). Los puntos representan las distintas familias de procariontes, los centroides los factores del origen de inóculo y los vectores las variables ambientales. El primer eje (CCA1) explica el 6.3% de la varianza, involucrando principalmente temperatura. El segundo eje (CCA2) explica el 4.02% de la varianza involucrando principalmente rendimiento de hidrógeno y riqueza. Datos de 48 experimentos. La relación entre las variables explicativas y los datos no fue significativa (p-value: 0.34).

Los resultados del análisis de especies indicadoras se muestran en la Tabla 6. Este análisis asocia significativamente el bajo rendimiento de hidrógeno en los biorreactores con las familias Bacillaceae, Lactobacillaceae y Sporolactobacillaceae (p-value < 0.05).

Tabla 6. Análisis de especies indicadoras que relaciona los OTUs con el 3 niveles de rendimiento de hidrógeno (Alto, Medio y Bajo). Nivel de significancia: ‘*’ 0.05. Datos de 46 experimentos.

Familia	Bajo	Medio	Alto	p-value
<i>Acetobacteraceae</i>	0	1	0	1
<i>Actinomycineae</i>	1	0	0	0.185
<i>Alicyclobacillaceae</i>	1	0	0	0.13
<i>Bacillaceae</i>	1	0	0	0.015*
<i>Bacteroidaceae</i>	0	1	0	1
<i>Bifidobacteriaceae</i>	1	1	0	0.38
<i>Clostridiaceae</i>	1	1	1	NA
<i>Coriobacteriaceae</i>	0	1	1	1
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0	1	0	0.7
<i>Enterobacteriaceae</i>	1	0	1	0.07
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0	1	0	1
<i>Family_XVIII_Incertae_Sedis</i>	0	1	0	0.665
<i>Flavobacteriaceae</i>	0	0	1	0.46
<i>Geobacteraceae</i>	0	0	1	0.48
<i>Lachnospiraceae</i>	0	1	0	0.675
<i>Lactobacillaceae</i>	1	0	0	0.015*
<i>Oxalobacteraceae</i>	0	0	1	0.19
<i>Paenibacillaceae</i>	1	0	0	0.33
<i>Prevotellaceae</i>	0	1	0	1
<i>Pseudomonadaceae</i>	0	1	0	1
<i>Ruminococcaceae</i>	0	1	1	1
<i>Sporolactobacillaceae</i>	1	0	0	0.025*
<i>Streptococcaceae</i>	0	1	0	1
<i>Symbiobacteriaceae</i>	0	0	1	0.51
<i>Thermoanaerobacteriaceae</i>	1	0	1	0.065
<i>Tissierellaceae</i>	0	1	1	0.82
<i>Veillonellaceae</i>	1	0	1	0.455

Inferencia y análisis de redes

Los atributos topológicos de ambas redes (Figuras 10 y 11) se muestran en la Tabla 7. En general, los resultados muestran que independientemente del número de nodos de cada red, estos se encuentran conectados de diferente forma en cada una. Específicamente, los nodos de la red de

digestión anaerobia tienen más conexiones entre sí que en la red de fermentación oscura (mayores conectancia, heterogeneidad, densidad, camino promedio y agrupamiento) y la red de hidrógeno es mucho más central que la de digestión anaerobia (0.937 contra 0.652). El análisis de modularidad (Figuras 12 y 13) revela que ambas redes se descomponen en 3 módulos (aunque el score de modularidad de la red de fermentación oscura es mayor). El análisis de robustez (Tabla 8) indica que la red de digestión anaerobia es más robusta que la red de hidrógeno tanto a la pérdida aleatoria de nodos como a pérdida de nodos importantes (en términos de su grado). Igualmente, la red de digestión anaerobia tuvo una menor vulnerabilidad promedio.

Ambas redes comparten 16 nodos y 10 co-ocurrencias (Figura 14). La distribución de grado (transformación logarítmica) de ambas redes fue ajustada a una ley de potencias obteniendo los siguientes parámetros: un coeficiente de correlación de Pearson de 0.973 y R^2 de 0.844 para la red de hidrógeno y una correlación de 0.873 y R^2 de 0.699 para la red de digestión anaerobia.

La longitud de camino promedio y el coeficiente de agrupamiento de las redes generadas usando el modelo de redes de mundo pequeño se presentan en la Tabla 9. Las redes inferidas tienen propiedades de mundo pequeño al tener una longitud de camino promedio bajo y un coeficiente de agrupamiento alto.

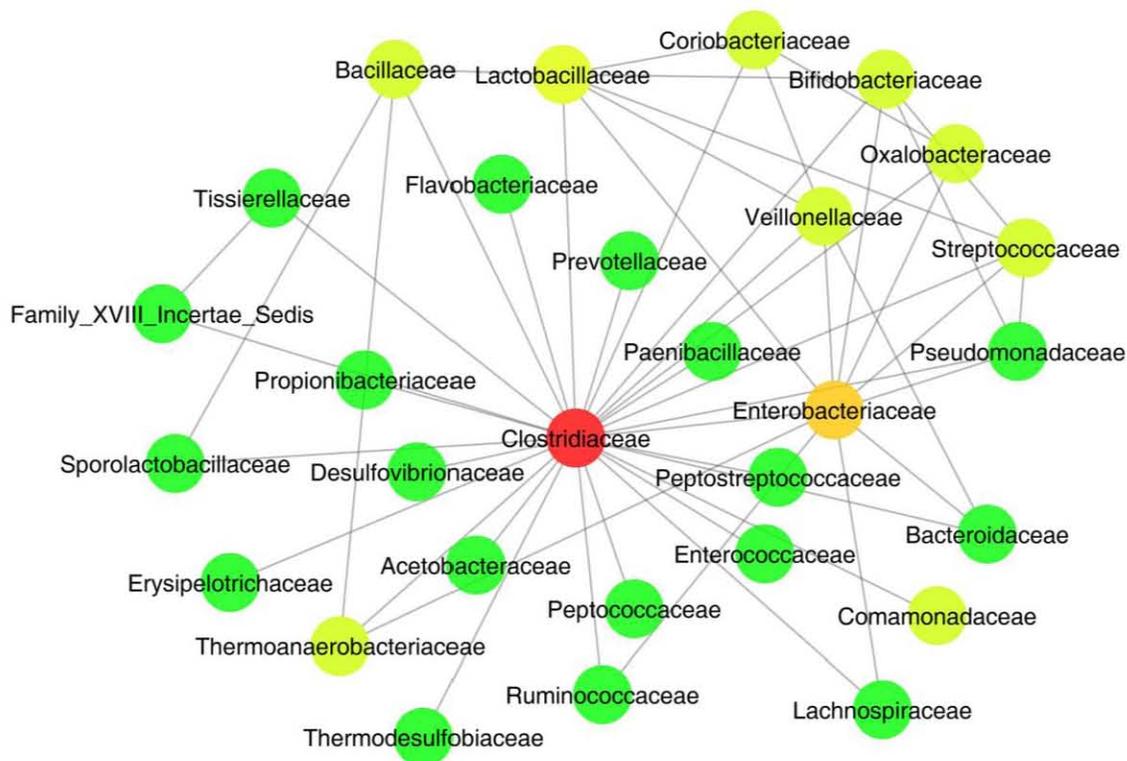


Figura 10. Red de co-ocurrencias de las comunidades hidrogenogénicas (red de fermentación oscura). El color de los nodos representa su intermediación; de menor (verde) a mayor valor (rojo). Datos de 103 experimentos.

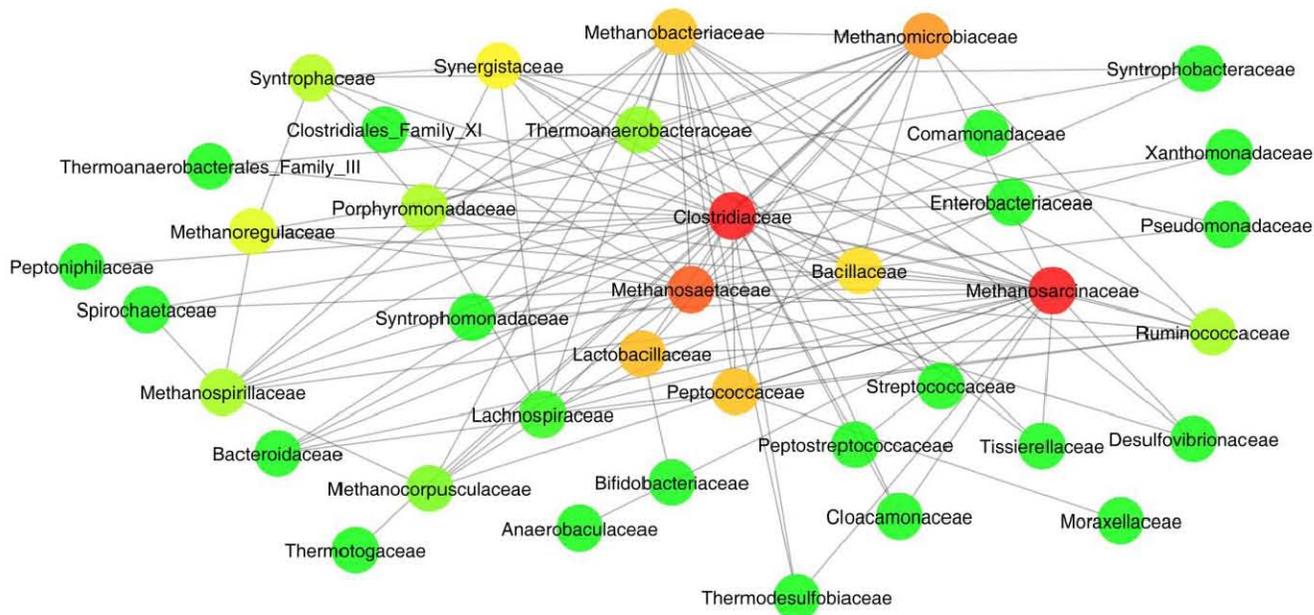


Figura 11. Red de co-ocurrencias de las comunidades metanogénicas (red de digestión anaerobia). El color de los nodos representa su intermediación; de menor (verde) a mayor valor (rojo). Datos de 122 experimentos.

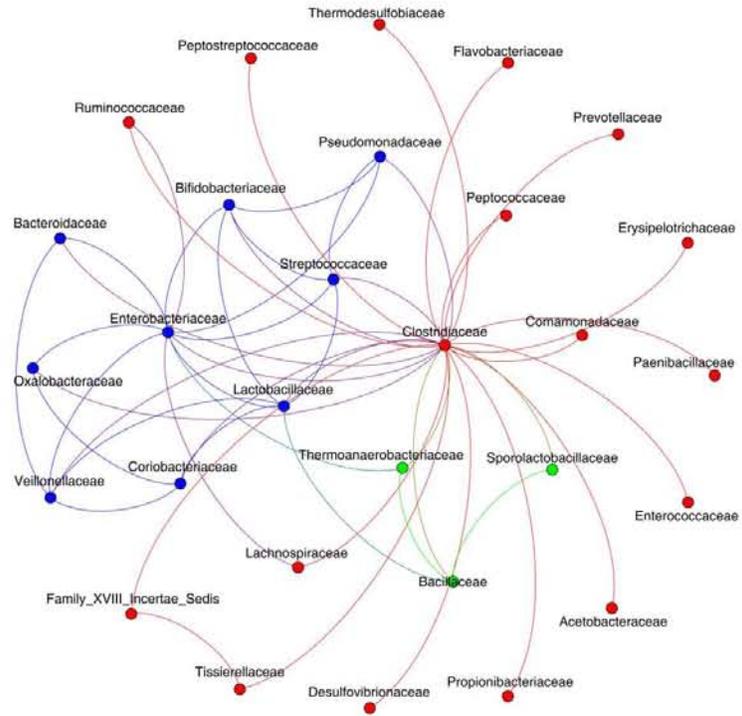


Figura 12. Análisis de modularidad de la red de co-ocurrencias de consorcios productores de hidrógeno. Datos de 103 experimentos. El color de los nodos indica su pertenencia a un módulo.

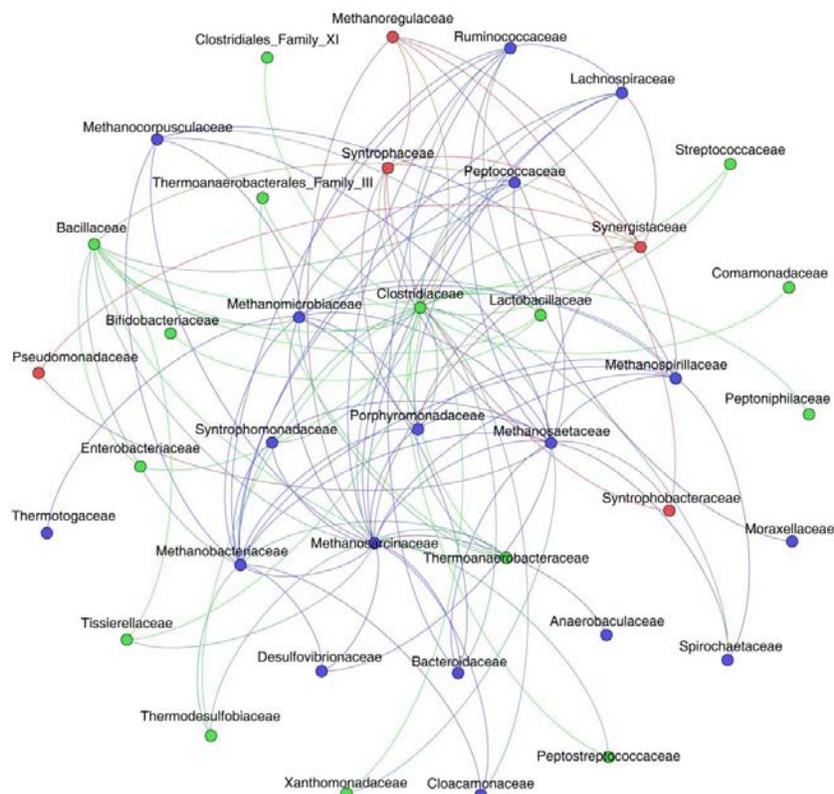


Figura 13. Análisis de modularidad de la red de co-ocurrencias de consorcios de digestión anaerobia. Datos de 122 experimentos. El color de los nodos indica su pertenencia a un módulo.

Tabla 7. Atributos topológicos de las redes inferidas.

Atributo	Red Fermentación Obscura	Red de digestión anaerobia
<i>Nodos vecinos promedio (grado promedio)</i>	3.586	6.158
<i>Centralización</i>	0.937	0.652
<i>Longitud de camino promedio</i>	1.872	2.037
<i>Densidad</i>	0.128	0.166
<i>Connectancia</i>	0.062	0.081
<i>Modularidad</i>	0.441 (3 módulos)	0.333 (3 módulos)
<i>Coficiente de agrupamiento</i>	0.445	0.609
<i>Heterogeneidad</i>	1.430	1.015
<i>Diámetro</i>	2	4
<i>Nodos</i>	29	38
<i>Nodos compartidos</i>		16
<i>Aristas</i>	52	117

Tabla 8. Análisis de robustez de ambas redes.

	Red Fermentación Obscura	Red de digestión anaerobia
Coefficiente de robustez (media; pérdida aleatoria de nodos; 10, 000x)	84.78% (MAD = 19.74)	89.47% (MAD = 6.98)
Coefficiente de robustez (pérdida dirigida de nodos; por grado)	19.62%	33.65%
Vulnerabilidad promedio	1.35×10^{-16}	1.92×10^{-17}

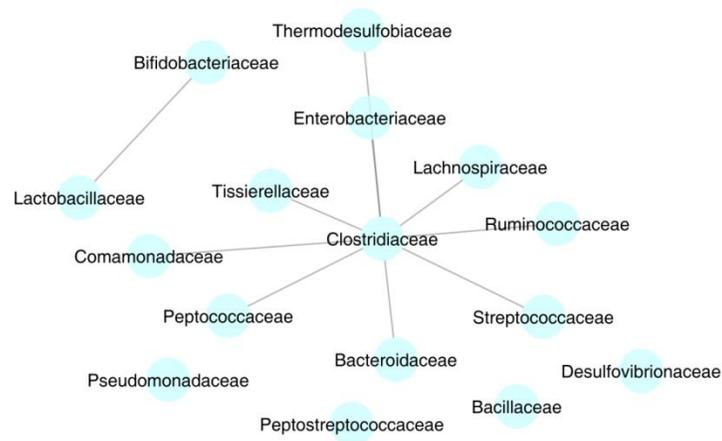


Figura 14. Intersección entre las redes de comunidades productoras de hidrógeno y de digestión anaerobia.

Tabla 9. Parámetros de las redes aleatorias y la red regular generadas por cada red inferida. El fondo obscuro muestra la similitud de características de mundo pequeño de acuerdo a Watts y Strogatz (1998).

Parámetro	Red regular	Red inferida	Red aleatoria (prom. x100)
<i>Longitud de camino promedio</i> (\approx red de hidrógeno)	3.86	1.872	2.39 (S.D. = 0.073)
<i>Coefficiente de agrupamiento</i> (\approx red de hidrógeno)	0.5	0.445	0.13 (S.D. = 0.043)
<i>Longitud de camino promedio</i> (\approx red de digestión anaerobia)	3.5	2.037	2.11 (S.D. = 0.024)
<i>Coefficiente de agrupamiento</i> (\approx red de digestión anaerobia)	0.6	0.609	0.162 (S.D. = 0.029)

Discusión

De acuerdo a los resultados, los objetivos planteados fueron cumplidos pues los análisis multivariados indican que algunas familias están tentativamente relacionadas con las variaciones en el rendimiento de hidrógeno y, en general, las diferencias en las características topológicas globales entre ambas redes indican que la red de las comunidades de digestión anaerobia tuvo características que indican que es más robusta que la red de los consorcios productores de hidrógeno. Además, el análisis de especies indicadoras confirmó algunas de las relaciones entre las familias presentes en los reactores y el rendimiento de hidrógeno. De entre todos los inóculos (digestores anaerobios, lodos activados, zonas inter-mareales, suelo, composta y aguas termales), el mayormente relacionado con el rendimiento de hidrógeno fue el de lodos activados, el cual, también estuvo relacionado positivamente con la riqueza. Finalmente, algunas de las familias (e.g. Oxalobacteraceae) que representaron nodos importantes en las redes también se relacionaron positivamente con el rendimiento de hidrógeno.

Análisis multivariados y estadísticos de la composición microbiana.

Los análisis de ordenación muestran relaciones interesantes entre las condiciones de cultivo y la composición microbiana tal como se predijo en la primera hipótesis. El análisis de componentes principales (Figura 7) sugiere que, aunque no hay una clara agrupación entre las diferentes muestras con respecto a las condiciones de cultivo, existe una relación positiva entre la riqueza y la temperatura con el rendimiento de hidrógeno en los biorreactores; además, estas variables explican la mayor parte de la varianza observada. La relación entre el rendimiento de hidrógeno y la riqueza puede deberse a que en un biorreactor con mayor cantidad de especies también puede aumentar el rango de sustratos que se pueden degradar lo que potencialmente aumentaría la producción de hidrógeno (Tracy *et al.*, 2012). Es importante destacar, que los reactores mantenidos a altas temperaturas (50 a 70°C) tendieron a tener un rendimiento de hidrógeno medio a alto (10 experimentos de 13; Medio: 1.19 - 2.12 mol H₂/ mol hexosa consumida; Alto: 2.2 - 3.2 mol H₂/ mol hexosa consumida).

Por otro lado, el análisis de correspondencias canónicas (Figura 8) sugiere una relación positiva entre algunas familias y el alto rendimiento de hidrógeno, aunque no fue posible establecer una relación estadística significativa (análisis de especies indicadoras; Tabla 6). Por una parte la familia mayormente asociada a alta temperatura (Thermoanaerobacteriaceae) muestra una ligera relación positiva con el rendimiento de hidrógeno, lo que concuerda con la literatura (Hung *et al.*, 2011; Rittmann y Herwig, 2012) pues son importantes productores de hidrógeno. También, existe evidencia de que Ruminococcaceae y Symbiobacteraceae (ambos comunes en el tracto digestivo de mamíferos; Huws *et al.*, 2011, Ueda *et al.*, 2001) tienen un papel importante en las comunidades anaerobias de donde provienen. Algunos miembros de Ruminococcaceae son productores de hidrógeno (Hung *et al.*, 2011) y las Symbiobacteraceae tienen una compleja relación simbiótica (que no está bien caracterizada) con algunas cepas del género *Bacillus* (Ueda y Beppu, 2007). Por otra parte, se sabe poco del papel de Tissierellaceae, Geobacteraceae y

Oxalobacteraceae en las comunidades anaeróbicas e hidrogenogénicas. Los miembros de la familia Tissierellaceae se encuentran frecuentemente en lodos anaerobios y se han asociado a la degradación de azúcares y betaína (Rodríguez *et al.*, 2012). Los miembros de la familia Geobacteraceae (e.g. *Geobacter sulfurreducens*) se encuentran naturalmente en ambientes anaerobios en suelo y acuáticos (Härtner *et al.*, 2005). Además son predominantes en celdas de combustible microbianas (Rittmann *et al.*, 2008) en las que son indispensables pues son microorganismos exo-electrogénicos que usan acetato o hidrógeno como donadores de electrones y óxido de hierro (Fe) o manganeso (Mn) como aceptores de electrones (Lovley, 2006). Algunos géneros de Oxalobacteraceae (e.g. *Janthinobacterium*) se asociaron a la producción de hidrógeno en gránulos (Ning *et al.*, 2013) y se ha reportado su actividad productora de hidrógeno (Akutsu *et al.*, 2008). Igualmente, los miembros de la familia Veillonellaceae se encontraron comúnmente en los experimentos de hidrógeno pero no ha sido posible establecer su papel en estas comunidades; esto ya había sido reportado antes para esta familia (Hung *et al.*, 2011).

Streptococcaceae, Bacillaceae y Pseudomonaceae estuvieron relacionadas negativamente al rendimiento de hidrógeno, especialmente Bacillaceae (quien también estuvo asociada significativamente a bajo rendimiento de hidrógeno en el análisis de especies indicadoras; p value= 0.015) lo cual es inesperado pues estas especies se asocian al mantenimiento de condiciones óptimas en los biorreactores (formando gránulos y manteniendo condiciones anaerobias) promoviendo el crecimiento de Clostridiaceae (Show *et al.*, 2012). Esto puede deberse a que bacterias no productoras de hidrógeno desplacen a las productoras de hidrógeno aprovechando estas condiciones óptimas. Las familias Streptococcaceae y Pseudomonadaceae están graficadas en el mismo punto indicando que tienden a coocurrir en los diferentes experimentos con diferentes condiciones de cultivo insinuando una importante interacción entre ellas. Los miembros de las familias Lactobacillaceae, y Sporolactobacillaceae están relacionados negativamente con el rendimiento de hidrógeno en el CCA y en el análisis de especies indicadoras (p-value: 0.015 y 0.025) posiblemente debido a que son productores de lactato y alcoholes (al igual que algunas

cepas de *Bacillus*; Sikora *et al.*, 2013) proceso por el que se reduce la producción de hidrógeno en los biorreactores (Show *et al.*, 2012). Además los miembros de Lactobacillaceae y Sporolactobacillaceae pueden producir bacteriocinas que, se ha comprobado, afectan el crecimiento de las bacterias de la familia Clostridiaceae (Hung *et al.*, 2011; Thuault *et al.*, 1991).

La familia Clostridiaceae no está asociada a ninguno de los ejes lo cual indicaría que estas especies pueden crecer a una gran variedad de condiciones ambientales, que no todos los miembros de este grupo producen hidrógeno, o bien, que no sólo *Clostridium* produce hidrógeno. Estos resultados podrían explicar los estudios que detectan altos rendimientos de hidrógeno incluso sin pretratamiento al inóculo que reduce la diversidad principalmente a miembros de la familia Clostridiaceae (e.g. Kim *et al.*, 2011b).

El análisis de correspondencias canónicas que incluye el origen del inóculo (Figura 9) indica que el tipo de inóculo con mayor diversidad en los biorreactores analizados fue el de lodo activados, lo que concuerda con la compleja y alta diversidad encontrada en estos hábitats (Zhang *et al.*, 2012) siendo más diversos que los lodos anaerobios (Baghchehsaraee *et al.*, 2010). Este tipo de inóculo al igual que el proveniente de composta, son los más relacionadas a alto rendimiento de hidrógeno. En el caso de los inóculos provenientes del rumen, estas comunidades han sido reportadas como altamente hidrolíticas y acidogénicas cuando degradan substratos lignocelulósicos (Yue *et al.*, 2013). Junto con bacterias provenientes del rumen, se incluyeron en la misma categoría comunidades provenientes de excrementos y composta, estas comunidades pueden mostrar una adaptación a degradar materia lignocelulósica lo que puede explicar su asociación positiva a la producción de hidrógeno (en los estudios analizados se usó principalmente celulosa y substratos complejos como derivados de plantas o desechos alimenticios).

Es importante notar que el número de estudios incluidos en este análisis (n=48) puede no ser representativo de todos los grupos taxonómicos presentes en las comunidades

hidrogenogénicas por lo que se deben tomar precauciones al momento de hacer mayores generalizaciones.

Análisis de redes

Al nivel de familia, la red de fermentación obscura (Figura 8) muestra una gran centralidad siendo Clostridiaceae el nodo más importante en la red (en términos de su intermediación). Otros nodos importantes en la red fueron Enterobacteraceae, Oxalobacteraceae, Streptococcaeae, Bacillaceae, Veillonaceae y Thermoanaerobacteriaceae; este último es espacialmente importante en los experimentos a altas temperaturas. En la red de digestión anaerobia el nodo más importante es Clostridiaceae y, adicionalmente, otros nodos con importante intermediación fueron Methanosarcinaceae, Methanomicrobiaceae, Methanosaetaceae, Lactobacillaceae, Peptococcaceae y Bacillaceae. Encontrar a Clostridiaceae como el nodo más central en ambas redes es una evidencia de que esta familia es muy importante en el flujo de energía en las comunidades anaerobias en general.

Los atributos topológicos de las dos redes (Tabla 4) son similares, al igual que su distribución de grado (que es acorde a lo reportado para la mayoría de las redes en la naturaleza con muchos nodos con un grado bajo y pocos nodos muy con un grado alto (Caretta Cartozo *et al.*, 2005). Ambas redes parecen presentar características de mundo pequeño pues al comparar ambas redes con modelos de redes aleatorias y regulares con el mismo número de nodos ambas presentan un coeficiente de agrupamiento alto y una longitud de camino promedio bajo (Watts y Strogatz, 1998).

El análisis de modularidad muestra que ambas redes se descomponen en igual número de módulos e incluso, la red de fermentación obscura tiene un *score* de modularidad más alto (i.e. los módulos están mejor definidos). En la red de fermentación obscura se aprecia un módulo donde el nodo central es Clostridiaceae e incluye varias familias con las que co-ocurre. El nodo de

Clostridiaceae está conectado por varias aristas a otro módulo que incluye, entre otras, a las familias Enterobacteraceae, Streptococcaceae, Pseudomonadaceae, Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae, Veillonellaceae y Oxalobacteraceae. De estas familias, las primeras 3 son conocidas por mantener condiciones óptimas en reactores anaerobios y de las últimas dos no se tiene mucha información (Oxalobacteraceae estuvo asociada a alto rendimiento en el CCA). Por su parte Lactobacillaceae, es una familia que degrada azúcares para producir ácido láctico y al ser anaerobia facultativa (Sikora *et al.*, 2013) puede ser más versátil en el ambiente en el cual se desarrolla creciendo incluso sin las familias que ayudan a mantener la anaerobiosis o aprovechando la producción de biofilms por parte de otras bacterias (caso parecido al de Bifidobacteriaceae; Sikora *et al.*, 2013). De forma similar, en la red de digestión anaerobia existe un módulo que también incluye a las familias Enterobacteriaceae, Streptococcaceae, Lactobacillaceae y Bifidobacteriaceae; aunque este módulo si incluye a Clostridiaceae. A diferencia del módulo de la red de hidrógeno, este incluye a otras dos familias que forman biopelículas: Peptostreptococaceae (Lesnik y Liu, 2014; Slobodkin, 2014) y Bacillaceae (Lemon *et al.*, 2008). Finalmente, esta red presenta un módulo que incluye a casi todas las arqueas metanógenas (excepto a Methanoregulaceae, que forma otro módulo con varias bacterias sintróficas). Esto concuerda con la separación de nicho y dependencia metabólica entre el grupo de las bacterias como Clostridiaceae y las arqueas (Stams y Plugge, 2009) y su convivencia en el mismo módulo está justificada por la diferencia de nicho entre arqueas metanógenas dada su versatilidad metabólica (Costa y Leigh, 2014).

La segunda hipótesis planteada es confirmada pues se encontraron diferencias globales en la forma en la que están conectados los nodos de ambas redes (independientemente de su número) que pueden indicar mayor robustez de la red de digestión anaerobia; esto fue confirmado por medio del análisis de robustez donde la red de digestión anaerobia tuvo un coeficiente de robustez mayor ante pérdidas dirigidas y aleatorias de nodos y una menor vulnerabilidad promedio. Por lo tanto, en las redes analizadas, la mayor conectividad general en la red de digestión anaerobia

concordó con un incremento en la robustez como se había supuesto antes (Dunne, 2005), lo que también concuerda con la hipótesis de que las comunidades más ricas tienen a ser más robustas en términos de resiliencia y resistencia (aunque la evidencia para esto en comunidades microbianas es mixta; Shade *et al.*, 2012). ; por ejemplo, debido a un incremento en redundancia funcional (Allison y Martiny, 2008). De igual forma, una mayor robustez puede indicar una menor posibilidad de invasión por especies externas (Pimm, 1991), aunque para esto último, alguna evidencia basada en simulaciones indica lo contrario (Baiser *et al.*, 2010; Heleno *et al.*, 2012; Lurgi *et al.*, 2014). Aun así, el hecho de que la red de fermentación oscura tenga nodos con menos conexiones entre sí podría ayudar a explicar la inestabilidad de los consorcios productores de hidrógeno en los biorreactores.

Aunque la conectancia de la red de digestión anaerobia es mayor, ambas tienen baja conectancia si se las compara con otras redes, incluso, de macroorganismos (Dunne *et al.*, 2002). Esto era esperado, pues las redes fueron inferidas, principalmente, a partir de datos de DGGEs y no de secuenciación masiva; además, los nodos fueron definidos a nivel de familia. Ambas condiciones reducen la diversidad recuperada y dificultan la detección de patrones de co-ocurrencia que pudieran aparecer a niveles taxonómicos inferiores.

La intersección de ambas redes (Figura 14) muestra 16 nodos y 10 co-ocurrencias compartidos que pueden indicar una interacción importante entre ellas. La presencia de Lactobacillaceae en ambas redes es de esperarse pues es una familia dominante en los inóculos y sustratos usados (i.e. lodos anaerobios, heces animales y residuos de comida). Es importante destacar la presencia de miembros de la familia Ruminococcaceae (géneros: *Ruminococcus*, *Ethanoligenens*) en ambas redes, lo que muestra la probable importancia de estas familias como productores de hidrógeno y degradadores de sustratos complejos como celulosa o xiloligosacáridos (Matulova *et al.*, 2008). Por otra parte, el hecho de que sólo 10 coocurrencias persistieran en la red de fermentación oscura podría indicar que la mayor parte de las

interacciones originales existentes en las comunidades de digestión anaerobia se pierde por los pretratamientos.

Las familias Veillonellaceae (géneros: *Veillonella*, *Dialister*, *Selenomonas*, *Megasphaera*, *Acidaminococcus*), Oxalobacteraceae (géneros: *Janthinobacterium*, *Cupriavidus*) y Ruminococcaceae, son relativamente importantes en la red de hidrógeno (de acuerdo a su grado: 5, 2 y 4 respectivamente, y su intermediación; el grado promedio excluyendo a Clostridiaceae es de 2.71/ contra 3.58 incluyendo a Clostridiaceae). Aunque estas familias se encuentran comúnmente en los experimentos de producción de hidrógeno, poco se sabe acerca de su rol ecológico en estas comunidades. Esto aunado a los resultados encontrados en los análisis multivariados hace relevante su posterior investigación.

Conclusiones y Perspectivas

De forma global, los análisis de redes muestran que las comunidades de digestión anaerobia son más diversas y que tienen propiedades sistémicas que pueden hacerlas más robustas en términos de estabilidad e invasión de especies externas, así como ante perturbaciones ambientales (e.g. cambios de pH o temperatura) a largo plazo en comparación con las comunidades hidrogenogénicas.

- Se encontró una relación positiva entre la riqueza y el alto rendimiento de hidrógeno. Aunque estos resultados deben tomarse con precaución debido a los sesgos metodológicos en la identificación de especies en los biorreactores (principalmente DGGEs).
- Las familias Symbiobacteraceae, Ruminococaceae, Tissierellaceae, Geobacteraceae y Oxalobacteraceae estuvieron asociadas con el alto rendimiento de hidrógeno. De estas, Oxalobacteraceae también representó un nodo importante en la red inferida. Se requiere más investigación para determinar el rol de estos grupos de bacterias en las comunidades hidrogenogénicas. También, permanece poco claro el papel de algunas familias

(Bacillaceae, Pseudomonadaceae y Streptococcaceae) típicamente asociadas al mantenimiento de condiciones óptimas en los biorreactores (e.g. condiciones anaerobias o retención de biomasa). Aparentemente, estas familias impactan positivamente, no solo a los productores de hidrógeno sino también a productores de alcoholes y lactato quienes aprovechan estas condiciones.

- Las familias Bacillaceae, Lactobacillaceae, y Sporolactobacillaceae fueron asociadas a bajo rendimiento de hidrógeno en el análisis de especies indicadoras.
- La red de digestión anaerobia tiene propiedades que sugieren que estas comunidades son más robustas que las de fermentación oscura (i.e. menor centralidad, mayor diámetro, densidad y conectancia), lo que fue confirmado por medio del análisis de robustez donde la red de digestión anaerobia tuvo un coeficiente de robustez mayor y una vulnerabilidad promedio menor.
- Se desarrolló una propuesta metodológica que permite resumir y analizar estadística y visualmente una gran cantidad de información acerca de comunidades ecológicas (tales como su composición y las variables ambientales).

Finalmente, es importante destacar que aunque se ha hecho un gran esfuerzo en la investigación de las comunidades microbianas productoras de hidrógeno, es evidente que se requiere obtener un conocimiento más profundo por medio de un enfoque diferente. Concretamente, debemos obtener información más detallada de qué bacterias están en los reactores y cuál es su abundancia. Para esto se debe considerar usar técnicas de secuenciación masiva. Es, igualmente importante, conocer la actividad que llevan a cabo los diferentes grupos dentro de los biorreactores usando análisis de expresión de genes y proteínas y de su actividad metabólica. Con esta información podemos descubrir patrones a una escala menor que nos permitan modelar matemáticamente estas comunidades, lo que es importante para predecir *in silico* el comportamiento de los biorreactores. También se obtendría información útil para la construcción de consorcios microbianos que mejoren la eficiencia y rentabilidad del proceso. Finalmente, es importante mencionar que para

lograr encontrar los patrones que relacionen los datos de las comunidades microbianas con el rendimiento de los biorreactores, es indispensable homologar los métodos y unidades con las que se miden los resultados en los experimentos.

Bibliografía General

Adewole, J.K., Ahmad, a. L., Ismail, S., and Leo, C.P. (2013). Current challenges in membrane separation of CO₂ from natural gas: A review. *Int. J. Greenh. Gas Control* 17, 46–65.

Aguirre-von-Wobeser, E., Soberón-Chávez, G., Eguiarte, L.E., Ponce-Soto, G.Y., Vázquez-Rosas-Landa, M., and Souza, V. (2014). Two-role model of an interaction network of free-living γ -proteobacteria from an oligotrophic environment. *Environ. Microbiol.* 16, 1366–1377.

Aiyuk, S., Forrez, I., Lieven, D.K., van Haandel, A., and Verstraete, W. (2006). Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates--a review. *Bioresour. Technol.* 97, 2225–2241.

Akutsu, Y., Li, Y., Tandukar, M., Kubota, K., and Harada, H. (2008). Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 6541–6548.

Allison, S., and Martiny, J. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (Suppl 1): 11512–11519.

Baghchehsaraee, B., Nakhla, G., Karamanev, D., and Margaritis, A. (2010). Fermentative hydrogen production by diverse microflora. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 5021–5027.

Baiser, B., Russell, G.J., and Lockwood, J.L. (2010). Connectance determines invasion success via trophic interactions in model food webs. *Oikos* 119, 1970–1976.

Barberán, A., Bates, S.T., Casamayor, E.O., and Fierer, N. (2012). Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. *ISME J.* 6, 343–351.

Bascompte, J., and Jordano, P. (2007). Plant-Animal Mutualistic Networks: The Architecture of Biodiversity. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 567–593.

Bastian, M., Heymann, S., and Jacomy, M. (2009). Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. *ICWSM* 361–362.

- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., and Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecol. Lett.* 365–377.
- Benson, D. a, Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., and Sayers, E.W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36–D42.
- Brusca, R.C., Wiens, J.F., Meyer, W.M., Eble, J., Franklin, K., Overpeck, J.T., and Moore, W. (2013). Dramatic response to climate change in the Southwest: Robert Whittaker’s 1963 Arizona Mountain plant transect revisited. *Ecol. Evol.* 3, 3307–3319.
- De Cáceres, M., and Legendre, P. (2009). Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology* 90, 3566–3574.
- Caporaso, J., Kuczynski, J., and Stombaugh, J. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Caretta Cartozo, C., Arlaschelli, D.G., and Caldarelli, G. (2005). Graph Theory and Food Webs. In *Ecological Networks: Linking Structure to Dynamics in Food Webs*, M. Pascual, and J. Dunne, eds. (Santa Fe Institute Studies on the Sciences of Complexity), pp. 93–118.
- Chandra, R., Takeuchi, H., and Hasegawa, T. (2012). Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 1462–1476.
- Chu, C.-F., Ebie, Y., Xu, K.-Q., Li, Y.-Y., and Inamori, Y. (2010). Characterization of microbial community in the two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 8253–8261.
- Clark, D. (1989). The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 63, 223–234.
- Clark, N.R., Dannenfelser, R., Tan, C.M., Komosinski, M.E., and Ma’ayan, A. (2012). Sets2Networks: network inference from repeated observations of sets. *BMC Syst. Biol.* 6, 89.
- Clarke, R., and James, H. (2015). A Third Act For Biofuels. Disponible en: <http://techcrunch.com/2015/02/13/a-third-act-for-biofuels/>. Consultado: Mayo, 2015.
- Comeau, Y. (2008). Microbial Metabolism. In *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*, M. Henze, M. van Loosdrecht, G. Ekama, and D. Brdjanovic, eds. (IWA Publishing), p. 528.

- Complexity Explorer Project (2013). “SmallWorldNetworks” model.
- Costa, K.C., and Leigh, J. a. (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* 29, 70–75.
- Costa, L.D.F., Rodrigues, F. a., Travieso, G., and Villas Boas, P.R. (2007). Characterization of complex networks: A survey of measurements. *Adv. Phys.* 56, 167–242.
- Das, L. (1996). On-board hydrogen storage systems for automotive application. *Int. J. Hydrogen Energy* 21, 789–800.
- Deng, Y., Jiang, Y.-H., Yang, Y., He, Z., Luo, F., and Zhou, J. (2012). Molecular ecological network analyses. *BMC Bioinformatics* 13, 113.
- Doi, T., Matsumoto, H., Abe, J., and Morita, S. (2010). Application of rice rhizosphere microflora for hydrogen production from apple pomace. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 7369–7376.
- Dong, J., and Horvath, S. (2007). Understanding network concepts in modules. *BMC Syst. Biol.* 1, 24.
- Dunne, J. (2005). The Network Structure of Food Webs. In *Ecological Networks: Linking Structure to Dynamics in Food Webs*, M. Pascual, and J. Dunne, eds. (Santa Fe Institute Studies on the Sciences of Complexity), pp. 27–92.
- Dunne, J., Williams, R.J., and Martinez, N.D. (2002). Food-web structure and network theory: The role of connectance and size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12917–12922.
- Faust, K., and Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 538–550.
- Faust, K., Sathirapongsasuti, J.F., Izard, J., Segata, N., Gevers, D., Raes, J., and Huttenhower, C. (2012). Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002606.
- Freilich, S., Kreimer, A., Meilijson, I., Gophna, U., Sharan, R., and Ruppin, E. (2010). The large-scale organization of the bacterial network of ecological co-occurrence interactions. *Nucleic Acids Res.* 38, 3857–3868.
- Gerardi, M. (2003). *The microbiology of anaerobic digesters* (John Wiley & Sons). p36.

Grewell, B.J. (2008). Parasite facilitates plant species coexistence in a coastal wetland. *Ecology* 89, 1481–1488.

Groenestijn, J. Van (2002). Energy aspects of biological hydrogen production in high rate bioreactors operated in the thermophilic temperature range. *Int. J. Hydrogen Energy* 27, 1141–1147.

Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., and Steyer, J.-P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy* 35, 10660–10673.

Hagberg, A. a, Schult, D. a, and Swart, P.J. (2008). Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX. *Network* 836, 11–15.

Härtner, T., Straub, K.L., and Kannenberg, E. (2005). Occurrence of hopanoid lipids in anaerobic *Geobacter* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 59–64.

Hawkes, F., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., and Hawkes, D. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int. J. Hydrogen Energy* 32, 172–184.

Heleno, R., Devoto, M., and Pocock, M. (2012). Connectance of species interaction networks and conservation value: Is it any good to be well connected? *Ecol. Indic.* 14, 7–10.

Holm-Nielsen, J.B., Al Seadi, T., and Oleskowicz-Popiel, P. (2009). The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresour. Technol.* 100, 5478–5484.

Hung, C.-H., Chang, Y.-T., and Chang, Y.-J. (2011). Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems--a review. *Bioresour. Technol.* 102, 8437–8444.

Huws, S. a, Kim, E.J., Lee, M.R.F., Scott, M.B., Tweed, J.K.S., Pinloche, E., Wallace, R.J., and Scollan, N.D. (2011). As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae* incertae sedis and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. *Environ. Microbiol.* 13, 1500–1512.

IEA (2011). *World Energy Outlook 2011* (Paris: IEA).

IEA (2012). *Key World Energy Statistics*. 80.

Jo, J.H., Jeon, C.O., Lee, D.S., and Park, J.M. (2007). Process stability and microbial community structure in anaerobic hydrogen-producing microflora from food waste containing kimchi. *J. Biotechnol.* *131*, 300–308.

Kannaiah Goud, R., and Venkata Mohan, S. (2012). Regulating biohydrogen production from wastewater by applying organic load-shock: Change in the microbial community structure and bio-electrochemical behavior over long-term operation. *Int. J. Hydrogen Energy* *37*, 17763–17777.

Kasthurirathna, D. (2013). On the influence of topological characteristics on robustness of complex networks. *J. Artif. Intell. Soft Comput. Res.* *3*, 89–100.

Kim, D.-H., Kim, S.-H., Jung, K.-W., Kim, M.-S., and Shin, H.-S. (2011a). Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste. *Bioresour. Technol.* *102*, 8646–8652.

Kim, D.-H., Wu, J., Jeong, K.-W., Kim, M.-S., and Shin, H.-S. (2011b). Natural inducement of hydrogen from food waste by temperature control. *Int. J. Hydrogen Energy* *36*, 10666–10673.

Koskinen, P., Kaksonen, A., and Puhakka, J. (2007). The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised bed bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* *97*, 742–758.

Kotay, S.M., and Das, D. (2009). Novel dark fermentation involving bioaugmentation with constructed bacterial consortium for enhanced biohydrogen production from pretreated sewage sludge. *Int. J. Hydrogen Energy* *34*, 7489–7496.

Lemon, K., Earl, A.M., Vlamakis, H.C., Aguilar, C., and Kolter, R. (2008). Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. In *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–16.

Lesnik, K.L., and Liu, H. (2014). Establishing a core microbiome in acetate-fed microbial fuel cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 4187–4196.

Lovley, D.R. (2006). Microbial Energizers: Fuel Cells That Keep on Going. *Microbe* *1*, 323–329.

Lurgi, M., Galiana, N., López, B.C., Joppa, L.N., and Montoya, J.M. (2014). Network complexity and species traits mediate the effects of biological invasions on dynamic food webs. *Front. Ecol. Evol.* *2*, 1–11.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., and Clark, D. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (San Francisco: Benjamin Cummings).

- Mäkinen, A.E., Nissilä, M.E., and Puhakka, J. a. (2012). Dark fermentative hydrogen production from xylose by a hot spring enrichment culture. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 12234–12240.
- Matulova, M., Nouaille, R., Capek, P., Péan, M., Delort, A.M., and Forano, E. (2008). NMR study of cellulose and wheat straw degradation by *Ruminococcus albus* 20. *FEBS J.* 275, 3503–3511.
- McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., and Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 6, 610–618.
- Mela, G., and Canali, G. (2014). How distorting policies can affect energy efficiency and sustainability: The case of biogas production in the Po Valley (Italy). Disponible en: <http://www.agbioforum.org/v16n3/v16n3a03-mela.htm>. Consultado: Mayo, 2015.
- Merlino, G., Rizzi, A., Schievano, A., Tenca, A., Scaglia, B., Oberti, R., Adani, F., and Daffonchio, D. (2013). Microbial community structure and dynamics in two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion of mixed swine slurry and market bio-waste. *Water Res.* 47, 1983–1995.
- Momirlan, M., and Veziroglu, T. (2005). The properties of hydrogen as fuel tomorrow in sustainable energy system for a cleaner planet. *Int. J. Hydrogen Energy* 30, 795–802.
- Müller, V. (2003). Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69.
- Naylor, R.L., Liska, A.J., Burke, M.B., Falcon, W.P., Gaskell, C., Rozelle, S.D., and Cassman, K.G. (2007). Environment : Science and Policy for The Ripple Effect: Biofuels ,Food Security, and the Environment. *Environment* 49, 30–43.
- Newman, M. (2003). The structure and function of complex networks. *SIAM Rev.* 45, 167–256.
- Ning, Y.-Y., Wang, S.-F., Jin, D.-W., Harada, H., and Shi, X.-Y. (2013). Formation of hydrogen-producing granules and microbial community analysis in a UASB reactor. *Renew. Energy* 53, 12–17.
- Nissilä, M.E., Tähti, H.P., Rintala, J. a., and Puhakka, J. a. (2011). Thermophilic hydrogen production from cellulose with rumen fluid enrichment cultures: Effects of different heat treatments. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 1482–1490.
- Novak, T., Thirion, C., and Janžekovič, F. (2010). Hypogean ecophase of three hymenopteran species in Central European caves. *Ital. J. Zool.* 77, 469–475.

Oksanen, J., Blanchet, G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H., et al. (2013). *vegan: Community Ecology Package*.

Pimm, S. (1991). *The Balance of Nature?: Ecological Issues in the Conservation of Species and Communities* (University of Chicago Press).

Piraveenan, M., Uddin, S., and Chung, K.S.K. (2012). Measuring topological robustness of networks under sustained targeted attacks. *Proc. 2012 IEEE/ACM Int. Conf. Adv. Soc. Networks Anal. Mining, ASONAM 2012* 38–45.

Porretto, J. (2009). Exxon makes first big investment in biofuels. Disponible en: <http://abcnews.go.com/Business/story?id=8083709>. Consultado: Mayo, 2015.

Potters, G., Van Goethem, D., and Schutte, F. (2010). Promising Biofuel Resources: Lignocellulose and Algae. *Nature Education*. 3(9):14. Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/promising-biofuel-resources-lignocellulose-and-algae-14255919>. Consultado: Mayo, 2015.

Poulsen, M., Schwab, C., Jensen, B.B., Engberg, R.M., Spang, A., Canibe, N., Højberg, O., Milinovich, G., Fragner, L., Schleper, C., et al. (2013). Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat. Commun.* 4, 1428.

Prasertsan, P., O-Thong, S., and Birkeland, N.-K. (2009). Optimization and microbial community analysis for production of biohydrogen from palm oil mill effluent by thermophilic fermentative process. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 7448–7459.

Proulx, S.R., Promislow, D.E.L., and Phillips, P.C. (2005). Network thinking in ecology and evolution. *Trends Ecol. Evol.* 20, 345–353.

R Core Team (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.

Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 142–160.

Rittmann, S., and Herwig, C. (2012). A comprehensive and quantitative review of dark fermentative biohydrogen production. *Microb. Cell Fact.* 11, 115.

Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R., and Halden, R.U. (2008). Pre-genomic, genomic and post-genomic study of microbial communities involved in bioenergy. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 604–612.

- Rodríguez, E., Lopes, A., Fdz-Polanco, M., Stams, A.J.M., and García-Encina, P. a (2012). Molecular analysis of the biomass of a fluidized bed reactor treating synthetic vinasse at anaerobic and micro-aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2181–2191.
- Roy, S., Ghosh, S., and Das, D. (2012). Improvement of hydrogen production with thermophilic mixed culture from rice spent wash of distillery industry. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15867–15874.
- Salvi, B.L., Subramanian, K. a., and Panwar, N.L. (2013). Alternative fuels for transportation vehicles: A technical review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 25, 404–419.
- 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., et al. (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front. Microbiol.* 3, 417.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504.
- Show, K.Y., Lee, D.J., Tay, J.H., Lin, C.Y., and Chang, J.S. (2012). Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *Int. J. Hydrogen Energy* 37, 15616–15631.
- Sikora, A., Błaszczuk, M., Jurkowski, M., and Zielenkiewicz, U. (2013). Lactic Acid Bacteria in Hydrogen-Producing Consortia: On Purpose or by Coincidence? In *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, M. Kongo, ed. (InTech),.
- Slobodkin, A. (2014). The Family Peptostreptococcaceae. In *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 291–302.
- Stams, A.J.M., and Plugge, C.M. (2009). Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 568–577.
- Thuault, D., Beliard, E., Le Guern, J., and Bourgeois, C.M. (1991). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 74, 1145–1150.
- Tracy, B.P., Jones, S.W., Fast, A.G., Indurthi, D.C., and Papoutsakis, E.T. (2012). Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 364–381.

Ueda, K., and Beppu, T. (2007). Lessons from studies of *Symbiobacterium thermophilum*, a unique syntrophic bacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1115–1121.

Ueda, K., Ohno, M., Yamamoto, K., Nara, H., Mori, Y., Shimada, M., Hayashi, M., Oida, H., Terashima, Y., Nagata, M., et al. (2001). Distribution and Diversity of Symbiotic Thermophiles, *Symbiobacterium thermophilum* and Related Bacteria, in Natural Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3779–3784.

Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2001). Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 555–562.

Valdez-Vazquez, I., and Poggi-Varaldo, H.M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 1000–1013.

Vavilin, V. a, Fernandez, B., Palatsi, J., and Flotats, X. (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview. *Waste Manag.* 28, 939–951.

Wade, L. (2004). *Química Orgánica* (Madrid: Pearson Educación).

Walspurger, S., Haije, W.G., and Louis, B. (2014). CO₂ Reduction to Substitute Natural Gas: Toward a Global Low Carbon Energy System. *Isr. J. Chem.* 54, 1432–1442.

Wang, Z., and Zhang, J. (2007). In search of the biological significance of modular structures in protein networks. *PLoS Comput. Biol.* 3, 1011–1021.

Watts, D., and Strogatz, S. (1998). Collective dynamics of “small-world” networks. *Nature* 393, 440–442.

Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 849–860.

Yue, Z.-B., Li, W.-W., and Yu, H.-Q. (2013). Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 128, 738–744.

Zhang, T., Shao, M.-F., and Ye, L. (2012). 454 Pyrosequencing Reveals Bacterial Diversity of Activated Sludge From 14 Sewage Treatment Plants. *ISME J.* 6, 1137–1147.

Anexos

Todos los anexos pueden consultarse en la siguiente dirección electrónica:

<https://www.dropbox.com/sh/ftdfnx6bagghdt5/AChZPNn9yLfekeX7Lv2aznia?dl=0>