



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

VICERRECTORÍA EJECUTIVA

SISTEMA UNIVERSITARIO DE BIBLIOTECAS

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS EXACTAS E INGENIERÍAS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS



**Evaluación del efecto de acetato de etanolamina en las comunidades
microbianas metanogénicas presentes en biorreactores alimentados
con diferentes sustratos**

TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA

IBT. Jhovana Lizeth Lozano López

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS**

DIRECTOR

Dr. Raúl Snell Castro

CO-DIRECTOR

Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta

ASESOR

Dr. José Antonio Pérez Pimienta

Guadalajara, Jalisco. Diciembre del 2023



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS EXACTAS E INGENIERÍAS
SECRETARÍA ACADÉMICA
COORDINACIÓN DE PROGRAMAS DOCENTES

CUCEI/CPDOC/1090/2022

IBT. Jhovana Lizeth Lozano López
Presente

Por medio de la presente me permito comunicarle que fue aceptado por la Junta Académica correspondiente, el tema de tesis solicitado a esta Coordinación el día 8 de julio de 2022, bajo el título:

“Evaluación del efecto de acetato de etanolamina en las comunidades microbianas metanogénicas presentes en biorreactores alimentados con diferentes sustratos”

mismo que usted desarrollará, con objeto de dar lugar a los trámites conducentes a la obtención de grado de:

Maestro en Ciencias en Procesos Biotecnológicos

Así mismo le comunico que para el desarrollo de la citada tesis le ha sido designado como **Director** al **Dr. Raúl Snell Castro**, como **Co-Director** al **Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta** y como **Asesor** al **Dr. José Antonio Pérez Pimienta**.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“Piensa y Trabaja”

“2022, Guadalajara, hogar de la Feria Internacional del Libro y Capital Mundial del Libro”

Guadalajara, Jal., 8 de julio de 2022 DE


COORDINACIÓN
DE PROGRAMAS

Dra. Sabrina Lizbeth Vega Maldonado
Coordinadora de Programas Docentes



Registro 085/2022

SLVM/sijo

Dra. María Teresa Romero Gutiérrez
Jefa de la Unida de Posgrados
CUCEI
P r e s e n t e


Por este conducto, hacemos de su conocimiento que la tesis de Maestría en Ciencias en Procesos Biotecnológicos presentada por la alumna IBT. Jhovana Lizeth Lozano López, titulada: "Evaluación del efecto de acetato de etanolamina en las comunidades microbianas metanogénicas presentes en biorreactores alimentados con diferentes sustratos", ha sido revisada y ACEPTADA para su impresión por los siguientes Lectores.

22 de noviembre de 2023




Dr. Raúl Snell Castro

Director de Tesis



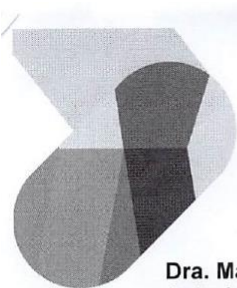
Dra. Alma Lilia Toledo Cervantes

Lectora Revisora



Dra. Liliana Martínez Chávez

Lector Revisor



UNIVERSIDAD DE
GUADALAJARA

Red Universitaria e Instituto Benemérito de Jalisco

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
EXACTAS E INGENIERÍAS**

Secretaría Académica

Coordinación de la Maestría en Ciencias en Procesos
Biotecnológicos

CUCEI/MCPB/079/2023

Dra. María Teresa Romero Gutierrez
Jefa de la Unidad de Posgrados
CUCEI
Presente.-

Por este medio nos permitimos hacer de su conocimiento, que el trabajo de tesis presentado por el IBT. **Jhovana Lizeth Lozano López** para optar al grado de Maestro en Ciencias en Procesos Biotecnológicos con el tema:

"Evaluación del efecto de acetato de etanolamina en las comunidades microbianas metanogénicas presentes en biorreactores alimentados con diferentes sustratos"

ha sido revisado por los lectores asignados por la Junta Académica de este posgrado para tal fin y habiendo sido reportado que **SI CUMPLE** con el nivel metodológico exigido en su realización, esta Junta Académica autoriza su presentación.

La publicación final se deberá de entregar a esta coordinación para poder realizar su examen de grado.

Sin otro particular por el momento, nos despedimos con un cordial saludo.

Atentamente

"Piensa y Trabaja"

"2023, Año del fomento a la formación integral con una
Red de Centros y Sistemas Multitemáticos"

Guadalajara, Jalisco, 27 de noviembre de 2023




UNIVERSIDAD DE
GUADALAJARA

Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta
Coordinador de la Maestría en
Ciencias en Procesos Biotecnológicos

Centro Universitario de Ciencias
Exactas e Ingenierías
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS


Dra. Alma Lilia Toledo Cervantes


Dra. Angelina Martín del Campo Campos


Dr. José Roberto Ramos Ibarra

HOMA/mcsa

Dedicatoria

A mi mamá Luisa y a mi papá Salvador, por siempre apoyarme en todo momento, cuidarme y motivarme a salir adelante. Por ser mi pilar.

A mi hermano Leonel, por estar siempre a mi lado y apoyarme todo el tiempo.

Agradecimientos

A mi mamá, papá y hermano por su apoyo incondicional a lo largo de todo mi posgrado.

Al Dr. Raúl Snell Castro por su dirección y apoyo a lo largo de todo el proceso del proyecto, en la realización de los protocolos de molecular, por permitirme crecer académica y profesionalmente y ofrecerme todas las herramientas para que este trabajo pudiera realizarse.

Al Dr. José Antonio Pérez Pimienta por sus atenciones y disponibilidad durante la estancia realizada en la UAN, además del apoyo otorgado a lo largo del proyecto.

A la Dr. Alma Toledo Cervantes por su completo apoyo, tiempo y consejos en la fase experimental del trabajo.

Al Dr. Hugo Oscar Méndez Acosta por sus retroalimentaciones del proyecto para poder mejorar.

A Alejandro por su apoyo y consejos durante el proyecto tanto en la fase experimental como en la redacción.

A Juan por siempre hacerme segundas en mis comentarios en el laboratorio.

A Damián Castillo por seguir ayudándome con mis dudas del proceso, equipos y técnicas aun después de haber terminado su posgrado y siempre hacerlo de la mejor manera.

A mis compañeros del laboratorio de Procesos Biotecnológicos Luis, por su apoyo en el uso de equipos, Claudio, Kenia y Diego.

A CONAHCYT-PNPC por la beca otorgada para la realización de este trabajo de tesis (No. Becario: 943596).

Índice de contenido

Índice de figuras	x
Índice de tablas.....	xi
Índice de anexos.....	xiii
Resumen	1
Abstract	3
Justificación	6
Objetivos.....	7
Hipótesis.....	8
1. Marco teórico y antecedentes	9
1.1 Industria tequilera	9
1.1.1 Generación del bagazo de agave.....	10
1.1.2 Composición del bagazo de agave.....	10
1.1.2 Valorización del bagazo de agave.....	12
1.2 Pretratamiento para la biomasa lignocelulósica	12
1.2.1 Pretratamientos físicos	13
1.2.2 Pretratamientos fisicoquímicos.....	14
1.2.3 Pretratamientos biológicos	15
1.2.4 Pretratamiento químico	16
1.3 Líquidos iónicos	20
1.3.1 Toxicidad.....	23
1.3.2 Acetato de etanolamina.....	24
1.4 Hidrólisis enzimática	25
1.5 Digestión anaerobia para la revalorización de residuos tequileros	26
1.5.1 Sintrofía.....	28
1.5.2 Inhibición del proceso.....	30
1.6 Dinámicas de poblaciones microbianas	31
1.7 Técnicas biológico-molecular para caracterizar comunidades microbianas	36
1.7.1 Secuenciación genética masiva	37
2. Metodología	38
2.1 Estrategia experimental	38
2.2 Prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano	39
2.3 Pruebas de potencial bioquímico de metano.....	39

2.3.1 Optimización de la concentración del sustrato modelo (glucosa) y [EAO][OAc] para maximizar la producción de metano	41
2.3.1.1 Síntesis y caracterización del [EAO][OAc].....	41
2.3.2 Obtención de hidrolizados enzimáticos reales de BATA pretratado con [EAO][OAc]	42
2.3.2.1 Pretratamiento del BATA con [EOA][OAc]	42
2.3.2.2 Sacarificación enzimática.....	42
2.3.2.3 Diseño de hidrolizados sintéticos de BATA	42
2.3.3 Pruebas de potencial bioquímico de metano con valores óptimos utilizando hidrolizados enzimáticos reales de BATA pretratado con [EOA][OAc].....	43
2.3.3.1 Pruebas de potencial bioquímico de metano con valores óptimos utilizando hidrolizados de BATA sintéticos y [EOA][OAc].....	43
2.4 Métodos analíticos	44
2.5 Análisis de la comunidad microbiana	44
2.5.1 Conservación de biomasa microbiana.....	44
2.5.2 Extracción de ADN genómico.....	45
2.5.3 Extracción de ARN ribosomal.....	45
2.5.4 Degradación del ADN contaminante.....	46
2.5.5 Síntesis de ADN complementario	47
2.5.6 Secuenciación genética masiva	47
2.5.7 Análisis filogenético	48
2.5.8 Análisis de componentes principales.....	48
3. Resultados y discusión	49
3.1 Prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano	49
3.1.1 Desempeño de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano	49
3.1.2 Estudio de la comunidad microbiana de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano	50
3.1.2.1 Corroboración de extracción de ADN y ARN.....	50
3.1.2.2 Diversidad microbiana de los dominios <i>Archaea</i> y <i>Bacteria</i>	53
3.1.2.3 Dinámica poblacional de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.....	55
3.1.2.4 Análisis de componentes principales de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano	58
3.2 Pruebas de potencial de metano con glucosa (sustrato modelo) y [EAO][OAc]	60
3.3 Optimización de la producción de metano con glucosa (sustrato modelo) y [EAO][OAc]	62

3.3.1 Parámetros fisicoquímicos de la producción de metano con glucosa y [EAO][OAc]	64
3.4 Efecto del pretratamiento de BATA con [EAO][OAc]	68
3.5 Caracterización de los hidrolizados enzimáticos de BATA	68
3.6 Pruebas de potencial bioquímico de metano con valores óptimos con diferentes sustratos	69
3.6.1 Desempeño de las condiciones óptimas con los diferentes sustratos	69
3.7 Estudio de la comunidad microbiana en las pruebas de potencial bioquímico de metano en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.	75
3.7.1 Corroboración de extracción de ADN y ARN	75
3.7.2 Diversidad microbiana de los dominios Archaea y Bacteria	77
3.7.3 Dinámica poblacional de las pruebas en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.	79
3.7.4 Análisis de componentes principales de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.	82
4. Conclusiones y perspectivas	86
4.1 Conclusiones	86
Bibliografía	89
Anexos	99
Anexo A Preparación buffer de citratos	99
Anexo B Colecta y conservación de biomasa microbiana destinadas a la extracción de ácidos nucleicos	99
Anexo C Protocolo para la extracción y purificación de ADN	100
Anexo D Protocolo para la extracción y purificación de ARN ribosomal	102
Anexo E Electroforesis para la visualización de ARN	104
Anexo F Protocolo para la degradación de ADN contaminante	105
Anexo G Protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	106
Anexo H Protocolo para la síntesis de ADN complementario	107
Anexo I Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio <i>Archaea</i> de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.	109
Anexo J Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio <i>Bacteria</i> de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.	110
Anexo K Árbol filogenético del dominio <i>Archaea</i> y <i>Bacteria</i> de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.	112

Anexo L Abundancia relativa de poblaciones bacterianas y arqueas dominantes y sus características biológicas de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.	117
Anexo M Peso de los componentes de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.....	124
Anexo N Pruebas de espectroscopía infrarroja para el seguimiento del [EAO][OAc] durante la digestión anaerobia.....	124
Anexo O Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio <i>Archaea</i> de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano	127
Anexo P Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio <i>Bacteria</i> de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.....	128
Anexo Q Árbol filogenético del dominio <i>Archaea</i> y <i>Bacteria</i> de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.	130
Anexo R Abundancia relativa de poblaciones bacterianas y arqueas dominantes y sus características biológicas de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano	134
Anexo S Peso de los componentes de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano	139

Índice de figuras

Figura 1. Composición de la biomasa lignocelulósica	11
Figura 2. Efecto del pretratamiento en la biomasa lignocelulósica	13
Figura 3. Cationes y aniones comunes en los líquidos iónicos.....	20
Figura 4. Disolución de celulosa con LI.....	21
Figura 5. Representación de las rutas metabólicas de la digestión anaerobia.....	26
Figura 6. Estrategia experimental desarrollada para la evaluación del efecto del [EAO][OAc] sobre la digestión anaerobia.....	39
Figura 7. Visualización del ADN extraído de las muestras B:LI-D, A:LI-D y H1-D en un gel de agarosa al 0.7 %.....	51
Figura 8. Gel de calidad de la extracción de ARN ribosomal de las muestras B:LI-R, A:LI-R y H1-R en un gel de agarosa al 1.5 % con 1.5 % de cloro comercial.....	51
Figura 9. Imagen de los geles de verificación de la síntesis de ADNc ensamblados para visualizar los productos de la PCR aplicada al ADNc de las muestras B:LI-R, A:LI-R y H1-R en un gel de agarosa al 1.5 %.....	52
Figura 10. Abundancia relativa (%) de las poblaciones dominantes del dominio <i>Archaea</i> de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.	56
Figura 11. Abundancia relativa (%) de las poblaciones dominantes del dominio <i>Bacteria</i> de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano	58
Figura 12. Correlaciones de las variables obtenidas mediante el ACP a partir de los valores de las variables biológicas y fisicoquímicas durante la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.....	60
Figura 13. Gráfica de efectos principales para la producción de metano en el diseño de composición central.....	63
Figura 14. Superficie de respuesta estimada para la producción de metano.....	64
Figura 15. Cinética de la producción de metano a partir de glucosa (sustrato modelo) y [EOA][OAc].	65
Figura 16. Cinética de la producción de metano a partir de los puntos óptimos con diferentes sustratos.....	73
Figura 17. Visualización del ADN extraído de las muestras B36-D, B42-D, B48-D y B41-D en un gel de agarosa al 0.7 %.	76
Figura 18. Gel de calidad de la extracción de ARN ribosomal de las muestras Glu-R, HE-R y HES-R. M- Fago Lambda ADN/HindIII.....	77
Figura 19. Abundancia relativa (%) de las poblaciones dominantes del dominio <i>Archaea</i> de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.....	80
Figura 20. Abundancia relativa (%) de las poblaciones dominantes del dominio <i>Bacteria</i> de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.....	81
Figura 21. Correlaciones de las variables obtenidas mediante el ACP a partir de los valores de las variables biológicas y fisicoquímicas con base a la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano	84

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del bagazo de Agave tequilana var. azul (BATA) en porcentaje del peso seco.....	10
Tabla 2. Diferentes pretratamientos realizados para el BATA destinado a hidrólisis enzimática.	18
Tabla 3. Estudios para diversos materiales lignocelulósicos para el pretratamiento LI.	22
Tabla 4. Degradación de materia orgánica por asociaciones sintróficas.....	29
Tabla 5. Dinámica de poblaciones microbianas en diferentes procesos mesofílicos de digestión anaerobia, usando como sustratos residuos de la industria tequilera para la producción de metano	32
Tabla 6. Composición del medio mineral utilizado para las pruebas de potencial bioquímico de metano	40
Tabla 7. Condiciones de operación de las pruebas de potencial bioquímico de metano.....	40
Tabla 8. Valores codificados de los factores para el diseño de composición central.....	41
Tabla 9. Claves asignadas al ADN genómico y ARN ribosomal extraídos de las muestras recolectadas para el análisis de las comunidades microbianas de la prueba preliminar del efecto del [EAO][OAc].	49
Tabla 10. Resultados fisicoquímicos de las condiciones B:LI y A:LI durante el proceso de digestión anaerobia para la producción de metano.	50
Tabla 11. Concentración y pureza del ADN extraído de las muestras B:LI-D, A:LI-D y H1-D ...	51
Tabla 12. Concentración y pureza del ADNc de las muestras B:LI-R, A:LI-R y H1-R	52
Tabla 13. Resumen de datos de la secuenciación genética masiva y análisis filogenético para dominios de <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i> de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.	54
Tabla 14. Resultados del diseño 2^K con puntos centrales para la evaluación del efecto del [EAO][OAc] en la producción de metano.....	61
Tabla 15. ANOVA del diseño 2^K con puntos centrales para la evaluación del efecto de [EAO][OAc] en la producción de metano.....	61
Tabla 16. Resultados del diseño de composición central para la optimización de la producción de metano con glucosa (sustrato modelo) y [EAO][OAc]	62
Tabla 17. ANOVA del diseño central compuesto para optimización de la producción de metano con glucosa (sustrato modelo) y [EAO][OAc].	63
Tabla 18. Parámetros de rendimiento de la prueba de potencial de metano con sustrato modelo (glucosa) y [EAO][OAc].	64
Tabla 19. Valores iniciales y finales para los ácidos grasos volátiles y pH en el diseño central compuesto para la optimización de la producción de metano.	67
Tabla 20. Análisis composicional de BATA sin pretratar y pretratado.	68
Tabla 21. Caracterización de los hidrolizados enzimáticos de BATA pretratado con [EAO][OAc].	68
Tabla 22. Composición de los hidrolizados enzimáticos sintéticos de BATA.	69
Tabla 23. Resultados de la producción de metano con los valores óptimos con los diferentes sustratos.	70
Tabla 24. Parámetros de rendimiento de la producción de metano usando los valores óptimos con los diferentes sustratos.	71

Tabla 25. Valores iniciales y finales de azúcares totales (AT), glucosa y xilosa por HPLC usando los valores óptimos con los diferentes sustratos.	71
Tabla 26. Valores iniciales y finales para los ácidos grasos volátiles y pH con los valores óptimos con los diferentes sustratos.	74
Tabla 27. Claves asignadas al ADN genómico y ARN ribosomal extraídos de las muestras recolectadas de los reactores en condiciones óptimas con diferentes sustratos para el análisis de las comunidades microbianas.....	75
Tabla 28. Concentración y pureza del ADN extraído de las muestras Glu-D, HE-D, HES-D y Ino-D.....	76
Tabla 29. Resumen de datos de la secuenciación genética masiva y análisis filogenético para dominios de <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i> de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.....	78

Índice de anexos

Anexo A Preparación buffer de citratos.....	99
Anexo B Colecta y conservación de biomasa microbiana destinadas a la extracción de ácidos nucleicos.....	99
Anexo C Protocolo para la extracción y purificación de ADN	100
Anexo D Protocolo para la extracción y purificación de ARN ribosomal.....	102
Anexo E Electroforesis para la visualización de ARN.....	104
Anexo F Protocolo para la degradación de ADN contaminante.....	105
Anexo G Protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	106
Anexo H Protocolo para la síntesis de ADN complementario.....	107
Anexo I Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio <i>Archaea</i> de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.	109
Anexo J Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio <i>Bacteria</i> de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.	110
Anexo K Árbol filogenético del dominio <i>Archaea</i> y <i>Bacteria</i> de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.....	112
Anexo L Abundancia relativa de poblaciones bacterianas y arqueas dominantes y sus características biológicas de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.....	117
Anexo M Peso de los componentes de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.	124
Anexo N Pruebas de espectroscopía infrarroja para el seguimiento del [EAO][OAc] durante la digestión anaerobia	124
Anexo O Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio <i>Archaea</i> de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano	127
Anexo P Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio <i>Bacteria</i> de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano	128

Anexo Q Árbol filogenético del dominio <i>Archaea</i> y <i>Bacteria</i> de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.	130
Anexo R Abundancia relativa de poblaciones bacterianas y arqueas dominantes y sus características biológicas de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano	134
Anexo S Peso de los componentes de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.....	139

Resumen

En este trabajo se estudió el efecto del líquido iónico acetato de etanolamina ([EAO][OAc]) en las comunidades microbianas durante la digestión anaerobia. En primer lugar, se analizaron las comunidades microbianas en una prueba preliminar utilizando una concentración alta de [EAO][OAc] (5 % p/v) y una concentración baja (2.5 % p/v) con 5 g/L de glucosa en ambas pruebas. De acuerdo con el análisis de componentes principales (ACP), se sugiere que la sintrófia obligada en el sistema se debió por la vía del propionato al correlacionarse los acetógenos sintróficos obligados el volumen de metano, rendimiento y la velocidad volumétrica de producción de metano (VVPM).

Posteriormente, se realizó la optimización de la producción de metano en la digestión anaerobia teniendo como factores la concentración del [EAO][OAc] y glucosa mediante la metodología de superficie de respuesta, obteniendo como valores óptimos para el [EAO][OAc] de 2.234 % p/v y para la glucosa de 3.839 g/L. Simultáneamente, en algunas de las condiciones del diseño central compuesto la producción de metano fue baja debido a que existió una acumulación de propionato y butirato, esto a causa de un colapso de la relación sintrófica obligada para la oxidación de acetato entre las poblaciones bacterianas acetogénicas que consumen estos ácidos grasos volátiles para producir acetato y las arqueas acetótroficas que lo consumen para producir metano. Con estos resultados obtenidos se puede confirmar el efecto negativo del aporte de acetato proveniente del [EAO][OAc] al provocar un fallo en las comunidades sintróficas obligadas.

Por último, se efectuaron las pruebas de potencial bioquímico de metano con diferentes sustratos: (1) glucosa, (2) hidrolizados enzimáticos reales de bagazo de *Agave tequilana* var. *azul* (BATA) e (3) hidrolizados enzimáticos sintéticos de BATA utilizando los valores óptimos obtenidos. No existió una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de la producción de metano de estos tratamientos, además el volumen acumulado alcanzó un ~ 90 % de la producción máxima teórica esperada de acuerdo con la optimización. Respecto a las dinámicas de las poblaciones, la comunidad del dominio *Archaea* fue muy similar en abundancia relativa de los grupos tróficos entre todas las condiciones, mientras que en el dominio *Bacteria* la diversidad de las comunidades microbianas se vio afectada por la complejidad de los sustratos utilizados, los fermentadores fueron el grupo dominante, en cuanto al grupo trófico de los acetogénicos sintróficos obligados existió una reducción de ~ 50 % en abundancia respecto al inóculo en la condición con hidrolizados sintéticos, mientras que en las condiciones con glucosa e hidrolizados reales aumentó la abundancia de este grupo respecto al inóculo. El ACP de esta prueba sugiere que la ruta dominante en todos los sustratos fue la vía acetotrófica obligada, al correlacionar los

parámetros de volumen de metano producido y la VVPM con los metanógenos acetoclásticos y los acetógenos sintróficos obligados, mientras que la ruta secundaria fue la vía CO_2 reductora.

Abstract

In this work, the effect of the ionic liquid ethanolamine acetate ([EAO][OAc]) on microbial communities during anaerobic digestion was studied. First, microbial communities were analyzed in a preliminary test using a high concentration of [EAO][OAc] (5 % w/v) and a low concentration (2.5 % w/v) with 5 g/L glucose in both tests. According to principal component analysis (PCA), it is suggested that obligate syntrophy in the system was due to the propionate pathway as obligate syntrophy acetogens correlated with methane volume, yield, and volumetric rate of methane production (VRMP).

Subsequently, the optimization of methane production in anaerobic digestion was carried out taking as factors the concentration of [EAO][OAc] and glucose using the response surface methodology, obtaining as optimal values for [EAO][OAc] 2.234 % w/v and for glucose 3.839 g/L. Simultaneously, in some of the conditions of the central composite design, methane production was low because there was an accumulation of propionate and butyrate due to a collapse of the obligate syntrophic relationship for acetate oxidation between the acetogenic bacterial populations that consume these volatile fatty acids to produce acetate and the acetotrophic archaea that consume it to produce methane. With these obtained results, the negative effect of acetate input from [EAO][OAc] by causing a failure of obligate syntrophy communities can be confirmed.

Finally, biochemical methane potential tests were performed with different substrates: (1) glucose, (2) real enzymatic hydrolysates of bagasse of *Agave tequilana* var. *azul* (BATA) and (3) synthetic enzymatic hydrolysates of BATA using the optimum values obtained. There was no statistically significant difference between the variances of these treatments, and the accumulated volume reached ~ 90 % of the maximum theoretical production expected according to the optimization. Regarding population dynamics, the *Archaea* domain community was very similar in relative abundance of the trophic groups among all conditions, while in the *Bacteria* domain the diversity of the microbial communities was affected by the complexity of the substrates used, fermenters were the dominant group, as for the trophic group of obligate syntrophic acetogens there was a reduction of ~ 50 % in abundance with respect to the inoculum in the condition with synthetic hydrolysates, while in the conditions with glucose and real hydrolysates the abundance of this group increased with respect to the inoculum. The PCA of this test suggests that the dominant pathway in all substrates was the obligate acetotrophic pathway, correlating the parameters of volume of methane produced and VRMP with acetoclastic methanogens and obligate syntrophic acetogens, while the secondary pathway was the reducing CO₂ pathway.

Introducción

En los últimos años, se ha vuelto primordial el manejo de residuos con alto potencial de ser valorizados en productos de alto valor agregado a través de procesos biotecnológicos. En este sentido, en México durante el año 2022 la industria del tequila produjo aproximadamente 911 mil toneladas de bagazo de *Agave tequilana* var. *azul* (BATA) (CRT, 2023), un residuo sólido cuya disposición final es inadecuada, lo que genera un impacto ambiental en las áreas de descarga (López López *et al.*, 2010). Adicionalmente es un residuo que está formado por una gran cantidad de compuestos, como es la celulosa y hemicelulosa, con gran potencial para ser valorizados, a su vez que se realiza un manejo adecuado. En este contexto, la digestión anaerobia es una tecnología ampliamente estudiada y con gran potencial para valorizar el bagazo de agave, produciendo un compuesto de alto valor agregado conocido como biogás. El biogás es un gas formado principalmente de hidrógeno (H₂), metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂), que tiene diversas aplicaciones, principalmente la producción de electricidad, calor, generación de vapor en la industria y combustible para vehículos previo acondicionamiento (Khan *et al.*, 2017).

No obstante, el bagazo de agave es un material altamente recalcitrante por su composición lignocelulósica, mientras que para una adecuada producción de biogás se requiere de una alta disponibilidad de los compuestos del residuo a tratar, debido a esto el bagazo requiere de un paso previo típicamente conocido como pretratamiento. El pretratamiento mejora las características de la materia orgánica para una posterior hidrólisis enzimática de los compuestos contenidos, produciendo monómeros disponibles para que la comunidad microbiana pueda aprovecharlos y así producir el biogás (Kumar y Sharma, 2017). Asimismo, existen una gran variedad de tipos de pretratamientos siendo estos: 1) los físicos, que se enfocan principalmente en disminuir el tamaño de la partícula, entre los que se encuentran la molienda y los microondas (Olatunji *et al.*, 2021); 2) los fisicoquímicos, que mezcla procedimientos físicos y químicos para descomponer los polímeros del bagazo, entre ellos se encuentra la explosión de vapor, explosión con CO₂ supercrítico y explosión de fibras con amoníaco (Kumar y Sharma, 2017); 3) los biológicos, cuyas ventajas radican en condiciones moderadas de reacción, bajo consumo de energía y bajo costo para el procesamiento posterior, entre ellos está el pretratamiento enzimático (Abraham *et al.*, 2020) y finalmente 4) el tratamiento químico, como el uso de ácidos (Abraham *et al.*, 2020) y recientemente el uso de líquidos iónicos (LI) que son sales orgánicas con bajos puntos de fusión (<100 °C) que consisten en aniones inorgánicos u orgánicos y cationes orgánicos (Yoo *et al.*, 2017). Estos han adquirido un gran interés ya que se ha demostrado su gran potencial para el pretratamiento de diferentes materias primas lignocelulósicas como el BATA (Pérez-Pimienta *et al.*, 2019). En este contexto, se ha demostrado que el efecto del

pretratamiento con LI sobre el BATA facilita la adecuada despolimerización del material lignocelulósico, sin generar inhibidores o degradar la celulosa, lo que conlleva a una eficiente sacarificación y la posterior generación de biocombustibles (Pérez-Pimienta *et al.*, 2020).

Entre los LI, el acetato de etanolamina [EAO][OAc] es más biocompatible y de menor costo entre 0.70 y 1.40 USD por kg (Sun *et al.*, 2017), en comparación con LIs tradicionales como el acetato de 1-etil-3-metil-imidazolio. Adicionalmente, un aspecto muy importante a considerar de los LIs es su relativa toxicidad que depende principalmente de su estructura (Pernak *et al.*, 2003; Flieger y Flieger, 2020). Por estos motivos, es necesario realizar un lavado exhaustivo de la biomasa después del pretratamiento para eliminar el LI residual, de esta forma se reduce la inhibición de las enzimas y de los microorganismos en los pasos posteriores, llegándose a utilizar hasta 40 mL de agua por gramo de bagazo pretratado realizando 5 ciclos de lavado (Pérez-Pimienta *et al.*, 2013).

En este sentido, estudiar el efecto del [EAO][OAc] en la comunidad microbiana es vital, para poder garantizar una adecuada producción de CH₄, la cual está totalmente influenciada por una adecuada dinámica de las poblaciones, favoreciendo una alta diversidad y uniformidad microbiana. Por lo tanto, este trabajo se plantea abordar el efecto del [EAO][OAc] en las comunidades microbianas productoras de metano con diferentes sustratos glucosa, hidrolizados enzimáticos de bagazo de agave e hidrolizados enzimáticos sintéticos. Además, se evaluó el desempeño a través de las correlaciones de las variables biológicas, fisicoquímicas y operacionales usando el método estadístico multivariado de análisis de componentes principales.

Justificación

La industria tequilera ha contribuido al desarrollo económico, agrícola e industrial en México, no obstante, durante la producción del tequila se genera un residuo sólido conocido como bagazo; tan solo en el año 2022 se generaron 911 mil toneladas de bagazo de *Agave tequilana* var. *azul* (BATA). Debido a la alta velocidad de generación y a la falta de tratamientos biológicos para su disposición, el BATA es incorporado inadecuadamente a campos agrícolas o es desechado en vertederos ilegales, lo cual representa un problema ambiental. A pesar de esto, el BATA tiene un alto potencial al ser aprovechado en diferentes procesos para ser transformado en productos de valor agregado, como es el caso de la producción de biogás. Sin embargo, por la alta recalcitrancia del BATA es necesario realizar un pretratamiento con el objetivo de aumentar la accesibilidad a las enzimas durante la hidrólisis y mejorar su rendimiento.

Actualmente, el uso de líquidos iónicos (LI) ha generado interés por su capacidad de desestabilizar la matriz lignocelulósica sin la degradación de la celulosa logrando así recuperar altas concentraciones de azúcares. Sin embargo, una de sus desventajas es su toxicidad para bioprocesos posteriores como la digestión anaerobia o hidrólisis enzimática, razón por la cual es necesario realizar un lavado de la biomasa lignocelulósica después del pretratamiento. Con el propósito de disminuir la concentración de LI residual, aunque este lavado permite la recuperación del LI, también ocasiona que se consuman grandes cantidades de agua en el proceso. Otra de sus desventajas es su elevado costo, por lo que el uso de líquidos iónicos próticos es una alternativa dado que son menos costosos y más sencillos de producir, como es el caso del acetato de etanolamina [EOA][OAc], el cual ha demostrado ser efectivo para pretratar diversas biomasa lignocelulósicas. Sin embargo, el efecto del remanente de [EOA][OAc] proveniente del pretratamiento de bagazo sobre el proceso de la digestión anaerobia no ha sido estudiado previamente.

Considerando lo anterior, el desarrollo del conocimiento en esta área permitiría reducir la cantidad de agua necesaria en los lavados después del pretratamiento del BATA, además de lograr un mejor entendimiento del desempeño de las comunidades microbianas en el proceso de digestión anaerobia en presencia de [EAO][OAc].

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del acetato de etanolamina [EOA][OAc] sobre las comunidades microbianas metanogénicas presentes en biorreactores alimentados con glucosa, hidrolizado enzimático sintético e hidrolizado enzimático real de bagazo tequilero pretratado con dicho líquido iónico.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del [EOA][OAc] a una concentración alta y baja sobre la producción de metano y la comunidad microbiana en biorreactores metanogénicos alimentados con sustrato modelo (glucosa).
2. Optimizar la concentración de glucosa y [EOA][OAc] en biorreactores metanogénicos para maximizar la producción de metano.
3. Evaluar el efecto del [EOA][OAc] sobre la producción de metano y la comunidad microbiana en biorreactores metanogénicos alimentados en las condiciones óptimas con sustrato modelo (glucosa), hidrolizado enzimático sintético e hidrolizado enzimático real de bagazo tequilero pretratado con dicho líquido iónico.
4. Caracterizar la diversidad, abundancia y dinámica de las poblaciones presentes y activas en los biorreactores metanogénicos a partir de la extracción de ADN genómico y ARN-ADN complementario mediante metagenómica y metatranscriptómica.
5. Evaluar el desempeño de los digestores anaerobios en las condiciones óptimas mediante la correlación de las variables biológicas, fisicoquímicas y operacionales usando el método estadístico multivariado denominado análisis de componentes principales (ACP).

Hipótesis

1. El aporte de una alta concentración de acetato proveniente del [EAO][OAc] tendrá un efecto inhibitorio sobre la relación interespecie obligada para la transferencia de acetato, lo que repercutirá en una baja producción de metano en biorreactores alimentados con glucosa como sustrato modelo.
2. La producción de metano usando glucosa y el [EAO][OAc] en concentraciones óptimas será más baja que al utilizar las mismas concentraciones pero sustituyendo la glucosa por sustratos complejos (hidrolizado enzimático sintético e hidrolizado enzimático real de bagazo tequilero) en términos de azúcares totales; ya que la diversidad de fuentes de carbono y energía de los hidrolizados favorecerá la diversidad de las comunidades microbianas, mejorando la producción de metano en los biorreactores.

1. Marco teórico y antecedentes

1.1 Industria tequilera

El tequila es una bebida alcohólica tradicional mexicana reconocida mundialmente que es obtenida de la fermentación y destilación del jugo de la piña del *Agave tequilana* var. *azul*. Este agave es una planta herbácea suculenta que pertenece a la familia *Agavaceae*, se caracteriza por sus hojas angostas y rígidas dispuestas en espiral formando una roseta (CIATEJ, 2017).

El tequila se clasifica en dos grandes categorías: tequila 100 % de agave, donde los azúcares fermentados provienen únicamente del *Agave tequilana* var. *azul* y tequila, que contiene hasta el 49 % de azúcares reductores totales expresados en unidades de masa de otra fuente (CRT, 2023). Cabe señalar que, tanto su proceso de producción como el cultivo del agave deben darse dentro del territorio determinado en la Declaración de Protección a la Denominación de Origen Tequila, el cual incluye a todo el estado de Jalisco, 30 municipios del estado de Michoacán, 11 de Tamaulipas, 8 de Nayarit y 7 de Guanajuato (CRT, 2023), además de seguir los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el Tequila (NOM-006-SCFI-2012). El Consejo Regulador del Tequila, A.C. (CRT) es una organización dedicada a inspeccionar y certificar el cumplimiento de esta norma, además de proteger la Denominación de Origen del Tequila, tanto a nivel nacional como internacional y la de garantizar al consumidor la autenticidad del Tequila (CRT, 2023). Por otra parte, la Cámara Nacional de la Industria Tequilera (CNIT) es una institución conformada por diversas empresas, las cuales se afilian libre y voluntariamente con el propósito de representar y promover la industria tequilera para permitir la competitividad del sector a nivel nacional e internacional. Algunos de las compañías que conforman esta organización son Casa Cuervo, Tequila Sauza, Tequila Siete Leguas, Tequila Cuervo, Tequila Tres Mujeres, Grupo Tequilero México, entre otras (CNIT, 2023).

El proceso de producción de tequila inicia con la plantación del *Agave tequilana* var. *Azul*. Tan solo en el año 2022 se sembraron 143,867 hectáreas de agave de acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2023). Cuando el agave alcanza la madurez es cosechado, el tiempo promedio que requiere es de aproximadamente 7 - 8 años, en este momento se tiene la acumulación máxima de carbohidratos en la planta (CRT, 2023). La composición de los agaves cosechados cambia en función de la temporada, en promedio los agaves contienen 27 % p/p (base húmeda) de azúcares reductores, principalmente fructanos los cuales presentan la característica de ser altamente ramificados (CIATEJ, 2017).

Durante la cosecha, se realiza el jimado que consiste en separar las hojas para obtener la “piña” del agave en donde se encuentran almacenados los carbohidratos, las piñas pueden llegar a pesar hasta 90 Kg (Cruz Cedeño y Álvarez Jacobs, 2003). En la siguiente etapa, las piñas son

cocidas en hornos de mampostería o autoclaves con el propósito de hidrolizar los fructanos a alta temperatura, además durante este paso se forman compuestos que contribuyen al aroma y sabor en la formulación del mosto. Posteriormente, las piñas cocidas son procesadas en un tren de molinos de rodillos, desgarradora o difusor para extraer el jugo que contiene los azúcares que serán fermentados. El material fibroso residual que queda después de que las piñas fueron trituradas y molidas es conocido como bagazo de agave, que es uno de los principales desechos durante la producción del tequila (Cruz Cedeño y Álvarez Jacobs, 2003; CRT, 2023).

1.1.1 Generación del bagazo de agave

Se estima que, por cada litro de tequila producido se generan 1.4 Kg de bagazo de *Agave tequilana* var. *azul* (BATA) (Weber *et al.*, 2020), dado que se produjeron 651 millones de litros de tequila en el año 2022, entonces se produjeron aproximadamente 911 mil toneladas de bagazo, que representan un gran problema para las micro, pequeñas y medianas industrias, dado que no disponen de recursos financieros y plantas de tratamiento para el aprovechamiento y/o disposición final de la totalidad de este residuo (Hernández Meléndez *et al.*, 2016). Además, el BATA puede tener un impacto negativo muy severo en el ambiente, debido a que la mayor parte del bagazo no se utiliza en absoluto, se desecha al ambiente ilegalmente o tiene aplicaciones inadecuadas en tierras agrícolas, que pueden causar contaminación por lixiviados, generación de malos olores y hábitat de plagas (López López *et al.*, 2010).

1.1.2 Composición del bagazo de agave

La composición estructural del BATA está conformada principalmente por celulosa (glucano), hemicelulosa (xilano) y lignina (Figura 1), en la Tabla 1 se muestra su composición en porcentaje del peso seco, está oscila dependiendo del clima, prácticas agronómicas, tiempo de cosecha y edad de las plantas (Iñiguez *et al.*, 2014).

Tabla 1. Composición del bagazo de *Agave tequilana* var. *azul* (BATA) en porcentaje del peso seco (Pérez-Pimienta *et al.*, 2016).

Compuesto	Glucano	Xilano	Lignina	Ceniza
(%)	40.5	21.3	19.6	6.4

La celulosa contenida en el BATA es un polímero lineal compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -(1-4) formando dímeros llamados celobiosa. Los polímeros de

celulosa están interconectados a través de enlaces de hidrógeno y de Van der Waals para formar microfibrillas, las cuales se presentan en forma cristalina y amorfa. Las partes de celulosa cristalina están unidas entre sí por enlaces de hidrógeno no covalentes, lo que proporciona una menor degradabilidad en comparación con la parte amorfa (Bhatia *et al.*, 2020).

Por otra parte, la hemicelulosa es un heteropolímero altamente ramificado compuesto de pentosas (α -L-arabinosa y β -D-xilosa), hexosas (β -D-manosa, α -D-galactosa y β -D-glucosa) y ácidos de azúcar (α -D-4-O-metil D-glucurónico, α -D-galacturónico y α -D-glucurónico), además de otros azúcares en bajas concentraciones como α -L-fructosa y L-ramnosa. A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa se puede descomponer fácilmente en monosacáridos debido a su naturaleza no cristalina, a la presencia del grupo acetilo y su bajo grado de polimerización (Bhatia *et al.*, 2020; Usmani *et al.*, 2020).

Finalmente, la lignina es un polímero fenólico irregular y aleatoriamente entrecruzado que se compone de tres monómeros primarios de fenilpropano: el alcohol p-cumarílico, coniferílico y sinapílico. Estas unidades monoméricas dan lugar a las subunidades p-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S) cuando se incorporan al polímero de lignina, uniéndose entre sí por enlaces β -O-4, α -O-4, β -5, β -1, 5-5, 4-O-5 y β - β . Dependiendo de la fuente de la biomasa, la proporción de las diferentes unidades monoméricas cambia. La lignina forma un límite protector al unirse covalentemente a la celulosa y la hemicelulosa, lo que proporciona a la biomasa lignocelulósica resistencia mecánica y contra el ataque microbiano (Baruah *et al.*, 2018; Usmani *et al.*, 2020).

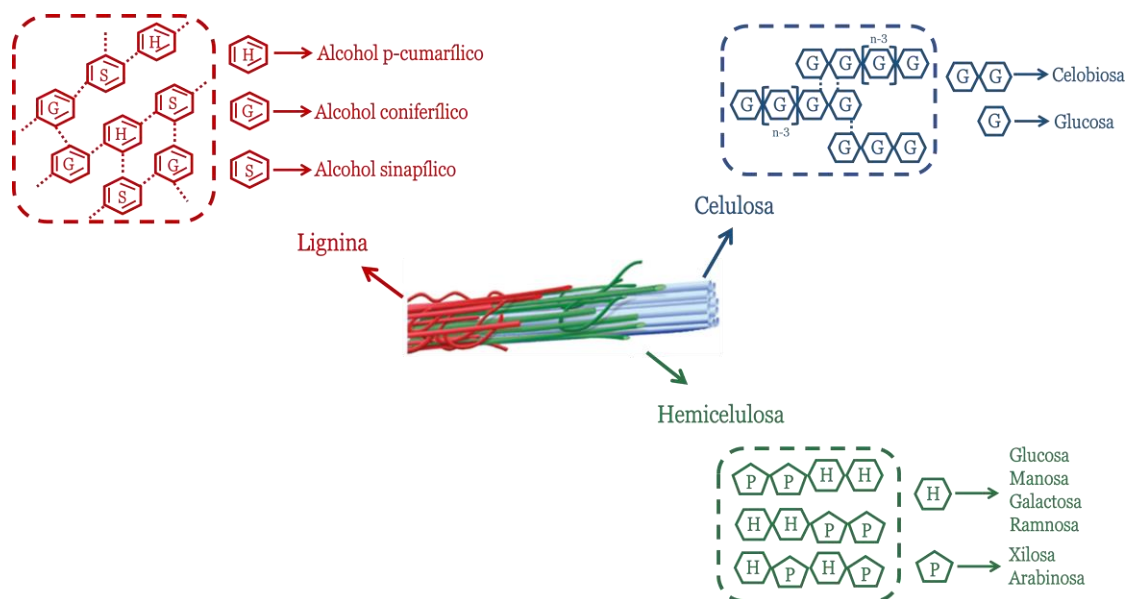


Figura 1. Composición de la biomasa lignocelulósica. Adaptado de Bhatia *et al.*, (2020).

1.1.2 Valorización del bagazo de agave

El BATA tiene un gran potencial para ser utilizado como sustrato para la generación de productos de valor agregado como ácido succínico (Corona-González *et al.*, 2016), polihidroxitirato (González-García *et al.*, 2019), hidrógeno (Arreola Vargas *et al.*, 2016) y metano (Snell Castro *et al.*, 2019). Este último, puede ser revalorizado en forma de un biocombustible gaseoso conocido como biogás por medio de la digestión anaerobia, que es un proceso considerado como sostenible para el tratamiento de residuos (Li *et al.*, 2019).

El biogás está compuesto principalmente de metano (CH₄) 40–75 % y dióxido de carbono (CO₂) 15-60 %. Además, contiene otras especies trazas como el nitrógeno (N₂) 0–2 %, sulfuro de hidrógeno (H₂S) 0.005–2 %, amoníaco (NH₃) <1 % y monóxido de carbono (CO) <0.6 %. El biogás tiene diversas aplicaciones, principalmente la producción de electricidad, calor, generación de vapor en la industria y combustible para vehículos, aplicando un acondicionamiento previo (Khan *et al.*, 2017).

1.2 Pretratamiento para la biomasa lignocelulósica

La biodegradación de BATA mediante un proceso de digestión anaerobia implica tener un sustrato con azúcares disponibles para la comunidad microbiana metanogénica. En este contexto, el uso del BATA como sustrato sin un pretratamiento previo ocasiona que la digestión anaerobia sea lenta, teniendo como resultado un bajo rendimiento en volumen de metano por gramo de sólidos volátiles debido a las características estructurales de la biomasa (Weber *et al.*, 2020). Por esto, es necesario un pretratamiento de las materias primas lignocelulósicas, para superar la recalcitrancia a través de cambios químicos y estructurales en la biomasa lignocelulósica (Figura 2). Al mismo tiempo, el pretratamiento tiene como propósito mejorar las características del bagazo para una posterior hidrólisis de la celulosa o sacarificación, que producirá los sustratos (azúcares) para la comunidad microbiana durante la digestión anaerobia. En el caso de realizar una sacarificación del bagazo mediante una hidrólisis enzimática, el pretratamiento del BATA facilitaría el acceso de las enzimas a la matriz lignocelulósica durante dicha hidrólisis, mejorando el rendimiento de la cantidad de azúcares producidos durante la sacarificación (Kumar y Sharma, 2017).

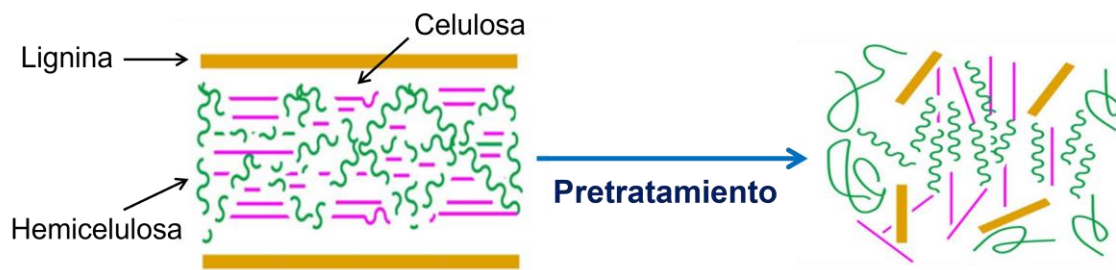


Figura 2. Efecto del pretratamiento en la biomasa lignocelulósica

En general, los objetivos de los pretratamientos son facilitar la accesibilidad de las enzimas a la celulosa y conducir a la degradación de la materia prima, evitar la degradación o la pérdida de carbohidratos, eliminar la liberación de posibles inhibidores y reducir el posible impacto en el ambiente (Olatunji *et al.*, 2021). Existe una variedad de técnicas de pretratamiento de biomasa lignocelulósica que se dividen en cuatro categorías principales, siendo estas: físicas, químicas, fisicoquímicas y biológicas. La selección del tipo depende de las características fisicoquímicas y de la disposición estructural de la materia prima.

1.2.1 Pretratamientos físicos

Los métodos de pretratamientos físicos se utilizan generalmente para reducir el tamaño de partícula de la biomasa con lo cual aumenta el área superficial de contacto permitiendo mejorar la accesibilidad a la biomasa. Los métodos más comunes son el mecánico (molienda, fresado y extrusión), microondas y la ultrasonica (Olatunji *et al.*, 2021).

El pretratamiento de molienda (bolas, rodillos, varillas, martillos, coloidal y vibratoria) permite conseguir la reducción del tamaño de la biomasa, el grado de polimerización y la cristalinidad de la celulosa. Por otro lado, en el proceso de pretratamiento de extrusión se utilizan extrusores con uno o dos tornillos instalados en un cilindro hermético, por donde pasa la materia lignocelulósica a una alta temperatura (>300 °C); la estructura recalcitrante de la lignocelulosa se rompe debido a los efectos combinados de la temperatura y las fuerzas de cizallamiento causadas por las cuchillas del tornillo giratorio (Kusmar y Sharma, 2017).

El uso de microondas, que son radiaciones electromagnéticas no ionizantes con longitudes de onda entre 1 mm y 1 m, causa colisiones moleculares que genera energía térmica resultando en la ruptura de la pared celular y la cristalinidad de la celulosa, mejorando el área superficial disponible (Olatunji *et al.*, 2021). En cambio, el tratamiento con ultrasonido conduce a la formación de pequeñas burbujas de cavitación que rompen las fracciones de celulosa y hemicelulosa, lo

que aumenta la accesibilidad a las enzimas que degradan la celulosa para una descomposición eficaz en azúcares reductores más simples (Kumar y Sharma, 2017).

Los pretratamientos físicos evitan el uso de productos químicos, reduciendo así la generación de inhibidores para reacciones posteriores en la digestión anaerobia. Sin embargo, algunas de sus desventajas son el alto consumo de energía y la incapacidad de remover la lignina (Baruah *et al.*, 2018).

1.2.2 Pretratamientos fisicoquímicos

Los pretratamientos fisicoquímicos combinan los métodos físicos y químicos para descomponer los polímeros de hemicelulosa o lignina dentro de la biomasa lignocelulósica. Entre los métodos más comunes se encuentran la explosión de vapor, explosión con CO₂ supercrítico, explosión de fibras con amoníaco y tratamiento de agua líquida caliente (Kumar y Sharma, 2017).

El pretratamiento por explosión de vapor cambia la estructura de la biomasa lignocelulósica con vapor saturado a alta presión (5 a 50 bar) a una temperatura de 160 a 250 °C durante diferentes intervalos de tiempo para lograr que las moléculas de agua penetren en la estructura de la biomasa. Posteriormente, la presión se reduce repentinamente para permitir que las moléculas de agua escapen de manera explosiva provocando que las fibras individuales se separen y la estructura de la pared celular se rompa. La temperatura y la presión elevadas favorecen la ruptura enlaces hemicelulosa-lignina y de los enlaces glucosídicos en la celulosa (Baruah *et al.*, 2018; Abraham *et al.*, 2020). Este método tiene varias ventajas, como un bajo efecto ambiental o un uso limitado de productos químicos, sin embargo, si las condiciones lo permiten como, por ejemplo, alta temperatura y mayor tiempo de residencia, se pueden formar algunos inhibidores como furfural, hidroximetilfurfural (HMF) o derivados del fenol (Millati *et al.*, 2020).

El método de pretratamiento por explosión de fibras con amoníaco (AFEX por sus siglas en inglés) consiste en tratar la materia lignocelulósica con amoníaco líquido (1:1 p/p) a temperaturas moderadas (60 a 170 °C) y altas presiones (15 a 30 bar) durante un breve periodo de tiempo (5 a 60 minutos). El mecanismo de acción es similar al pretratamiento por explosión de vapor, no obstante, el amoníaco debe recuperarse y reciclarse debido a su alto costo y volatilidad para reducir el costo operativo general y minimizar el daño ambiental (Baruah *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2020).

De igual forma, el pretratamiento con CO₂ supercrítico está basado en el método de explosión por vapor debido a que la molécula de CO₂ tiene un tamaño similar al agua, por lo que se introduce fácilmente en la biomasa a alta presión. Este método tiene la ventaja de requerir temperaturas

más bajas y ser menos costoso comparado con el método AFEX, además de no ser tóxico o inflamable, tener un bajo impacto ambiental y fácil recuperación de la fibra después del proceso (Baruah *et al.*, 2018; Prasad *et al.*, 2022).

En el método con agua líquida caliente, como su nombre lo indica utiliza agua a muy alta temperatura (170 a 230 °C) con alta presión (hasta 5 MPa) para evitar la evaporación. El agua se disocia en iones hidronio (H_3O^+) e iones hidróxido (OH^-), los cuales catalizan la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica. Además, al hidrolizar la hemicelulosa se libera ácido acético, que se comporta como un catalizador en el proceso. El tratamiento se realiza a un pH controlado entre 4 y 7 para evitar la degradación del azúcar y la formación de inhibidores (Poddar *et al.*, 2021).

1.2.3 Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos emplean hongos, consorcios microbianos y enzimas para mejorar la biodegradación de materiales lignocelulósicos, el principal objetivo es la deslignificación con lo cual las fracciones de celulosa y hemicelulosa quedan expuestas mejorando la degradación de la biomasa (Abraham *et al.*, 2020).

En el pretratamiento fúngico se utilizan hongos blancos, cafés y de pudrición blanda, que son capaces de producir enzimas como lacasas, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa que tienen una alta capacidad hidrolítica para degradar la lignocelulosa (Olatunji *et al.*, 2021). Por otra parte, el pretratamiento con consorcios microbianos utiliza diversas especies con diferentes eficiencias y funciones para la degradación de biomasa lignocelulósica, teniendo una mejor capacidad para colonizar la materia prima sobre las especies endógenas. Se han empleado bacterias con alta capacidad hidrolítica como *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, entre otros (Abraham *et al.*, 2020).

El pretratamiento enzimático incluye el uso de enzimas crudas, purificadas o semipurificadas (oxidativas e hidrolíticas) producidas por bacterias u hongos. La hidrólisis de la celulosa se lleva a cabo con enzimas endogluconasas, exogluconasas y β -glucosidasas. Mientras que, la hidrólisis de la hemicelulosa es realizada por las enzimas endoxilanasas, α -glucuronidasas y endomananasas (Olatunji *et al.*, 2021).

Las principales ventajas del pretratamiento biológico son condiciones moderadas de reacción, bajo consumo de energía y bajo costo para el procesamiento posterior. No obstante, las desventajas que presenta son periodos extensos de reacción y condiciones de crecimiento precisas, además que los microorganismos pueden consumir una fracción de los carbohidratos disponibles en el medio (Amin *et al.*, 2017; Poddar *et al.*, 2021).

1.2.4 Pretratamientos químicos

Los pretratamientos químicos funcionan principalmente mediante la eliminación de la lignina o hemicelulosa presente en la biomasa, donde el modo de acción depende del producto químico que se utilice y de las condiciones operativas en el proceso. Se clasifican principalmente en tratamientos ácidos, alcalinos, oxidativos, organosolv y uso de líquidos iónicos (Abraham *et al.*, 2020).

El pretratamiento con ácido induce la interrupción de los enlaces de Van der Waals, hidrógeno y covalentes provocando la desintegración de la biomasa, dando como resultado la solubilización de la hemicelulosa y la reducción de la celulosa. Este tipo de pretratamiento se puede realizar de dos maneras diferentes con ácido diluido (0.1 – 10 %) a temperaturas altas (> 200 °C) y con ácido concentrado (30 – 70 %) a temperaturas relativamente más bajas (< 50 °C). Los ácidos más utilizados son ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido clorhídrico (HCl), ácido fosfórico (H₃PO₄), ácido nítrico (HNO₃), ácido nitroso (HNO₂), ácido maleico y ácidos orgánicos (Mankar *et al.*, 2021; Poddar *et al.*, 2021). Mientras tanto, el pretratamiento alcalino implica la adición de bases a la biomasa como hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) o hidróxido de calcio (Ca(OH)₂), provocando la saponificación y solvatación de la biomasa, lo que conduce a una disminución del grado de polimerización y la cristalinidad aumentando así el área de la superficie interna, además de la eliminación de los enlaces entre la lignina y otros polímeros (Amin *et al.*, 2017). No obstante, la formación de compuestos inhibidores como el furfural, hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, aldehído, cetona y ácido fenólico es una de las principales desventajas del uso del pretratamiento ácido y alcalino (Olatunji *et al.*, 2021).

En el pretratamiento oxidativo se utiliza agentes oxidantes como ozono (O₃), cloruro de hierro III (FeCl₃), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y oxígeno (O₂) para solubilizar la lignina y la hemicelulosa de la materia lignocelulósica por medio de sustituciones electrofílicas, la ruptura de los núcleos aromáticos, los enlaces alquil aril éter o el desplazamiento de la cadena lateral (Kumari y Singh, 2018).

El método de pretratamiento organosolv implica el uso de solventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, alcohol tetrahidrofurfurílico, ácidos orgánicos, etilenglicol y acetona. Comúnmente, se utilizan catalizadores ácidos (HCl, H₂SO₄ y H₃PO₄), bases (óxido de calcio (CaO), NaOH y amoníaco (NH₃)) y algunas sales. Durante el proceso, la deslignificación y la solubilización de la hemicelulosa aumentan el volumen de los poros y el área superficial de la celulosa mejorando la accesibilidad para la hidrólisis enzimática y la sacarificación (Baruah *et al.*, 2018).

Recientemente, el uso de los líquidos iónicos ha aumentado porque se ha demostrado que tienen potencial para el pretratamiento de diferentes materias primas lignocelulósicas (Pérez-Pimienta *et al.*, 2019). En la Tabla 2 se mencionan algunos de los pretratamientos que se han aplicado al BATA junto con las condiciones de la hidrólisis enzimática a la que fueron sometidos.

Tabla 2. Diferentes pretratamientos realizados para el BATA destinado a hidrólisis enzimática.

Pretratamiento	Condiciones de la hidrólisis	Resultado	Referencias
Explosión de vapor a una relación sólido:líquido de 55:2000 (p/p) a 142 °C y 0.47 MPa durante 15 min	Enzimática, Cellic CTec2 (Novozymes) 2.4 mg proteína/g BATA, temperatura: 50 °C, pH: 4.8, agitación: 120 rpm, tiempo de hidrólisis: 34 h	Los rendimientos fueron de 0.7 g azúcares totales/g BATA, 0.12 g glucosa/g BATA y 0.03 g xilosa/g BATA	(Duran-Cruz <i>et al.</i> , 2021)
Autohidrólisis, relación sólido/líquido de 1:10 (p/v) a 194 °C por 30 min, régimen de calentamiento isotérmico a 200 rpm	Enzimática, Cellic CTec2 (Novozymes) 15 FPU ^a /g glucano, temperatura: 50 °C, pH: 4.8, agitación: 150 rpm, tiempo de hidrólisis: 72 h	Conversiones de celulosa hasta del 98 % (195.6 g/L)	(Pino <i>et al.</i> , 2019)
Líquido iónico, [Emim][OAc] ^b con una carga de sólidos al 30 %, 119 °C por 142 min	Enzimática, Cellic CTec2 (Novozymes) 8 FPU/g BATA, temperatura: 50 °C, pH: 4.8, agitación: 150 rpm, tiempo de hidrólisis: 72 h	Los rendimientos fueron de 41.3 Kg de glucosa y 13 Kg de xilosa por cada 100 Kg de BATA	(Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2019)
AFEX, 0.4 g H ₂ O/g biomasa seca, 2.0 g NH ₃ / g biomasa seca a 120 °C por 38 min	Enzimática, Cellic CTec2 y HTec2 (Novozymes) en una relación 78:22, con una carga total de enzimas 20 mg de proteína/g de glucano. Temperatura: 50 °C, pH: 4.8, agitación: 250 rpm, tiempo de hidrólisis: 72 h	Los rendimientos fueron de 25.2 Kg de glucosa y 10.9 Kg de xilosa por cada 100 Kg de BATA	(Flores-Gómez <i>et al.</i> , 2018)
Organosolv, solución con 74.5 % de agua, 25 % de etanol y 0.5 % de H ₂ SO ₄ como catalizador a 160 °C, 138 psi y 10 min en un reactor químico de alta presión	Enzimática, Cellic CTec2 y HTec2 (Novozymes) 8 FPU/g de biomasa y 15 CBU ^c /g de biomasa, respectivamente. Temperatura: 50 °C, pH: 4.8, agitación: 150 rpm, tiempo de hidrólisis: 18 h	Los rendimientos fueron de 26.8 Kg de glucosa y 2.5 Kg de xilosa por cada 100 Kg de BATA	(Pérez-Pimienta, <i>et al.</i> , 2017)

Autohidrólisis relación sólido/líquido de 1:10 (p/v) a 180 °C y 140 psi en un reactor por lotes en un régimen de calentamiento isotérmico	Enzimática, Cellic CTec2 y HTec2 (Novozymes) 40 mg proteína/g glucano y 4 mg proteína/g de xilano, respectivamente.	Los rendimientos fueron de 24.0 Kg de glucosa y 2.9 Kg de xilosa por cada 100 Kg de BATA	(Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2016)
AFEX en un reactor Parrd con una proporción 2:1 de amoníaco líquido anhidro y BATA, tiempo de residencia 30 min a 102 °C y 325 psi	Temperatura: 50 °C, pH: 4.8, agitación: 150 rpm, tiempo de hidrólisis: 72 h	Los rendimientos fueron de 28.2 Kg de glucosa y 14.3 Kg de xilosa por cada 100 Kg de BATA	
Alcalino-oxidativo en dos etapas. Etapa 1: solución de NaOH al 6 % en peso base seca, a 120 °C y 2 atm por 1 h. Etapa 2: solución de H ₂ O ₂ al 6 % en peso base seca, a 30 °C sin agitación y protegido de la luz por 24 h	Enzimática, Cellic CTec3 y HTec3 (Novozymes) a una concentración de 6 % cada una. Temperatura: 50 °C, pH: 4.8, agitación: 150 rpm, tiempo de hidrólisis: 72 h	El rendimiento fue de 352.18 g azúcares reductores/Kg BATA, con una concentración de 165.67 g/L de azúcares reductores (136.44 g/L de glucosa y 29.23 g/L de xilosa).	(Velázquez-Valadez <i>et al.</i> , 2016)
Ácido diluido, relación sólido/líquido de 1:10 (p/v) con 2.3 % H ₂ SO ₄ , a 147 °C, por 15 min	Enzimática, Celluclast 1.5 L y Novozyme 188 (Novozymes) 100 unidades/g sólidos totales (ST) y 80 unidades/g ST respectivamente. Temperatura: 40 °C, pH: 5, agitación: 100 rpm, tiempo de hidrólisis: 72 h	El hidrolizado ácido del pretratamiento obtuvo una concentración de 25.8 g azúcares/L, mientras que el remanente de BATA después de la hidrólisis enzimática obtuvo 41.0 g azúcares/L	(Saucedo-Luna <i>et al.</i> , 2011)

^a FPU = unidades de papel filtro, ^b [Emim][OAc] = acetato de 1-etil-3-metilimidazolio, ^c CBU = unidades de celobiohidrolasas

1.3 Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (LI) son sales orgánicas con bajos puntos de fusión (<100 °C) que consisten en aniones inorgánicos u orgánicos como los haluros, alquilsulfatos, hidrocarburos fluorados, ácidos carboxílicos, entre otros y cationes orgánicos tales como imidazol alquilado, pirrol o derivados de piridina, alquifosfinas y alquilaminas cuaternizadas (Yoo *et al.*, 2017), en la Figura 3 se presentan algunos de los cationes y aniones más comunes. Algunas de las características que poseen los LI son inflamabilidad, presión de vapor muy baja, alta viscosidad, baja conductividad, alta estabilidad térmica y química, nula corrosividad y tienen buena biodegradabilidad (Usmani *et al.*, 2020).

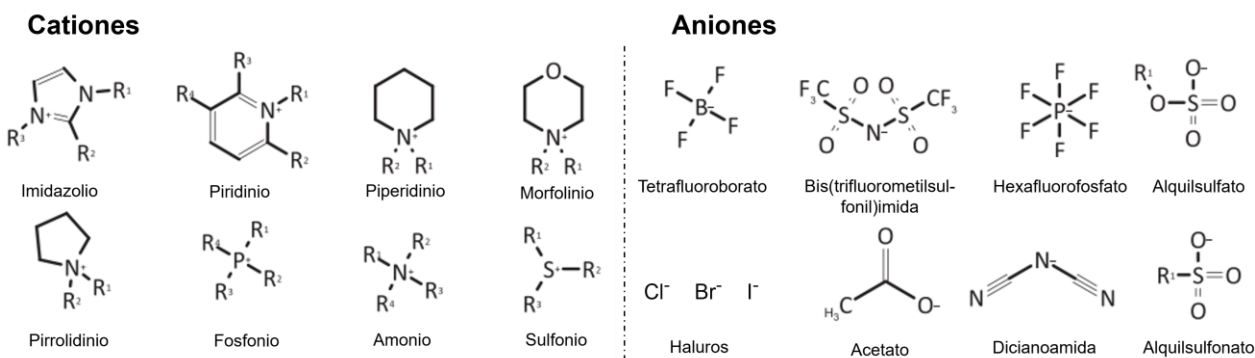


Figura 3. Cationes y aniones comunes en los líquidos iónicos. Adaptado de Cho *et al.*, (2021)

El mecanismo descrito para la interacción del LI con la biomasa lignocelulósica se basa en la combinación de los aniones y cationes junto con la composición de la biomasa. La disolución de la celulosa involucra la interacción entre el grupo hidroxilo de la celulosa con el catión y el anión del LI como se muestra en la Figura 4. Durante la interacción, los átomos de oxígeno del hidroxilo de la celulosa sirven como donantes de pares de electrones y los átomos de hidrógeno actúan como aceptores de electrones, que interactúan con los cationes del LI como aceptores de electrones y los aniones como donadores, respectivamente. Esta interacción provoca la separación de los átomos de oxígeno e hidrógeno y, por lo tanto, la interrupción de los enlaces de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares en la celulosa, llevando así a la disolución de ésta (Feng y Chen, 2008).

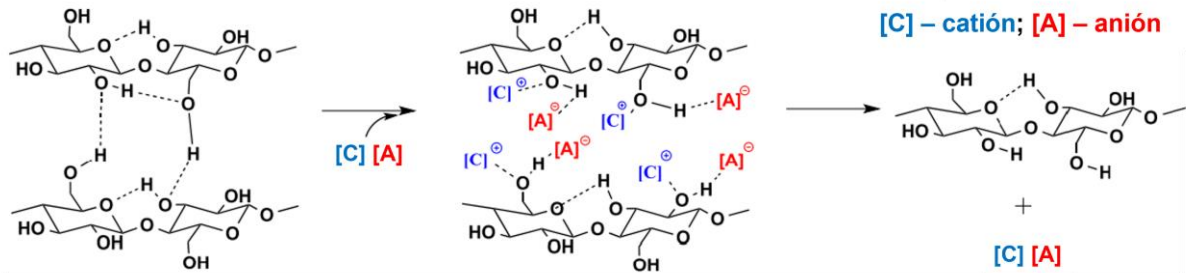


Figura 4. Disolución de celulosa con LI. Adaptado de Yoo *et al.*,(2017)

Los LI que son capaces de disolver la celulosa generalmente consisten en cationes a base de imidazolio, piridinio, amonio, fosfonio o morfolinio, así como aniones que pueden formar fuertes enlaces de hidrógeno con grupos hidroxilo, por ejemplo, cloruros, acetato, formiato, propionato, lactato, fosfatos de dialquilo, fosfonatos de dialquilo y trialquilo (Hou *et al.*, 2017).

La celulosa disuelta se puede regenerar para su posterior reutilización precipitándose con la adición de un antisolvente como agua, metanol, etanol o acetona. Cuando se agrega agua a la mezcla de LI y biomasa, los iones del LI forman enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua y se desplazan a la fase acuosa. En consecuencia, los enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares de la celulosa son reconstruidos provocando así la precipitación de la celulosa, la cual posteriormente se puede separar mediante filtración o centrifugación (Tan y Lee, 2012).

Por otra parte, la disolución de la lignina se logra por la escisión de los enlaces glucosídicos, éster y éter β -O-4, en seguida se forman enlaces ion-dipolo que dan como resultado la descomposición de la estructura de la lignina, la escisión de estos enlaces entre las unidades aumenta la porosidad y reduce la cristalinidad. En general, la solubilidad de la lignina es alta para los LI que contienen cationes de imidazolio, piridinio, pirrolidinio, amonio y fosfonio (Zhang *et al.*, 2019; Hasanov *et al.*, 2020).

Los efectos del pretratamiento con LI sobre BATA son la eliminación parcial de hemicelulosa/lignina y celulosa cristalina sin la generación de inhibidores o degradación de la celulosa, lo que conlleva a una eficiente sacarificación y generación de biocombustibles (Pérez-Pimienta *et al.*, 2020).

Algunos de los estudios realizados para diferentes materias primas lignocelulósicas utilizando el pretratamiento con LI se presentan en la Tabla 3. Para el BATA los rendimientos obtenidos con el pretratamiento con LI y posteriormente sacarificación han sido comparables o incluso superiores respecto al uso de hidrólisis ácida como pretratamiento. Además, algunas desventajas

que ocurren cuando se realiza hidrólisis ácida es la producción de inhibidores de la fermentación como furfural o 5-hidroximetilfurfural y la corrosión, los cuales no se presenta con los LI (Pérez-Pimienta *et al.*, 2021).

Tabla 3. Estudios para diversos materiales lignocelulósicos para el pretratamiento LI.

Líquido iónico	Biomasa	Resultados	Referencias
[EAO][OAc]	BATA	El análisis composicional después del pretratamiento muestra un 47.8 % glucano, 21.2 % xilano y 11.8 % de lignina.	(Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2022)
[EAO][OAc] y [Emim][OAc]	BATA	La conversión de glucano fue 57.7 % y de xilosa 51.9 % con [EAO][OAc], en el caso del [Emim][OAc] la conversión de glucano fue 47.8 % y de xilosa 88.3 % en la etapa de hidrólisis enzimática.	(Castillo Preciado 2022)
[Ch][Lys], [EAO][OAc] y [Emim][OAc]	BATA	El rendimiento (g AT/g BATA) para [Ch][Lys] fue de 0.57, mientras que en el caso de [EAO][OAc] fue 0.55, por último, para [Emim][OAc] fue de 0.52.	(Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2021)
[Ch][Lys]	BATA	La producción total de azúcares a partir de la sacarificación fue de 32.5 % AT/L, con un rendimiento de 5.4 g AT/g BATA.	(Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2020)
[Emim][OAc]	Aserrín de abeto y roble	El rendimiento de glucosa después de la hidrólisis enzimática fue 49.3 % para el aserrín de abeto y de 59.3 % para el aserrín de roble.	(Alayoubi <i>et al.</i> , 2020)
[Emim][OAc]	BATA	La conversión de glucano fue 89.8 % y de xilosa 83.8 % en la etapa de hidrólisis enzimática.	(Pérez-Pimienta <i>et al.</i> , 2017)
Mezclas de [Emim][OAc] y [Bmim][OAc] con agua	BATA y residuos sólidos municipales	En el caso del bagazo, la conversión de glucano fue 98 % y de xilano del 80 %. Por otra parte, los residuos municipales tuvieron una conversión de glucano del 96.7 %. En ambos casos se utilizó una mezcla de LI con ~40 % de agua.	(Pérez-Pimienta, <i>et al.</i> , 2017)
Bmim][OAc] y [Amim][Cl] [Eucalipto	El rendimiento de glucosa fue del 54.3 % para [Amim][Cl] y del 72.8 % para [Bmim][OAc] después de la sacarificación.	(Xu <i>et al.</i> , 2017)
[EAO][OAc]	Bagazo de caña	El rendimiento fue de 35.5 g de glucosa y 15 g xilosa por cada 100 g de bagazo de caña después de la hidrólisis enzimática.	(Rocha <i>et al.</i> , 2017)
[Bmim][OAc], [Emim][OAc] y [Emim][Cl]	Eucalipto y cedro	El LI más efectivo fue [Emim][OAc] con rendimientos de glucosa de 42.6 % y xilosa de 20.2 % para el eucalipto,	(Yamada <i>et al.</i> , 2017)

mientras que para el cedro fue de 42.1 % y 10.6 % después de la sacarificación, respectivamente.

* [Ch][Lys] - lisinato de colina; [Emim][OAc] - acetato de 1-etil-3-metilimidazolio; [Bmim][OAc] - acetato de 1-butil-3-metilimidazolio; [Amim][Cl] - cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio; [EOA][OAc] – acetato de etanolamina; [Emim][Cl] - cloruro de 1-etil-3-metilimidazolio; AT- azúcares totales.

Los principales inconvenientes para utilizar de forma comercial el pretratamiento con LI son la viscosidad y el costo relativamente alto de hasta 800 USD por Kg (Kumar y Ram, 2021). Por lo cual, se han implementado estrategias para la recuperación y el reciclaje de los LI, por ejemplo, la destilación, la extracción líquido-líquido, la adsorción, la separación de fases inducida, la cristalización y los métodos basados en membranas. Sin embargo, estos mecanismos pueden llegar a tener un alto costo y consumo de energía (Rieland y Love, 2020).

1.3.1 Toxicidad

Otra consideración que se debe tener al utilizar los LI es su relativa toxicidad, la cual se ve afectada por la composición estructural. El aumento de la hidrofobicidad de la cadena lateral y su longitud en el catión aumenta la toxicidad, los LI que contienen grupos alquilo entre 10 y 14 átomos de carbono se han considerado como tóxicos para bacterias y hongos (Pernak *et al.*, 2003; Flieger y Flieger, 2020).

La medición de la toxicidad se puede realizar utilizando la concentración de inhibición media (EC_{50}), este valor representa la concentración efectiva que resulta en una reducción del 50% del crecimiento o la actividad reproductiva de los organismos expuestos en relación con el control (Passino y Smith, 1987). En un estudio realizado por Costa *et al.*, (2015), se evaluó la toxicidad del acetato de 1-etil-3-metilimidazolio [Emim][OAc] en *Vibrio fischeri*, se encontró una EC_{50} de 9.62 ± 2.38 mM después de 30 minutos de incubación. Por otra parte, se ha demostrado que los LI pueden inhibir la actividad enzimática de los microorganismos debido a la acumulación del LI en las membranas celulares (Yu *et al.*, 2016).

La actividad enzimática de las endoglucanasas y β -glucosidasas del hongo *Penicillium oxalicum* HC6 en presencia de [Emim][OAc] fue evaluada por Sun *et al.*, (2018); entre los principales resultados se encontró que ambas enzimas mantuvieron casi el 100% de la actividad enzimática a una concentración de LI del 2.5 % (p/v). Sin embargo, cuando la concentración del [Emim][OAc] se incrementó del 2.5 % al 10.0 % (p/v) la actividad disminuyó al ~ 26.0 %.

Por estos motivos, es necesario realizar un lavado exhaustivo de la biomasa después del pretratamiento para eliminar el LI residual, de esta forma se reduce la inhibición de las enzimas y de los microorganismos en los pasos posteriores de fermentación. Pérez-Pimienta *et al.*, (2013) utilizó 40 mL de agua por gramo de BATA pretratado realizando 5 ciclos de lavado para lograr una concentración de LI en el sobrenadante menor al 0.2 %, esta medida fue realizada por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

1.3.2 Acetato de etanolamina

El acetato de etanolamina [EOA][OAc] es un líquido iónico prótico, los cuales pueden ser sintetizados a partir de una reacción de un paso entre un ácido de Brönsted y una base de Brönsted por medio de un mecanismo simple de intercambio de protones. Por esta razón los LI próticos son considerados más sencillos de producir y menos costosos comparados con los LI apróticos como el [Emim][OAc] (Semerci y Güler, 2018). El costo de producción de [EOA][OAc] puede estar entre los 0.70 y 1.40 USD por Kg (Sun *et al.*, 2017).

Entre los estudios reportados sobre el uso del [EOA][OAc] para el pretratamiento de biomasa lignocelulósicas destaca el realizado por Sun *et al.*, (2017) donde se llevó a cabo el pretratamiento de pasto varilla con [EOA][OAc], obteniendo altos rendimientos de azúcares (57.9 % glucosa y 18.7 % xilosa). Además, se demostró la capacidad del [EOA][OAc] para disolver una alta carga de biomasa, hasta 20 % en peso, durante el pretratamiento.

Asimismo, Pérez-Pimienta *et al.*, (2021) evaluó el efecto del pretratamiento del bagazo de *A. tequilana* con mezclas de [EOA][OAc] y agua; los resultados mostraron que la producción de azúcares (~30 g/L) es muy parecida con LI puro y las mezclas del 90 y el 70 %, solo fue significativamente menor cuando se utilizó al 50 %.

Como se mencionó anteriormente, después del pretratamiento con LI y posteriormente lavados de la biomasa permanece un remanente del LI, por lo cual esta fracción puede llegar al proceso de la digestión anaerobia. El [EOA][OAc] puede ser metabolizado bajo condiciones anaeróbicas mediante la conversión de acetato a través de la ruta acetotrófica en metano y dióxido de carbono (Costa y Leigh, 2014). Por su parte, la etanolamina es un compuesto que generalmente se difunde libremente a través de la membrana, es degradado a acetaldehído y amoníaco por la etanolamina amoníaco liasa. Mientras que el amoníaco puede ser utilizado como fuente de nitrógeno, y el acetaldehído como fuente de carbono, el cual se convierte en acetilCoA por la aldehído oxidoreductasa (Costa y Leigh, 2014).

El acetilCoA se puede utilizar en diversos procesos metabólicos, como el ciclo del ácido tricarbóxico, el ciclo del glioxilato o la biosíntesis de lípidos. Además, puede ser transformado en acetil fosfato por la fosfotransacetilasa y luego por medio de la acetato quinasa en acetato (Kaval y Garsin, 2018), el cual por medio de la ruta acetotrófica es convertido a metano.

1.4 Hidrólisis enzimática

Después del pretratamiento de la materia lignocelulósica como el BATA, es necesario realizar una hidrólisis o sacarificación con el propósito de despolimerizar la hemicelulosa y celulosa en azúcares fermentables (glucosa, arabinosa, galactosa, manosa y xilosa). Este proceso se puede llevar a cabo con tratamientos químicos (hidrólisis ácida) y biológicos (hidrólisis enzimática) (Palomo-Briones *et al.*, 2018).

La hidrólisis enzimática de la celulosa requiere varios tipos de enzimas que actúan en sinergia, las endo-1,4- β glucanasas atacan de forma aleatoria las regiones amorfas de la cadena de celulosa, las celobiohidrolasas (exo-1,4- β glucanasas) que actúan sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas de celulosa liberando celobiosa y las β -glucosidasas que hidrolizan la celobiosa en glucosa. Por otra parte, las enzimas que participan en la sacarificación de la hemicelulosa son las endo-1,4- β -xilanasas y las β -xilosidasas (Huron *et al.*, 2016).

Se han desarrollado complejos enzimáticos comerciales como Cellic CTec y HTec (Novozymes), el cual es una mezcla de celulasas y hemicelulasas, utilizado en diversas materias primas como BATA (Pérez-Pimienta *et al.*, 2022) y bagazo de caña de azúcar (Bhatia *et al.*, 2020). Otro complejo es Viscozyme L (Novozymes), que contiene una mezcla de enzimas obtenidas a partir de *Aspergillus aculeatus*, entre las cuales hay una amplia gama de carbohidrasas, incluidas arabanasa, celulasa, β -glucanasa, hemicelulasa y xilanasas. De igual forma se ha utilizado en BATA (Castillo Preciado 2022), además de residuos de papel (Malgas *et al.*, 2020) y pulpa de manzana (Gama *et al.*, 2015). Finalmente, el complejo de celulasas Celluclast 1.5 L (Novozymes), se obtiene a partir de *Trichoderma reesei*, se ha utilizado en paja de arroz (Sriariyanun *et al.*, 2022), y de caña de azúcar (Barbosa *et al.*, 2020). La dosificación del complejo enzimático dependerá de la materia prima, pretratamiento y las condiciones de procesamiento.

Los hidrolizados enzimáticos de BATA han demostrado ser un sustrato adecuado para la producción de metano por medio de la digestión anaerobia (Arreola Vargas *et al.*, 2016; Pérez-Pimienta *et al.*, 2021). Por lo cual, en el presente trabajo se utilizó como sustrato hidrolizado enzimático de BATA pretratado con [EOA][OAc].

1.5 Digestión anaerobia para la revalorización de residuos tequileros

La digestión anaeróbica es un método de gestión biológica sostenible de desechos orgánicos que puede utilizar diferentes tipos de residuos como alimentarios, municipales o lignocelulósicos como es el caso del BATA, produciendo un biocombustible rico en metano. El proceso de digestión anaerobia se lleva a cabo a través de cuatro etapas sucesivas: hidrólisis, fermentación, acetogénesis y metanogénesis (Figura 5), este proceso depende de las interacciones entre los microorganismos de cada etapa (Manyi Loh *et al.*, 2019).

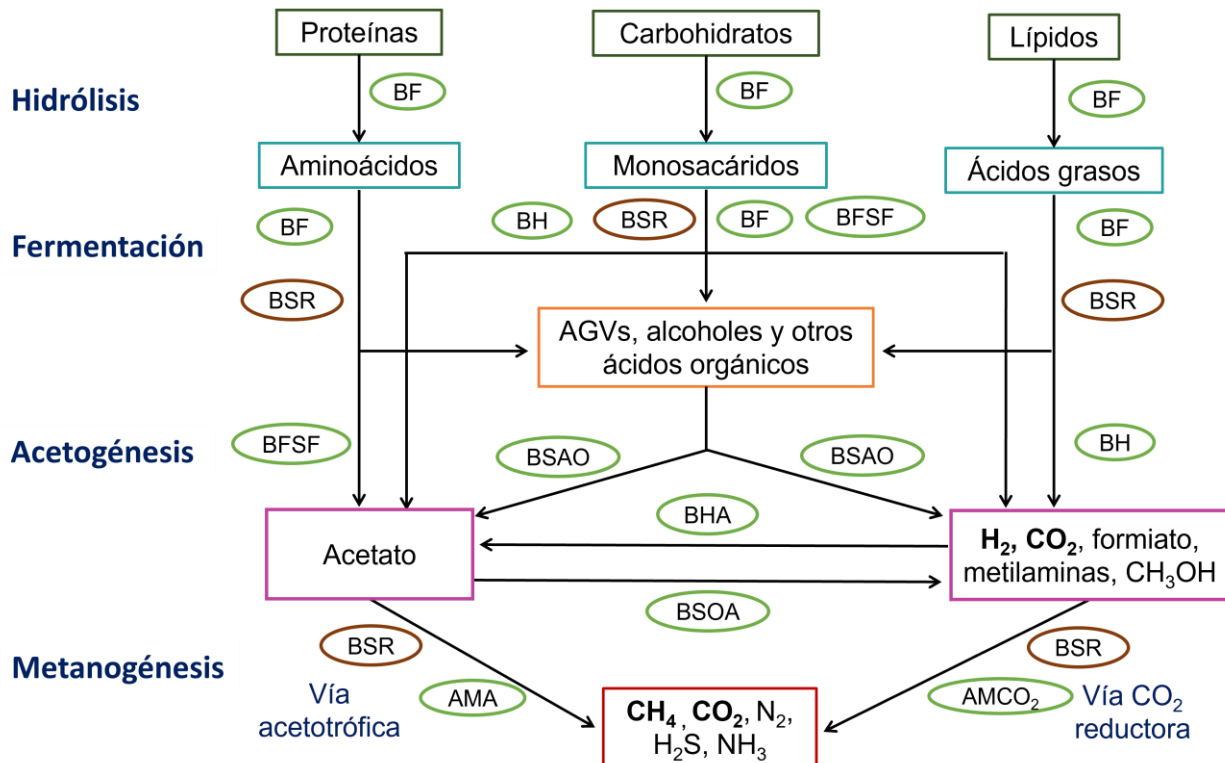


Figura 5. Representación de las rutas metabólicas de la digestión anaerobia. Adaptado de (Li *et al.*, 2019). BF: Bacterias fermentadoras. BFSF: Bacterias fermentadoras sintróficas facultativas. BSAO: Bacterias sintróficas acetógenas obligadas. BH: Bacterias hidrogenogénicas. BSOA: bacterias sintróficas oxidantes de acetato. BHA: bacterias homoacetógenas. AMA: Arqueas metanógenas acetotróficas. AMCO₂: Arqueas metanógenas CO₂-reductoras. BSR: bacterias sulfato reductoras.

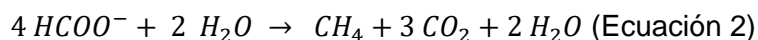
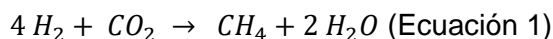
En la hidrólisis las sustancias orgánicas complejas (polisacáridos, proteínas y lípidos) se descomponen en monómeros (monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos respectivamente) por medio de enzimas hidrolíticas extracelulares secretadas por las bacterias fermentadoras (Li *et al.*, 2019). La velocidad de esta etapa se ve afectada por el tamaño de las partículas, el pH, la producción de enzimas, la difusión de las enzimas, la concentración del sustrato y la temperatura (Manyi Loh *et al.*, 2019).

Durante la segunda fase, también conocida como acidogénesis, las bacterias fermentadoras asimilan los productos de la hidrólisis a través de sus membranas celulares para producir ácidos grasos volátiles (AGV) (formiato, acetato, propionato, butirato y valerato) y otros compuestos orgánicos como alcoholes (metanol, etanol), lactato, hidrógeno (H₂) y dióxido de carbono (CO₂). Debido a que las bacterias fermentadoras crecen rápidamente (tiempo de generación menor a 36 horas) pueden causar la acumulación de AGV provocando una caída del pH en el sistema y una inhibición de la utilización de AGV debido a la sobrecarga orgánica y la acumulación de subproductos tóxicos (Venkiteshwaran *et al.*, 2015). En el presente trabajo se utilizó la glucosa como sustrato modelo para la producción de metano por medio de la digestión anaerobia.

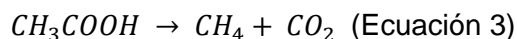
En el proceso de hidrólisis y fermentación, las bacterias más comunes se encuentran en los filos de *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. Los géneros más usuales bajo estos filos se han identificado como *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Paludibacter*, entre otros (Nelson *et al.*, 2011).

Los productos que no pueden ser convertidos directamente en metano por las arqueas metanogénicas como el butirato, propionato, lactato y etanol son degradados durante la acetogénesis a acetato, formiato, H₂ y CO₂ por las bacterias acetógenas sintróficas obligadas. Los acetógenos sintróficos responsables de la degradación del propionato pertenecen a los géneros *Smithella*, *Pelotomaculum* y *Syntrophobacter*, mientras que, la degradación del butirato y los ácidos grasos de cadena larga es realizada por los géneros *Syntrophus*, *Syntrophomonas* y *Syntrophothermus* (Manyi Loh *et al.*, 2019).

Finalmente, el metano es producido por poblaciones metanogénicas del dominio *Archaea* a través de diferentes vías en la etapa de metanogénesis. Por medio de la ruta reductora de dióxido de carbono (CO₂), también conocida como ruta hidrogenotrófica (ecuación 1), el CO₂ es reducido por electrones provenientes del hidrógeno y formiato (ecuación 2), sin embargo, es posible utilizar el formiato 2-propanol y 2-butanol como donadores de electrones. Los organismos CO₂ reductores pertenecen a las órdenes *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales*, *Methanocellales* y *Methanopyrales* (Garcia *et al.*, 2000).

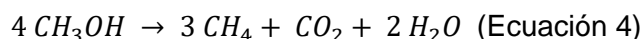


Otra posible vía es mediante la conversión de acetato por la ruta acetotrófica (ecuación 3), que puede ser llevada a cabo por los géneros *Methanosarcina* y *Methanotherix* (sinónimo *Methanosaeta*) (Garcia *et al.*, 2000).



Cabe mencionar, que bajo condiciones de estrés como altas concentraciones de amonio (3 g/L), se puede ocasionar la inhibición de las especies acetotróficas provocando el crecimiento de poblaciones competidores por el acetato, conocidas como bacterias sintróficas oxidantes de acetato (SAOB por sus siglas en inglés). Estas bacterias oxidan el acetato a H₂, CO₂ y formiato, posteriormente estos productos son consumidos por los metanógenos hidrogenotróficos para la generación de metano. Las SAOB conocidas son *Thermacetogenium phaeum*, *Pseudothermotoga lettingae*, *Tepidanaerobacter acetatoxydans*, *Clostridium ultunense* y *Syntrophaceticus schinkii* (Westerholm *et al.*, 2016).

Una tercera vía para la producción de metano es a partir de compuestos metílicos, como metilaminas, metanol (ecuación 4) y dimetilsulfuros conocida como ruta metilotrófica, esta ruta puede ser llevada a cabo por la clase *Methanosarcina* (Garcia *et al.*, 2000).



1.5.1 Sintrofía

La digestión anaerobia es un proceso complejo que depende de la interacción entre las poblaciones microbianas implicadas en cada etapa, las cuales establecen relaciones simbióticas mutualistas y sintróficas entre dos tipos metabólicamente diferentes de bacterias y arqueas, que dependen una de la otra para la degradación de un determinado producto o sustrato, generalmente por razones energéticas (Schink y Stams, 2006). En la digestión anaerobia se han descrito dos tipos de sintrofías, una asociada a la producción y consumo del acetato y otra denominada relación interespecie por el H₂/formiato.

En la sintrofía que involucra al acetato, los productos de la etapa de fermentación (alcoholes y ácidos grasos volátiles) son oxidados a H₂, CO₂, formiato y acetato. Sin embargo, las reacciones acetogénicas son energéticamente desfavorables debido a que el cambio de energía libre estándar de Gibbs, ΔG^0 , es positivo (endergónico). Entonces, solo suceden en la dirección de la acetogénesis cuando se produce una asociación sintrófica entre las poblaciones bacterianas acetogénicas y las arqueas acetótroficas, lo cual ocasiona que la ΔG^0 sea negativa y las reacciones se vuelven exergónicas (Leng *et al.*, 2018). Las reacciones de la asociación sintrófica por la

producción y consumo del acetato se muestran en la Tabla 4, además se mencionan algunas de las bacterias sintróficas oxidadoras de acetato, propionato, butirato, etanol y benzoato.

Tabla 4. Degradación de materia orgánica por asociaciones sintróficas. Adaptado de Kamagata (2015).

Compuesto	Reacción	ΔG^0 (kJ)
Acetato	$CH_3COO^- + 4H_2O \rightarrow 2HCO_3^- + H^+ + 4H_2$	+ 94.9
	$2H_2 + \frac{1}{2}HCO_3^- + \frac{1}{2}H^+ \rightarrow \frac{1}{2}CH_4 + \frac{3}{2}H_2O$	- 131.2
	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	- 36.3
<i>Clostridium ultenense</i> , <i>Thermacetogenium phaeum</i> , <i>Syntrophaceticus schinkii</i> y <i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>		
Butirato	$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+ 48.3
	$2H_2 + \frac{1}{2}HCO_3^- + \frac{1}{2}H^+ \rightarrow \frac{1}{2}CH_4 + \frac{3}{2}H_2O$	- 65.6
	$CH_3CH_2CH_2COO^- + \frac{1}{2}HCO_3^- + \frac{1}{2}H_2O \rightarrow \frac{1}{2}CH_4 + \frac{1}{2}H^+ + 2CH_3COO^-$	- 17.3
<i>Syntrophomonas wolfei</i> , <i>Syntrophospora bryantii</i> , <i>Syntrophothermus lipocalidus</i> y <i>Syntrophus acidotrophicus</i>		
Propionato	$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \rightarrow CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+ + 3H_2$	+ 76.0
	$3H_2 + \frac{3}{4}HCO_3^- + \frac{3}{4}H^+ \rightarrow \frac{3}{4}CH_4 + \frac{9}{4}H_2O$	- 98.4
	$CH_3CH_2COO^- + \frac{3}{4}H_2O \rightarrow \frac{3}{4}CH_4 + CH_3COO^- + \frac{1}{4}HCO_3^- + \frac{1}{4}H^+$	- 22.4
<i>Syntrophobacter wolinii</i> , <i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> , <i>Pelotomaculum thermopropionicum</i> y <i>Smithella propionica</i>		
Etanol	$C_2H_5OH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+ 9.6
	$2H_2 + \frac{1}{2}HCO_3^- + \frac{1}{2}H^+ \rightarrow \frac{1}{2}CH_4 + \frac{3}{2}H_2O$	- 65.6
	$C_2H_5OH + \frac{1}{2}HCO_3^- \rightarrow \frac{1}{2}CH_4 + CH_3COO^- + \frac{1}{2}H_2O + \frac{1}{2}H^+$	- 56.0
<i>Pelobacter venetianus</i> , <i>Pelobacter venetianus</i> y <i>Tepidanaerobacter syntrophicus</i>		
Benzoato	$C_6H_5COO^- + 7H_2O \rightarrow 3CH_3COO^- + 3H^+ + HCO_3^- + 3H_2$	+ 49.5
	$3H_2 + \frac{3}{4}HCO_3^- + \frac{3}{4}H^+ \rightarrow \frac{3}{4}CH_4 + \frac{9}{4}H_2O$	- 98.4
	$C_6H_5COO^- + \frac{19}{4}H_2O \rightarrow \frac{3}{4}CH_4 + 3CH_3COO^- + \frac{9}{4}H^+ + \frac{1}{4}HCO_3^-$	- 48.9
<i>Syntrophus buswellii</i> , <i>Syntrophus gentianae</i> , <i>Sporotomaculum syntrophicum</i> y <i>Pelotomaculum terephthalicum</i>		

En la relación interespecie por el H₂/formiato participan poblaciones bacterianas productoras de H₂/formiato y las arqueas CO₂ reductoras, que asimilan H₂ para mantener una presión parcial de hidrógeno (pH₂) de 10⁻⁴ atm o menor, teniendo como propósito proveer las condiciones termodinámicas apropiadas para la oxidación de los ácidos grasos volátiles. Es importante mencionar, que a pH₂ elevadas se inhibe la reacción óxido-reducción de NADH a NAD⁺, provocando una interrupción en la glucólisis durante la etapa fermentativa, que causaría el colapso de la cadena trófica (Garcia *et al.*, 2000).

1.5.2 Inhibición del proceso

La complejidad de las comunidades microbianas de la digestión anaerobia hace que el proceso sea vulnerable a inhibiciones por la acumulación de ácidos grasos de cadena larga, AGV, amoníaco (NH₃), sulfato y otros compuestos (metales pesados, halogenados alifáticos) o condiciones operativas desfavorables (Lourinho *et al.*, 2020). En el caso del NH₃, éste se produce a través de la descomposición microbiana de proteínas, aminoácidos, ácido úrico y otros compuestos que contienen nitrógeno. El amoníaco, como base, neutraliza los ácidos orgánicos producidos por las bacterias fermentativas y, por lo tanto, ayuda a mantener las condiciones de pH neutro, esenciales para el crecimiento celular. No obstante, puede actuar como inhibidor a determinadas concentraciones (Chen *et al.*, 2014).

El NH₃ puede inhibir a los metanógenos debido a que se difunde pasivamente a través de la membrana celular, causando un desequilibrio de protones y deficiencia de potasio (K⁺). Una fracción de NH₃ que ingresa a las células provoca un cambio de pH intracelular debido a su conversión en amonio (NH₄⁺), mientras se absorben protones en el proceso. Por lo cual, las células deben consumir energía en el equilibrio de protones, utilizando una bomba de K⁺ para mantener el pH intracelular, aumentando así los requisitos de energía de mantenimiento y provocando potencialmente la inhibición de reacciones enzimáticas específicas (Rajagopal *et al.*, 2013). La inhibición por NH₃ ocurre en un amplio rango de concentraciones, debido a las diferencias en la naturaleza de los sustratos, la composición de las comunidades microbianas y las condiciones de operación (temperatura, pH). Sin embargo, McCarty (1964) indicó que cuando la concentración de NH₃ supera los 3 g/L, los procesos de digestión anaerobia se inhiben a cualquier pH. La inhibición del proceso generalmente se indica por la disminución en las tasas de producción de metano en estado estacionario y el aumento en los productos de digestión intermedios como los AGV (Rajagopal *et al.*, 2013).

Por otra parte, cuando el sulfato está presente en altas concentraciones durante el proceso, las bacterias sulfato-reductoras (BSR) pueden acoplar la oxidación de acetato e hidrógeno a la reducción de sulfato, compitiendo así con las arqueas metanogénicas por estos sustratos, afectando la tasa de producción de metano debido a que las BSR tienen una mayor afinidad por estos compuestos y velocidad de crecimiento. Además, la toxicidad del sulfuro de hidrógeno (H_2S) producido durante la sulfatorreducción se difunde a través de las membranas celulares y forma enlaces cruzados de disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, alterando la estructura proteica afectando así la función celular. Entre los principales géneros de BSR se encuentran *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum* (Chen *et al.*, 2014; Amha *et al.*, 2018).

Finalmente, a altas cargas volumétricas aplicadas (CVA) la metanogénesis se ve inhibida debido a que los metanógenos no son capaces de utilizar el H_2 y los AGV tan rápido como son producidos por las bacterias fermentadoras y acetogénicas, ocasionando la acumulación de AGV lo que conlleva al agotamiento de la capacidad amortiguadora y la disminución del pH en el sistema, inhibiendo así las fases de hidrólisis, fermentación y acetogénesis sintrófica. Además, los AGV libres penetran libremente en la membrana celular y dañan las macromoléculas, especialmente en las bacterias grampositivas (Yuan y Zhu, 2016). De acuerdo con Wang *et al.*, (2009) a una concentración de 900 mg/L de propionato existe una inhibición significativa de los metanógenos, para el caso del etanol, ácido acético y ácido butírico a concentraciones de 2400, 2400 y 1800 mg/L respectivamente, no hubo inhibición significativa de la actividad de los metanógenos.

1.6 Dinámicas de poblaciones microbianas

El funcionamiento y la estabilidad de un reactor anaeróbico dependen de la diversidad de la comunidad microbiana para tener vías metabólicas paralelas para cada etapa, la uniformidad de la estructura de la comunidad microbiana con el fin de tener más capacidad para utilizar diversas vías metabólicas y la dinámica de las poblaciones microbianas. Por estos motivos es fundamental comprender la composición y las interacciones del microbioma (Werner *et al.*, 2011). La estabilidad de una comunidad microbiana y los efectos de las perturbaciones ambientales sobre la dinámica poblacional se pueden describir por medio de los conceptos de resistencia donde las poblaciones pueden soportar una perturbación sin cambiar la composición de su comunidad, resiliencia cuando la composición de la comunidad microbiana cambia durante una perturbación y se restablece la composición inicial por adaptación fisiológica o al finalizar la perturbación, y redundancia donde las poblaciones perturbadas pueden ser desplazadas por otras con una función similar en el ecosistema microbiano como un biorreactor (Allison y Martiny, 2008).

Tabla 5. Dinámica de poblaciones microbianas en diferentes procesos mesofílicos de digestión anaerobia, usando como sustratos residuos de la industria tequilera para la producción de metano.

Sustrato	Sistema y condiciones	Resultados	Referencias
Hidrolizados enzimáticos de BATA	CSTR Condiciones mesofílicas. Operado durante 128 días. CVA: 1.7 a 11.7 g-DQO/L•d	Durante CVA bajas (6.7 – 7.3 g-DQO/ L d) las poblaciones dominantes estuvieron representadas por el género <i>Proteiniphilum</i> (abundancia relativa de 39.9 % a 55.8 %) y parientes no cultivables de la familia <i>Lentimicrobiaceae</i> (abundancia relativa de 7.4 % a 10.1 %). Por otra parte, la comunidad de arqueas a CVA de 6.7 g-DQO/L•d fue co-dominada por el metanógeno acetoclástico <i>Methanosaeta</i> y el metanógeno CO ₂ reductor <i>Methanobacterium</i> con abundancia relativa de 58.4 % y 19.4 %, respectivamente.	(López-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2021)
	UASB Condiciones mesofílicas. Operado durante 213 días. CVA: 1.7 a 33.3 g-DQO/L•d	Durante CVA de 8.33 g-DQO/ L d, la comunidad microbiana fue co-dominada por el género <i>Bacteroides</i> (abundancia relativa 20.9 %) cuatro géneros del filo <i>Firmicutes</i> , <i>Ruminiclostridium</i> (19.1 %), <i>Planococcus</i> (14.7 %), <i>Ercella</i> (9.9 %) y grupo <i>Christensenellaceae</i> R-7 (7.7 %). Por otro lado, la comunidad de arqueas fue dominada por el metanógeno CO ₂ reductor <i>Methanocorpusculum</i> con una abundancia relativa mayor al 55 %.	
Vinazas tequileras	FBR Condición mesofílica a termofílica. Operado durante 464 días. CVA: 4.58 a 6.51 g-DQO/L•d	Al finalizar la fase mesofílica los grupos dominantes fueron las bacterias fermentativas (abundancia relativa 39.02 %) siendo <i>Clostridia</i> no cultivable, <i>Clostridium</i> sp. no cultivable, <i>Mesotoga prima</i> , <i>Bacteroides egghertii</i> , y <i>Spirochaeta</i> sp. no cultivable, las especies más representativas. En la etapa termofílica, las bacterias fermentativas tuvieron un 30.62 %, y las fermentadoras sintróficas facultativas un 6.97 % Por otra parte, la comunidad de arqueas al finalizar la fase mesofílica fue dominada por los metanógenos CO ₂ reductores <i>Methanobacterium beijingense</i> , <i>Methanobacterium subterraneum</i> y <i>Methanolinea tarda</i> (69.88 %). En la etapa termofílica, los metanógenos CO ₂ reductores alcanzaron una abundancia relativa de 79.89 % y los metanógenos acetótrofos estrictos un 15.99 %.	(Vázquez Coteró 2021)

Hidrolizados ácidos (ácido clorhídrico) de BATA.	AnSBR Condiciones mesofílicas. Operado durante 50 días. CVA: 4, 8, 12 y 16 g-DQO/L•d	Aumento de la relación interespecie H ₂ /formiato entre las poblaciones activas de la familia <i>Anaerolineaceae</i> y <i>Methanobacterium beijingense</i> y relación interespecie por el acetato entre las poblaciones activas <i>Anaerolineaceae</i> y <i>Methanosaeta concilii</i> .	(Snell Castro <i>et al.</i> , 2019)
Hidrolizados ácidos (ácido sulfúrico) de BATA.	AnSBR Condiciones mesofílicas. Operado durante 110 días.	Aumento del 15 % al 19 % en la abundancia relativa de bacterias reductoras de sulfato, el género <i>Syntrophobacter</i> fue el más abundante en la etapa final. Por otra parte, <i>Methanosaeta</i> disminuyó su abundancia relativa de 28 % a 23 % debido a que <i>Syntrophobacter</i> creció por reducción de sulfato y la oxidación de propionato, por lo cual no se produjo suficiente acetato para ser consumido por <i>Methanosaeta</i> .	(Breton Deval <i>et al.</i> , 2018)
Vinazas tequileras	Dos FBR en un sistema de 2 etapas. Condiciones mesofílicas. Operados durante 335 días CVA: 7.7 a 29 y 2.7 a 12 g-DQO/L•d	La vía acetotrófica fue la principal ruta para la producción de metano a CVAs de 2.7 a 6.8 g-DQO/L•d. Mientras que, la vía de producción de metano CO ₂ reductora se volvió dominante en CVA superiores a 12 g-DQO/L•d.	(Toledo Cervantes <i>et al.</i> , 2018)
Vinazas tequileras	FBR Condiciones mesofílicas. Operado durante 231 días. CVA: 4 a 12.5 g-DQO/L•d	Durante el bioproceso la abundancia relativa de <i>Methanobacterium</i> disminuyó de 64 % a 40 %, mientras tanto la abundancia de <i>Methanosaeta</i> se incrementó de 28 % a 40 %. Durante los días 140 y 231 las bacterias sintróficas dominantes fueron <i>Anaerolineaceae</i> y <i>Syntrophobacter</i> .	(Arreola Vargas <i>et al.</i> , 2018)
Hidrolizados enzimáticos de BATA	AnSBR Condiciones mesofílicas. Operado durante 50 días CVA: 4 y 8 g-DQO/L•d	La comunidad bacteriana fue dominada por <i>Anaerolinea</i> , <i>Enterococcus</i> y <i>Paulidibacter</i> . Por otro lado, la comunidad de arqueas fue dominada en presencia por el metanógeno CO ₂ reductor <i>Methanobacterium</i> con el 80 % de la abundancia relativa. No obstante, en actividad el metanógeno acetotrófico <i>Methanosaeta</i> fue el más dominante con más del 80 %.	(Pintado González 2016)

Vinazas tequileras	CSTR Condiciones mesofílicas. Operado durante 250 días. CVA: 0.7 a 6 g-DQO/L•d	La comunidad bacteriana estuvo representada por los géneros <i>Mesotoga</i> , <i>Syntrophic</i> , <i>Aminiphilus</i> , <i>Clostridium</i> sensu estricto 1 y VadinBC27. En la comunidad arqueana existió una alta redundancia acetotrófica entre las poblaciones de <i>Methanosarcina</i> y <i>Methanosaeta</i> que mantuvieron una alta remoción de DQO. Sin embargo, la ruta CO ₂ reductora realizada por <i>Methanobacterium</i> también fue importante para la producción de metano.	(Macias Moreno, 2019)
--------------------	---	--	--------------------------

*AnSBR– reactor anaerobio de lote secuencial; FBR– reactor de lecho empacado; CSTR– reactor continuo de tanque agitado; UASB- reactor anaerobio con flujo ascendente; DQO– Demanda Química de Oxígeno.

Las diferencias en la estructura de las comunidades microbianas tienen grandes influencias sobre la cantidad y calidad del biogás producido, así como la cinética general del proceso (Manyi Loh *et al.*, 2019). La diversidad microbiana dentro de un digestor depende de diferentes parámetros fisicoquímicos y operacionales que afectan el proceso de digestión anaeróbica, tales como los siguientes:

- pH, una disminución del pH provoca un cambio en las poblaciones microbianas de los metanógenos hacia los acidógenos, debido a que el crecimiento de arqueas metanogénicas se reduce significativamente en condiciones ácidas. Por el contrario, valores de pH superiores a 8.0 impedirán la acidogénesis y reducirán la eficiencia de la digestión. Además, el pH afecta la formación de los iones de AGV y la solubilidad del CO₂ para generar bicarbonatos, principales sustratos de la actividad metanogénica. El pH óptimo debe estar en el rango de 6.5 a 7.5 (Latif *et al.*, 2017).
- Temperatura, influye en el crecimiento microbiano y las tasas del metabolismo, esto afecta la dinámica de las poblaciones microbianas existentes dentro del biodigestor (Manyi Loh *et al.*, 2019). La digestión anaerobia puede llevarse a cabo bajo tres rangos de temperatura: psicrófila (por debajo de 25 °C), mesófila (25 - 45 °C) y termófila (por encima de 45 °C) (Mutungwazi *et al.*, 2021).
- Sustrato, provee las fuentes de energía, el carbono, los elementos inorgánicos y los nutrientes orgánicos necesarios para la formación de nuevas células microbianas, sin embargo, la relación C/N pueden resultar en una alta formación de AGV y amoníaco total, que son dos fuertes inhibidores del proceso de digestión (Gerardi, 2003).
- Carga volumétrica aplicada (CVA), representa la cantidad de materia orgánica alimentada por unidad de volumen y por unidad de tiempo (g-DQO/L•d). Una alta CVA puede alterar el equilibrio entre la hidrólisis-fermentación y la acetogénesis-metanogénesis debido a que favorece la producción de AGV ocasionando la acidificación del proceso (Amani *et al.*, 2010).
- Tiempo de retención hidráulica (TRH), se define como el volumen operacional dividido por el flujo de alimentación. Está asociado a las tasas de crecimiento (μ) de los microorganismos, debido a que si los TRH son cortos es posible que las arqueas y bacterias sean eliminadas del sistema, esto es conocido como lavado en el cual existe una pérdida constante de células (Gerardi, 2003).

1.7 Técnicas biológico-molecular para caracterizar comunidades microbianas

El conocimiento sobre las comunidades microbianas implicadas en la digestión anaeróbica es limitado debido a que son comunidades muy complejas y muestran diversas dinámicas poblacionales en respuesta a las condiciones de operación en los biorreactores. Existen varios métodos para investigar las comunidades microbianas, incluyendo técnicas basadas en cultivos, microscopía convencional, microscopía de epifluorescencia usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), entre otras. Sin embargo, estos métodos siguen siendo inadecuados para determinar la composición completa y la diversidad del microbioma en los digestores anaeróbicos debido a que la mayoría de las bacterias y arqueas no se pueden cultivar fácilmente, por lo tanto, las cepas cultivables no representan con precisión la composición y diversidad de las comunidades microbianas (Hameed *et al.*, 2019).

Por otra parte, la metagenómica ha permitido la identificación de las comunidades presentes (análisis de ADN) y activas (análisis de ARN) tanto a nivel de género como de especie mediante el análisis del gen de ARN ribosomal 16S, este gen se ha elegido como marcador filogenético debido a su presencia universal en las bacterias y arqueas, su función a lo largo del tiempo no ha cambiado por lo cual brinda suficiente información para permitir una comparación estadística, además tiene una longitud de aproximadamente 1500 pb, lo que permite un análisis informático de los resultados, finalmente posee regiones conservadas y variables en alternancia y específicas a cada especie, como son las regiones V3, V4 y V5 (Cabezas *et al.*, 2015).

Este análisis proporciona parámetros microbianos como la diversidad, abundancia y dinámicas poblacionales, que pueden ser correlacionados con las variables fisicoquímicas y operacionales de los procesos de digestión anaerobia usando métodos estadísticos multivariados como el análisis de componentes principales (ACP) para interpretar el desempeño de la comunidad microbiana (Cabezas *et al.*, 2015). Esto ha permitido abordar las relaciones e interacciones que tienen lugar dentro de los ecosistemas microbianos complejos como las comunidades metanogénicas, como el realizado por Snell Castro *et al.*, (2019) en un sistema alimentado con hidrolizados ácidos de BATA, por su parte Zhao *et al.*, (2019) analizó un sistema alimentado con rastrojo de maíz pretratado con un consorcio microbiano y Ho *et al.*, (2014) evaluó los efectos de la temperatura y TRH en la vía acetotrófica, entre otros estudios.

1.7.1 Secuenciación genética masiva

Actualmente en la metagenómica se utiliza la técnica de secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés) desarrollada como una mejora al método de secuenciación genética de Sanger. Illumina es uno de los métodos de NGS más utilizado, se basa en el método de secuenciación por síntesis (SPS) que utiliza nucleótidos marcados con fluoróforos (Cabezas *et al.*, 2015).

La primera etapa es la preparación de la librería, el ADN o el gen 16S ARNr se fragmenta al azar (200 a 600 pb) y se unen secuencias cortas de ADN llamadas "adaptadores" al final de estos fragmentos. Posteriormente, se lleva a cabo la amplificación cíclica reducida que consiste en realizar una amplificación por PCR con cebadores afines a las secuencias de los adaptadores, dando como resultado la adición de la secuencia complementaria al soporte sólido (oligonucleótidos en la celda de flujo), la secuencia del código de barras (índices) y el sitio de unión para el cebador (delantero y reverso) de secuenciación. El siguiente paso es la generación de los clusters, los fragmentos de la librería se unen por complementariedad a la celda de flujo, luego se agregan dNTP sin marcar y la ADN polimerasa para alargar y unir las hebras de ADN adheridas a la celda de flujo. Esto crea "puentes" de ADN de doble cadena entre los cebadores en la superficie de la celda de flujo (Urrea Valencia *et al.*, 2021).

Mediante calentamiento, los puentes de ADN de doble cadena se desnaturalizan en ADN monocatenario, este proceso se repite varias veces generando un clúster de hebras, a este paso se le llama amplificación clonal, el cual deja varios millones de grupos condensados de ADN que se producen en cada canal de flujo. Después se agregan a la celda de flujo un cebador, ADN polimerasa y dNTP terminadores reversibles marcados con fluorescencia (base de nucleótidos que detiene la síntesis de ADN) (Hu *et al.*, 2021; Urrea Valencia *et al.*, 2021)

La ADN polimerasa se une al cebador y agrega el primer terminador marcado con fluorescencia a la nueva hebra de ADN. Una vez que se ha agregado una base, no se pueden agregar más bases a la hebra de ADN debido a que el fluoróforo actúa como un grupo de bloqueo, entonces cada uno de los dNTP marcados tiene una emisión única y, después de cada ronda, la máquina registra qué base se agregó, posteriormente se elimina el fluoróforo y el siguiente dNTP marcado se agrega, de esta forma el proceso continúa hasta que se ha secuenciado por completo la muestra (Hu *et al.*, 2021; Urrea Valencia *et al.*, 2021). Este método ofrece ventajas como mayor sensibilidad para detectar variantes de baja frecuencia, cobertura genómica integral, tiempo de respuesta más rápido para grandes volúmenes de muestra y capacidad de secuenciar de cientos a miles de genes o regiones genéticas simultáneamente (Mutungwazi *et al.*, 2021).

2. Metodología

2.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental que se siguió para conseguir los objetivos planteados en el presente trabajo se presenta en la Figura 6. En la primera etapa, en la prueba preliminar del efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano en un sistema automático de prueba de potencial de metano (AMPTS por sus siglas en inglés) realizada por Castillo Preciado (2022), se recolectó biomasa microbiana durante el máximo flujo de producción para el análisis de las comunidades microbianas.

En la siguiente etapa, se evaluó el efecto del [EAO][OAc] en la digestión anaerobia en un AMPTS con base en un diseño central compuesto, donde los factores fueron la concentración de [EAO][OAc] y glucosa, mientras que la variable de respuesta fue la producción de metano. Una vez determinados los valores óptimos de los factores, se sustituyó la concentración de glucosa por hidrolizados enzimáticos reales de BATA pretratado con [EAO][OAc] y por hidrolizados enzimáticos sintéticos de BATA manteniendo la relación de azúcares totales (AT), el valor óptimo de [EAO][OAc] no se modificó para esta prueba de potencial bioquímico de metano. El diseño de los hidrolizados enzimáticos sintéticos se realizó con base a la caracterización de los hidrolizados enzimáticos reales de BATA, la cual se hizo por medio de la cuantificación de los monosacáridos y AGV mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Por otra parte, la etapa del análisis y caracterización de la comunidad microbiana se realizó mediante la recolección y conservación de biomasa microbiana en las pruebas de potencial bioquímico de metano con los valores óptimos de [EAO][OAc] y sustrato (glucosa, hidrolizado enzimático sintético e hidrolizado enzimático real de BATA). Estas muestras fueron colectadas al inicio (inóculo), durante el máximo flujo de producción de metano para la evaluación de las comunidades activas y al final de las pruebas para el análisis de la dinámica de las poblaciones microbianas todas las muestras de biomasa microbiana fueron sometidas a la extracción de ARN ribosomal y ADN genómico.

Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para correlacionar los parámetros fisicoquímicos asociados al desempeño del proceso con la composición y la dinámica poblacional de la comunidad procariota presente y activa.

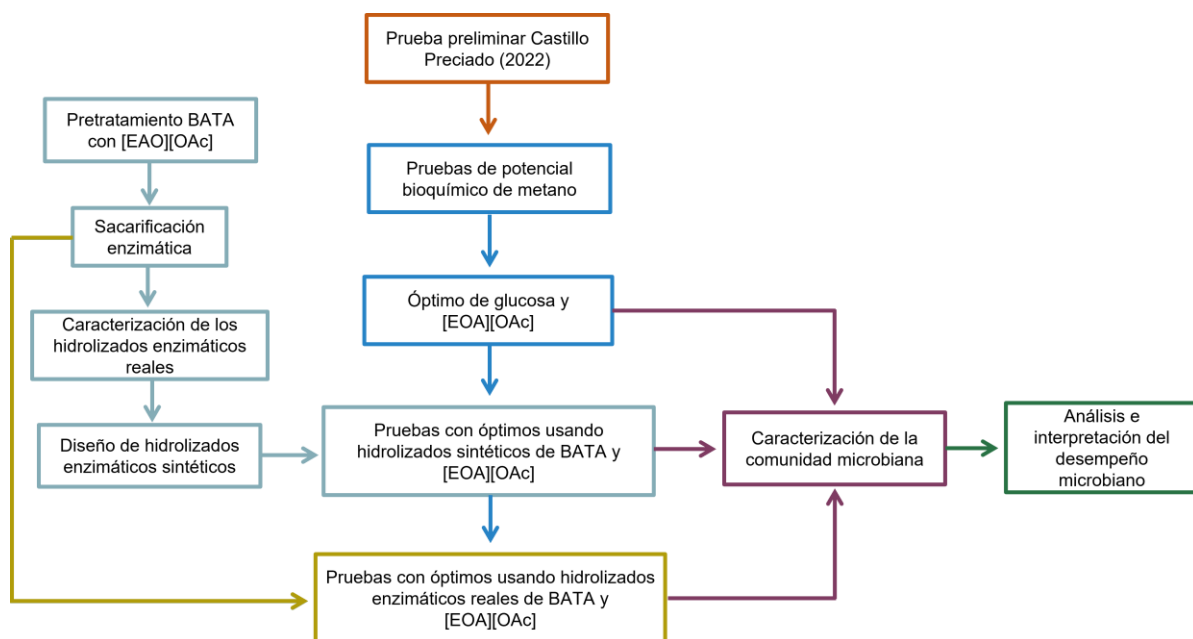


Figura 6. Estrategia experimental desarrollada para la evaluación del efecto del [EOA][OAc] sobre la digestión anaerobia.

2.2 Prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano

El efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano durante la digestión anaerobia fue evaluada por Castillo Preciado (2022) en el equipo AMPTS II utilizando un modelo de composición central. Los factores fueron la concentración de glucosa (g/L) y la concentración del líquido iónico [EOA][OAc] (% p/v), la variable de respuesta fue la producción de metano (NmL). Las muestras seleccionadas para el análisis de las comunidades representan el nivel bajo (2.5 % p/v) y nivel alto (5 % p/v) de [EOA][OAc] con una concentración de 5 g/L de glucosa (nivel bajo) en ambos casos. La elección de dichas condiciones tuvo como fundamento evitar el efecto de la represión catabólica causada por la glucosa y solo observar el efecto de la concentración del [EOA][OAc] sobre el desempeño de bioproceso y la comunidad microbiana. Las muestras de biomasa microbiana fueron procesadas de acuerdo con lo descrito en la sección 2.5 “Análisis de la comunidad microbiana” y analizadas como una prueba preliminar en la sección de resultados y discusión.

2.3 Pruebas de potencial bioquímico de metano

En las pruebas de potencial bioquímico de metano se utilizó como inóculo lodo granular anaerobio proveniente de un reactor anaerobio con flujo ascendente (UASB, por sus siglas en

inglés) de la empresa tequilera Casa Herradura (Amatitán, Jalisco, México), que trata vinazas tequileras, este lodo tenía 0.1268 g sólidos totales/g sólido húmedo (gST/gSH) y 0.1125 g sólidos volátiles/g sólido húmedo (gSV/gSH).

Los experimentos se llevaron a cabo en el sistema AMPTS que consta de 15 reactores en lote agitados mecánicamente con un volumen de trabajo de 360 mL y una concentración de inóculo de 10 g SV/L. Previamente a la prueba de potencial de metano con [EAO][OAc] se realizó dos reactivaciones al inóculo con 5 g/L de glucosa. Además, se adicionó en todas las pruebas el medio mineral descrito en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición del medio mineral utilizado para las pruebas de potencial bioquímico de metano.

Sustrato	g/L
NH ₄ Cl	1.00
CaCl ₂ · H ₂ O	0.05
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.10
NaCl	0.10
KH ₂ PO · H ₂ O	0.40

Las condiciones de operación de todos los experimentos se muestran en la Tabla 7, durante las corridas experimentales, el volumen de gas acumulado en tiempo real se registró automáticamente por el equipo AMPTS. Por otro lado, se cuantificaron los monosacáridos, azúcares totales (AT), AGV iniciales y finales mediante HPLC, además de la medición de DQO inicial y final.

Tabla 7. Condiciones de operación de las pruebas de potencial bioquímico de metano.

Parámetro	Valor
Volumen de trabajo	360 mL
Velocidad de agitación	150 rpm
Temperatura	37 °C
pH	Sin control
Concentración del sustrato	Variable
Concentración del inóculo	10 g SV/L
Relación sustrato-inóculo	Variable

2.3.1 Optimización de la concentración del sustrato modelo (glucosa) y [EAO][OAc] para maximizar la producción de metano

La evaluación del efecto del [EAO][OAc] en la producción de metano durante la digestión anaerobia se llevó a cabo empleando un diseño 2^K con 5 puntos centrales, donde los factores fueron la concentración de glucosa (g/L) como sustrato modelo y la concentración del líquido iónico [EAO][OAc] (% p/v), la variable de respuesta fue la producción de metano (NmL). La elección del intervalo de concentraciones de los factores fue con base en los resultados obtenidos por Castillo Preciado (2022), donde se observó que la mayor producción de metano fue con 5 g/L de glucosa y 2.5 % p/v de [EAO][OAc].

La optimización de la producción de metano se realizó partiendo del modelo 2^K después de confirmar que la falta de ajuste de este modelo fue significativa, entonces se procedió a elaborar un diseño de composición central con 4 puntos axiales, los valores codificados del diseño se presentan en la Tabla 8. El análisis de los datos y generación de la metodología de superficie de respuesta se realizó con el software Statgraphics Centurion XV.

Tabla 8. Valores codificados de los factores para el diseño de composición central.

Factores	Valores codificados				
	- 1.4142	- 1	0	+ 1	+ 1.4142
Glucosa (g/L)	2.1716	3	5	7	7.8284
[EAO][OAc] (% p/v)	1.0858	1.5	2.5	3.5	3.9142

En los puntos óptimos se recolectó muestras de biomasa microbiana de 30 mL del inóculo, durante el máximo flujo de producción de metano para la evaluación de las comunidades activas y al final de las pruebas con el propósito de analizar la dinámica de las poblaciones microbianas durante el proceso.

2.3.1.1 Síntesis y caracterización del [EAO][OAc]

El [EAO][OAc] se sintetizó en un reactor de vidrio empleando una reacción de neutralización ácido-base, utilizando monoetanolamina (99.5 %) y ácido acético glacial (99.7 %) de acuerdo con el procedimiento descrito previamente por Álvarez *et al.*, (2010). La confirmación de la síntesis del LI se realizó por Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) en un equipo Nicolet iS50 FT-IR. Los espectros se obtuvieron con un

promedio de 32 barridos en el rango entre 400 cm⁻¹ y 4000 cm⁻¹ y una resolución espectral de 4 cm⁻¹, utilizando aire como fondo.

2.3.2 Obtención de hidrolizados enzimáticos reales de BATA pretratado con [EOA][OAc]

2.3.2.1 Pretratamiento del BATA con [EOA][OAc]

Se realizó una mezcla del BATA con el líquido iónico [EOA][OAc] para obtener una solución con una carga de sólidos al 20 %, a continuación, las muestras se calentaron en un horno a 160 °C por 90 minutos de acuerdo con Pérez-Pimienta *et al.*, (2021). Posteriormente se realizaron 5 lavados con agua destilada para eliminar el LI residual, se utilizó una relación de 40 mL de agua destilada por 1 g de BATA pretratado. Finalmente, el bagazo se secó en un horno de convección a 45 °C por dos días.

2.3.2.2 Sacarificación enzimática

La hidrólisis enzimática del bagazo pretratado con [EOA][OAc] se realizó utilizando una carga de sólidos del 11.5 % en una solución amortiguadora de citrato 50 mM (pH 4.26) (Anexo A). Se empleó la mezcla de enzimas comerciales Celluclast 1.5 L (1.86 mg proteína/mL buffer) – Viscozyme L (0.76 mg proteína/mL buffer), las condiciones de reacción fueron de 40 °C durante 72 h en una incubadora rotatoria (Castillo Preciado, 2022).

2.3.2.3 Diseño de hidrolizados sintéticos de BATA

La composición de los hidrolizados enzimáticos reales obtenidos se determinó realizando la cuantificación de hexosas, pentosas, azúcares totales (AT), ácidos grasos volátiles (AGV) y demanda química de oxígeno (DQO). Esta caracterización se utilizó para el diseño y elaboración de los hidrolizados enzimáticos sintéticos utilizados en las pruebas de la sección 2.3.3.1. La composición de los hidrolizados enzimáticos sintéticos de BATA se muestran en la sección 3.5 de resultados en la tabla #.

2.3.3 Pruebas de potencial bioquímico de metano con valores óptimos utilizando hidrolizados enzimáticos reales de BATA pretratado con [EOA][OAc]

En la última etapa se utilizó el hidrolizado enzimático real de BATA pretratado con [EOA][OAc] con el propósito de evaluar el efecto del [EOA][OAc] sobre la producción de metano en un medio complejo (cantidad y variedad de monosacáridos).

La concentración utilizada de los hidrolizados enzimáticos reales fue de acuerdo con el punto óptimo de glucosa encontrado en la sección 2.3.1, se sustituyó esta concentración manteniendo la relación de concentración de azúcares totales (AT), en tanto que, el punto óptimo (concentración óptima) del [EOA][OAc] no fue modificado. Se recolectaron muestras de biomasa microbiana al inicio, durante el máximo flujo de producción de metano y al final de la prueba.

2.3.3.1 Pruebas de potencial bioquímico de metano con valores óptimos utilizando hidrolizados de BATA sintéticos y [EOA][OAc]

En base al punto óptimo de concentración de glucosa obtenido en la sección 2.3.1 se sustituyó esta concentración por hidrolizados de BATA sintético manteniendo la relación de concentración de AT, mientras que, el punto óptimo (concentración óptima) de [EOA][OAc] no fue modificado.

El propósito de la prueba usando como sustrato los hidrolizados enzimáticos sintéticos de BATA fue evaluar el efecto del acetato de etanolamina en el proceso de digestión anaerobia (producción de metano) usando un sustrato que asemeja la composición de estos hidrolizados enzimáticos de BATA debido a la complejidad para producirlos. Asimismo, se recolectaron muestras de biomasa microbiana durante el inicio, máxima producción de metano y al finalizar la prueba para el análisis de las comunidades microbianas.

Finalmente, para la evaluación de la producción de metano con los diferentes sustratos (glucosa, hidrolizados enzimáticos sintéticos e hidrolizados enzimáticos real de BATA) en presencia del [EAO][OAc] se realizó una prueba estadística t de Student utilizando el software Statgraphics Centurion XV.

2.4 Métodos analíticos

El análisis composicional de carbohidratos y lignina del BATA antes y después del pretratamiento, se determinó utilizando el protocolo NREL/TP-510-42618 del Laboratorio Nacional de Energía Renovable de los Estados Unidos de América (NREL). El procedimiento consistió en una hidrólisis ácida tomando 300 mg de biomasa seca, a los cuales se les añadió 3 mL de H₂SO₄ al 72 %, después se incubó por 1.5 h a 30 °C con agitación cada 10 minutos usando una varilla de vidrio. Posteriormente, se diluyó la concentración del ácido hasta el 4 % añadiendo 84 mL de agua destilada para llevar a cabo otra hidrólisis en una autoclave a 121 °C durante 1 h. Finalmente, el hidrolizado ácido se filtró al vacío en crisoles con fondo poroso para ser secados por 12 h a 105 °C, la cantidad de lignina insoluble en ácido se determinó por gravimetría con los sólidos remanentes después del secado. El porcentaje de glucano y xilano se obtuvo midiendo la concentración de glucosa y xilosa del hidrolizado ácido por HPLC en un cromatógrafo Agilent Technologies Waters e2695 equipado con una columna Aminex HPX-87H de Bio-Rad.

La caracterización de los hidrolizados enzimáticos reales se realizó mediante la cuantificación de azúcares totales (AT) (azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados) empleando el método colorimétrico de DuBois *et al.*, (1956). Por otra parte, los monosacáridos como las hexosas (manosa y glucosa) y pentosas (xilosa y arabinosa) se cuantificaron en HPLC en el cromatógrafo antes mencionado equipado con una columna Aminex HPX-87P de Bio-Rad.

La demanda química de oxígeno (DQO) se determinó utilizando el método estandarizado de APHA 5220, usando el kit TNT 822 plus HACH en un digestor DRB200 y un espectrofotómetro DR2800. Finalmente, las concentraciones iniciales y finales de AGV (acetato, formiato, propionato, butirato, valerato e isovalerato) y lactato del proceso de la prueba de potencial de metano, así como de los hidrolizados enzimáticos reales, se midieron por HPLC en el cromatógrafo citado con la columna Aminex HPX-87H de Bio-Rad.

2.5 Análisis de la comunidad microbiana

2.5.1 Conservación de biomasa microbiana

Las muestras de biomasa microbiana recolectadas (30 mL) durante las pruebas de potencial bioquímico de metano se centrifugaron a 10,000 rpm (11,200 g) por 10 minutos para remover el sobrenadante. La biomasa microbiana se conservó añadiendo 4 mL de 4 M tiocianato de guanidina 0.1 M Tris-HCl (pH 7.55) y 600 µL de N-lauril-sarcosina (10 %), para las muestras

suspendida en medios sin LI. Mientras que, las muestras con LI fueron sometidas a un lavado con buffer fosfato salino (PBS) 1X previo a la conservación. Todas las muestras se conservaron en alícuotas de 500 μ L y se almacenaron a - 20 °C para las extracciones de ARN ribosomal (ARNr) y ADN genómico (ADNg) (Anexo B).

2.5.2 Extracción de ADN genómico

Las muestras para la extracción de ADN se procesaron siguiendo el procedimiento modificado de Godon *et al.*, (1997). Las muestras fueron incubadas en un baño seco por una hora a 70 °C con 500 μ L N-lauril-sarcosina 5 %, posteriormente se realizó la lisis celular con 500 μ L perlas de zirconio de 0.1 mm de diámetro en un rompedor de células BeadBug. Luego del lisado, se agregaron 15 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) para la eliminación de ácidos húmicos, los cuales son inhibidores de la ADN polimerasa. La muestra se centrifugó para recuperar el sobrenadante, después se realizaron dos lavados al sedimento para recuperar el ADN añadiendo 500 μ L de TENP (solución de TRIS-Cl, EDTA, NaCl y PVPP). En seguida, se precipitó el ADN añadiendo un volumen de 600 a 700 mL de isopropanol a la muestra, posteriormente se centrifugó por 15 min a 14,500 rpm (14,120 g) para recuperar el sedimento. La degradación del ARN contaminante se realizó por medio de la enzima ARNasa pancreática bovina (Sigma-Aldrich) incubando la muestra en un baño seco durante 30 minutos a 37 °C. El ADN obtenido se purificó mediante el Kit QIAamp DNA de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN extraído fueron conservadas a - 80 °C (Anexo C).

Se verificó la calidad del ADNg extraído por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % (p/v) para estimar la talla, que debe ser cercano a 20 kb, además se cuantificó la pureza y concentración en un espectrofotómetro BioPhotometer D30 (Eppendorf), midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. La pureza del ADN se considera adecuada cuando la relación A260/A280 está entre 1.7 y 2.0.

2.5.3 Extracción de ARN ribosomal

Las muestras conservadas para la extracción de ARNr se procesaron añadiendo 500 μ L de buffer fosfato salino (PBS) 1X disuelto en agua ultrapura con dietil pirocarbonato (DEPC por sus siglas en inglés) al 0.1 % y 200 μ L de perlas de zirconio de 0.1 mm de diámetro. Esta mezcla se agitó a máxima velocidad durante 3 minutos en un rompedor de células BeadBug. Posteriormente, la muestra se colocó en hielo durante 5 minutos, se volvió a agitar en las mismas condiciones y se recuperó el ARN mediante centrifugación a 12,000 rpm (9,670 g)

durante 3 minutos. Luego de la recuperación del ARN en el sobrenadante, se añadió 200 μL del buffer RLT del kit RNeasy Mini de QIAGEN y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Este buffer es una solución de lisis celular, que permitió terminar con la extracción del material genético. Posteriormente se procedió a la precipitación del ARN mediante la adición de 700 μL de etanol al 70 %. Esta mezcla se utilizó para la purificación de ARN utilizando el kit RNeasy Mini de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo D).

Previamente a la degradación de ADN contaminante y síntesis de ADN complementario (ADNc), se evaluó la calidad del ARN extraído mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa desnaturalizante al 1.5 % (p/v) que contenía 0.75 g de agarosa, 750 μL de hipoclorito de sodio (marca comercial "CLORALEX Aroma Floral") y 50 mL (1X) Tris-borato EDTA (TBE) disuelto en agua ultrapura con DEPC al 0.1 %. En estos geles se deben observar dos fracciones, una que pesa aproximadamente 2.5 kb del ARN ribosomal 23S y una segunda fracción correspondiente al 16S de talla 1.5 kb (Anexo E).

2.5.4 Degradación del ADN contaminante

Después de la extracción de ARNr, es necesario realizar la degradación del ADN genómico contaminante, esto se realizó por medio de la enzima RQ1 RNase-Free DNase (Promega).

El procedimiento consistió en mezclar 2 μL del ARN extraído con 6 μL de la enzima RQ1 RNase-Free DNase y 8 μL de RQ1 DNase Reaction Buffer 10X, para posteriormente ser incubado en un baño seco a 37 °C por 30 minutos. Al finalizar la incubación se agregaron a la muestra 2 μL de RQ1 DNase Stop Solution y se incubó durante 10 minutos a 65 °C en el termociclador Veriti para inactivar la enzima. Las muestras de ARN libre de ADN contaminante (ARN-P) se almacenaron a – 20 °C hasta su utilización para la síntesis de ADN complementario (Anexo F).

La verificación de la degradación de ADN contaminante se realizó por medio de una PCR de los genes de ARNr 16S para el dominio *Bacteria*. La secuencia del primer delantero utilizado fue 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' mientras que la secuencia del primer reverso fue 5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3' (Nadkarni *et al.*, 2002).

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis sobre un gel de agarosa al 1.5 %. El resultado de la PCR debe ser negativo para las muestras, confirmando la degradación del ADN contaminante. Por otro lado, el resultado del control debe ser positivo (Anexo G).

2.5.5 Síntesis de ADN complementario

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó mediante una reacción de retrotranscripción con el kit comercial GoScript Reverse Transcription System (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo H). Inicialmente, se realizó la mezcla 1 conformada por random primers y el ARN libre de ADN contaminante (ARN-P), dicha mezcla se incubó por 5 minutos a 70 °C; posteriormente, la mezcla 1 se sumergió en hielo por 5 minutos. Al finalizar el periodo de tiempo, se agregó la mezcla 2 conformada por agua grado PCR, GoScript Buffer 5X, MgCl₂, mezcla de nucleótidos, RNasin ribonucleasa y la enzima GoScript Reverse Transcriptase.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en el termociclador Veriti mediante tres fases:

- Fase de alineamiento, 25 °C por 5 minutos.
- Fase de elongación, 42 °C por 60 minutos.
- Fase de inactivación, 70 °C por 15 minutos.

La integridad del ADNc obtenido se verificó mediante un resultado positivo en la amplificación por PCR de los genes del ARNr 16S para el dominio *Bacteria*. Además, se cuantificó la pureza y concentración en un espectrofotómetro BioPhotometer D30 (Eppendorf), midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Finalmente, las muestras de ADNc se almacenaron a -80 °C.

2.5.6 Secuenciación genética masiva

Las muestras de ADNg y ADNc se procesaron en el servicio de secuenciación del Laboratorio de Biotecnología Ambiental (INRAE-Transfert Environment), en Narbonne, Francia, donde se realizó la secuenciación genética masiva y análisis filogenéticos de las muestras usando la región variante V4 y V5 del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas utilizando primers universales, la secuencia del primer delantero fue 5'- GTGYCAGCMGCCGCGGTA-3' mientras que la secuencia del primer reverso fue 5'-ACTYAAAKGAATTGRCGGGG-3' (Wang y Qian, 2009), la secuenciación se realizó en un secuenciador MiSeq (Illumina). Posteriormente, el procesamiento de las secuencias fue realizado utilizando un pipeline informático desarrollado por el INRAE que opera con Mothur (versión 1.44.0).

Los códigos de barras, cebadores, secuencias con homopolímeros de más de 8 pb, así como las quimeras, se eliminaron de los archivos de secuencia durante los pasos de filtrado. Las secuencias con 100% de homología entre ellas se agruparon en secuencias únicas, luego en unidades taxonómicas operativas (OTU por sus siglas en inglés).

2.5.7 Análisis filogenético

Los datos de la secuenciación genética obtenidos fueron procesados para el análisis filogenético y la identificación a nivel de género de acuerdo con la taxonomía de Greengenes para los dominios *Bacteria* y *Archaea* utilizando el servicio de INRAE. A continuación, se realizó la identificación filogenética a nivel de especie de los OTUs dominantes con una abundancia relativa $\geq 1\%$, comparando los OTUs con sus parientes filogenéticos más cercanos usando la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). Finalmente, se realizó un alineamiento de secuencias parciales del gen ARNr 16S usando el algoritmo MUSCLE en el software MEGA 11, para posteriormente incorporarlos en matrices de distancia aplicando el algoritmo de Jukes-Cantor con 1000 bootstrap, con lo cual son agrupados estrechamente con las secuencias relacionadas. Se consideró que un OTU pertenece a una especie conocida cuando la similitud entre las secuencias fue $\geq 97\%$.

2.5.8 Análisis de componentes principales

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el objetivo de correlacionar el rendimiento del digestor (parámetros fisicoquímicos y operacionales) con la composición y la dinámica poblacional de la comunidad procariota presente y activa utilizando el software Statgraphics Centurion XV.

3. Resultados y discusión

Los resultados están comprendidos de un estudio preliminar sobre el efecto del compuesto [EOA][OAc] en la producción de metano durante la digestión anaerobia. Para ello se evaluaron diferentes concentraciones de [EOA][OAc] (2.5 y 5 % p/v), se recolectaron muestras de biomasa microbiana para analizar las comunidades activas y presentes en el sistema.

Posteriormente, se presenta la optimización de la producción de metano con un diseño de composición central teniendo como factores la concentración de glucosa y [EAO][OAc]. Finalmente, se muestra la comparación del desempeño de la digestión anaerobia con diferentes sustratos glucosa, hidrolizados enzimáticos e hidrolizados enzimáticos sintéticos con [EAO][OAc] utilizando los puntos óptimos encontrados, además de presentar el estudio de las comunidades microbianas en estas condiciones.

3.1 Prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano

La diversidad, abundancia y dinámica de las poblaciones microbianas presentes durante la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano se evaluó mediante la extracción de ADN genómico (B:LI-D, A:LI-D y H1:D) y ARN ribosomal (B:LI-R, A:LI-R y H1:R) (Tabla 9).

Tabla 9. Claves asignadas al ADN genómico y ARN ribosomal extraídos de las muestras recolectadas para el análisis de las comunidades microbianas de la prueba preliminar del efecto del [EAO][OAc].

Clave	Descripción de la muestra
B-LI	Máximo flujo de producción de metano en la digestión anaerobia con 5 g/L glucosa y 2.5 % p/v [EAO][OAc]. Clave BIOMOL B2.
A:LI	Máximo flujo de producción de metano en la digestión anaerobia con 5 g/L glucosa y 5 % p/v [EAO][OAc]. Clave BIOMOL B4.
H1	Inóculo del lodo anaerobio

3.1.1 Desempeño de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano

Los resultados fisicoquímicos obtenidos durante la operación de los reactores se presentan en la Tabla 10. La condición B-LI alcanzó una producción de 2.334 L de metano, teniendo un

consumo del acetato inicial proveniente del [EAO][OAc], sin embargo, esto no sucede en la condición A:LI, no obstante, ambas condiciones tuvieron un consumo total de la glucosa durante el proceso.

Por otra parte, las concentraciones finales de AGV no resultaron inhibitorias para el proceso, se ha reportado que a concentraciones mayores de 0.9 g/L de propionato y 1.8 g/L de butirato los metanógenos son inhibidos (Wang *et al.*, 2009), no obstante, se observa a través de la acumulación de estos AGV una posible tendencia en la cual la ruta sintrófica obligada por el acetato pueda colapsar.

Tabla 10. Resultados fisicoquímicos de las condiciones B:LI y A:LI durante el proceso de digestión anaerobia para la producción de metano.

	B:LI	A:LI
Condiciones de operación		
Duración del ciclo (días)	16	9
Glucosa removida (g/L)	5	5
Rendimiento del reactor		
Volumen de metano acumulado (L)	2.334	0.904
VVPM (L CH ₄ /L d)	0.41	0.28
Ácidos grasos volátiles (g/L)		
Acetato	8.245 – 4.139	14.152 – 14.184
Propionato	ND – 0.602	ND – 0.827
Butirato	ND – 0.945	ND – 0.370

ND - No detectado. VVPM - Velocidad volumétrica de producción de metano. B:LI- 5 g/L glucosa con 2.5 % p/v [EAO]OAc, A:LI - 5 g/L glucosa con 5 % p/v [EAO]OAc]

3.1.2 Estudio de la comunidad microbiana de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano

3.1.2.1 Corroboración de extracción de ADN y ARN

La diversidad, abundancia y dinámica de las poblaciones microbianas durante el bioproceso se evaluó inicialmente mediante la extracción de ADN. La integridad del ADN extraído de las muestras B:LI-D, A:LI-D y H1:D, se verificó por medio de electroforesis obteniendo una banda de aproximadamente 20 kb como se muestra en la Figura 7.



Figura 7. Visualización del ADN extraído de las muestras B:LI-D, A:LI-D y H1-D en un gel de agarosa al 0.7 % usando el colorante SYBR Safe. M - Marcador Fago Lambda/*HindIII*

La pureza y la concentración del ADN extraído de las muestras (B:LI-D, A:LI-D y H1-D) se realizó mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, los resultados se muestran en la Tabla 11. La relación entre las medidas a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}) nos proporciona un estimado de la pureza, un valor de 1.8 a 2.0 se considera con pureza óptima, por lo cual todas las muestras de ADN cumplieron con el criterio propuesto.

Tabla 11. Concentración y pureza del ADN extraído de las muestras B:LI-D, A:LI-D y H1-D

Clave de la muestra	ng/ μ L	A_{260}/A_{280}
B:LI-D	114	1.80
A:LI-D	144	1.80
H1-D	77	1.85

La caracterización de las poblaciones activas de *Archaea* y *Bacteria* se realizó por medio del análisis del ARN extraído. Posteriormente a la extracción se verificó la calidad del ARN por medio de electroforesis, en la Figura 8 se muestra el gel de calidad para las muestras B:LI-R, A:LI-R y H1-R donde se observaron dos bandas que corresponden al ARNr 23S y 16S, confirmando así la extracción del ARNr.

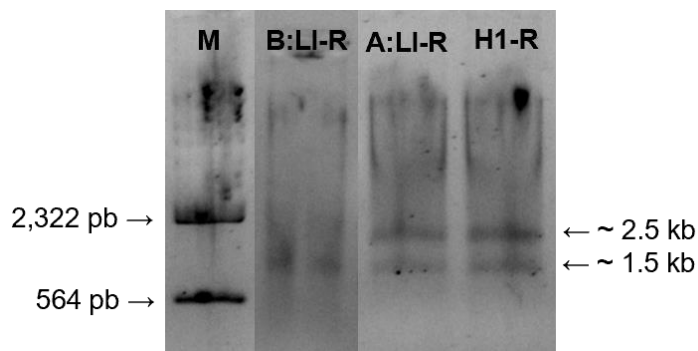


Figura 8. Gel de calidad de la extracción de ARN ribosomal de las muestras B:LI-R, A:LI-R y H1-R en un gel de agarosa al 1.5 % con 1.5 % de cloro comercial usando el colorante SYBR Gold. M - Marcador Fago Lambda/*HindIII*.

Debido a la inestabilidad del ARNr, se realizó una retrotranscripción para obtener ADNc, la integridad del ADNc obtenido de las muestras B:LI-R, A:LI-R y H1-R se verificó mediante un resultado positivo en la amplificación por PCR de los genes del ARNr 16S para el dominio *Bacteria*, obteniendo una banda de aproximadamente 500 pares de bases (pb) como en las muestras A:LI-R y H1-R, no obstante, en la muestra B:LI-R y una repetición de A:LI-R el tamaño de banda es ligeramente inferior al esperado posiblemente a que amplificó una fracción más pequeña del segmento o la migración electroforética fue afectada por algún factor desconocido, aun así se consideró como un resultado positivo de la reacción de síntesis de ADNc al tener una variación de ~ 100 pb (Figura 9). Además, se utilizó un control positivo (CP) para verificar la reacción de PCR y un control negativo (CN).

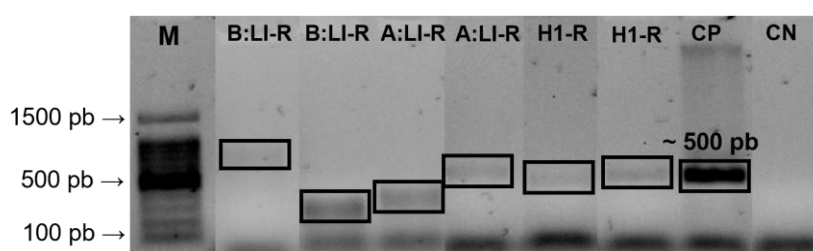


Figura 9. Imagen de los geles de verificación de la síntesis de ADNc ensamblados para visualizar los productos de la PCR aplicada al ADNc de las muestras B:LI-R, A:LI-R y H1-R en un gel de agarosa al 1.5 % usando el colorante SYBR Safe. M – Marcador de 100 pb. CP – Control positivo, muestra de ADN genómico. CN – Control negativo de la reacción de síntesis de ADNc. El recuadro indica la banda del amplicón.

De igual forma se cuantificó la concentración y pureza del ADNc de las muestras B:LI-R, A:LI-R y H1-R (Tabla 12). Cabe señalar que la pureza (A260/A280) dio un resultado bajo debido probablemente a la presencia de la enzima retrotranscriptasa (GoScript Reverse Transcriptase) utilizada en la síntesis del ADNc, además de las sales del buffer (GoScript Buffer) de la reacción, los cuales interfieren con la medición. Por esta misma razón, la concentración de las muestras tiene un valor alto, considerándose aceptable. La pureza en el ADNc no es relevante para realizar la secuenciación genética masiva, pero la concentración si es importante para evidenciar su síntesis exitosa.

Tabla 12. Concentración y pureza del ADNc de las muestras B:LI-R, A:LI-R y H1-R

Clave de la muestra	ng/μL	A260/280
B:LI-D	1075	1.50
A:LI-D	1187	1.54
H1-R	1997	1.58

3.1.2.2 Diversidad microbiana de los dominios *Archaea* y *Bacteria*

El comportamiento de la diversidad y riqueza de las poblaciones microbianas fueron obtenidos mediante secuenciación genética masiva a través de los índices de diversidad (Tabla 13). Las secuencias totales en presencia tanto para el dominio *Bacteria* como en *Archaea*, los valores obtenidos son muy parecidos entre sí, sin embargo, en actividad específicamente en *Bacteria* la muestra B:LI-R tiene entre un ~ 35 y 40 % menos secuencias totales comparada con el resto de las muestras de actividad, esto debido posiblemente a que durante la síntesis de ADNc el amplicón generado fue menor a 500 pb o al no obtener una banda definida en la verificación (Figura 9). Este mismo efecto se puede ver en el número de OTUs, el cual fue considerable menor en la muestra B:LI-R comparada con el resto en el dominio *Bacteria*.

Los índices de diversidad permiten dar un panorama de la estructura de la comunidad microbiana según criterios de riqueza y diversidad. Primeramente, el índice de Shannon-Weaver (H) es un estimador de la diversidad de las especies y su uniformidad, por lo tanto, el valor aumenta a medida que aumenta el número de especies y a medida que la distribución de individuos entre las especies se iguala (Kim *et al.*, 2017). Comparado con el inóculo, ambas condiciones disminuyeron en el valor del índice, sin embargo, respecto a la presencia la condición A:LI-D fue la más afectada esto posiblemente debido a la alta cantidad de [EAO][OAc] en el medio de cultivo, por lo cual no permitió la proliferación adecuada de ciertas comunidades, por otro lado, respecto a la actividad la condición más afectada fue B:LI-R con la comunidad *Bacteria*.

Adicionalmente, el índice de diversidad estimador de cobertura basado en abundancia (ACE, por las siglas en inglés) nos indica la riqueza de la comunidad microbiana, por tanto, un valor más alto representa un mayor número de poblaciones microbianas en la muestra. En cuanto a presencia (ADN) existió una disminución del índice ACE tanto para *Bacteria* como para *Archaea* del inóculo a las condiciones B:LI-D y A:LI-D, siendo más afectada esta última posiblemente a la alta cantidad de acetato presente debido al [EAO][OAc], por lo cual especies más sensibles como los acetógenos sintróficos obligados disminuyeron su abundancia o no permitieron su proliferación. Este mismo comportamiento se tuvo en cuanto actividad, sin embargo, la condición B:LI-R fue la más afectada disminuyendo más de la mitad comparada con el inóculo.

Finalmente, el índice de Simpson (D) indica la dominancia de la especie y refleja la probabilidad de que dos individuos que pertenecen a la misma especie sean elegidos aleatoriamente. Varía de 0 a 1 y el índice aumenta a medida que disminuye la diversidad (Simpson, 1949). En el caso del dominio *Archaea* en actividad, al tener una fuente de acetato en el medio de cultivo las

arqueas metanogénicas acetoclásticas predominaron en el sistema, aumentando así el índice de Simpson, por lo cual la diversidad se vio disminuida comparado con el inóculo.

Tabla 13. Resumen de datos de la secuenciación genética masiva y análisis filogenético para dominios de *Bacteria* y *Archaea* de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.

	Presencia (ADN)			Actividad (ARN)		
	H1-D	B:LI-D	A:LI-D	H1-R	B:LI-R	A:LI-R
Número total de secuencias						
<i>Bacteria</i>	15,729	12,976	13,664	13,482	7,980	12,401
<i>Archaea</i>	5,293	8,232	6,383	11,451	11,901	10,249
Número de OTUs y cobertura						
Número de OTUs para <i>Bacteria</i>	331	279	266	305	105	169
Número de OTUs para <i>Archaea</i>	32	28	20	30	16	19
Cobertura de curvas de rarefacción para <i>Bacteria</i> (%)	99.81	99.82	99.80	99.98	99.97	99.98
Cobertura de curvas de rarefacción para <i>Archaea</i> (%)	99.94	99.99	100	100	100	100
Índices de diversidad						
Índice de Shannon-Weaver para <i>Bacteria</i>	3.95	3.86	3.57	4.31	2.85	3.19
Índice de Shannon-Weaver para <i>Archaea</i>	1.31	1.01	0.82	1.44	0.80	0.79
Índice de Simpson para <i>Bacteria</i>	0.05	0.04	0.07	0.04	0.17	0.11
Índice de Simpson para <i>Archaea</i>	0.43	0.51	0.63	0.43	0.66	0.67
Índice de Ace para <i>Bacteria</i>	346.95	291.95	281.93	305.82	105.58	169.71
Índice de Ace para <i>Archaea</i>	33.24	28.34	20	30	16	19

La diversidad microbiana de los dominios *Archaea* y *Bacteria* presentada por los OTUs con abundancia relativa ≥ 1 % fue considerada como dominante, mientras que los OTUs con abundancias relativas menores al 1 % fueron consideradas como *Minor Phyla*, por lo cual no fueron analizadas a detalle.

En el caso del dominio *Archaea* un total de 10 OTUs fueron dominantes. La afiliación filogenética del pariente más cercano a los OTUs y su similitud se presenta en el anexo I. Los metanógenos acetoclásticos OTU 1 y 3 (*Methanotherix soehngeni* GP6 y *Methanotherix harundinacea* 8Ac, respectivamente) representan el 20 % del total de OTUs. Los metanógenos

CO₂ reductores OTUs 2, 5, 7 y 12 (*Methanobacterium beijingense* 8-2, *Methanobacterium petrolearium* Mic5c12, *Methanolinea tarda* NOBI-1 y *Methanobrevibacter boviskoreani* JH1, respectivamente) representan el 40 % del total de OTUs, siendo el grupo más dominante. Los metanógenos metilotróficos OTU 8 y 9 (*Methanomassiliicoccus luminyensis* B10) representan el 20 % del total de OTUs. Finalmente, los OTUs 10 y 13 (*Staphylothermus marinus* F1) corresponden a los sulfato reductores representando el 20 % del total de OTUs.

Por su parte, en el dominio *Bacteria* un total de 45 OTUs fueron dominantes, la afiliación filogenética del pariente más cercano a los OTUs y su similitud se presenta en el anexo J. El phylum *Chloroflexi* con 14 OTUs representa el 31 % del total de OTUs, siendo el phylum más dominante del sistema. Los phyla *Firmicutes* y *Thermodesulfobacteriota* con 7 OTUs cada uno, representa el 15.5 % del total de OTUs. Finalmente, el árbol filogenético del dominio *Arquea* y *Bacteria* se presenta en el anexo K y las características de las poblaciones dominantes se encuentran en el anexo L, están divididas por grupos tróficos bacterias fermentativas, fermentadores sintróficos facultativos, acetogénicos sintróficos obligados y bacterias sulfato reductoras, mientras que la comunidad *Archaea* se encuentra dividida en metanógenos reductores de CO₂, acetotróficos y metilotróficos.

3.1.2.3 Dinámica poblacional de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano

La dinámica de las poblaciones del dominio *Archaea* dominantes en presencia (ADN) y actividad (ARN) se muestra en la Figura 10. Se observó una comunidad compuesta principalmente por los géneros *Methanobacterium*, *Methanothrix*, *Methanolinea* y *Methanobrevibacter*.

Los metanógenos CO₂ reductores fueron el grupo más dominante en presencia alcanzando 71.42 % y 82.58 % de abundancia relativa en B:LI-D y A:LI-D, respectivamente; la especie más representativa fue *Methanobacterium beijingense* 8-2. Por otra parte, los metanógenos acetótrofos representan el 26.12 % y 15.57 %, siendo el segundo grupo más relevante.

Sin embargo, en actividad el grupo más dominante fueron los metanógenos acetótrofos con 87.38 % y 88.27 % de abundancia relativa en B:LI-D y A:LI-D respectivamente, indicando que la ruta acetotrófica fue la vía principal de producción de metano, lo cual era de esperarse debido al acetato proporcionado por el [EAO][OAc]. No obstante, no existe un efecto en la concentración del [EAO][OAc] en actividad de los metanógenos, debido a que fue muy similar la abundancia relativa entre las condiciones con 2.5 y 5 % p/v del LI. La especie más

representativa de este grupo trófico en ambas condiciones fue *Methanotherix soehngeni* GP6, la cual metaboliza el acetato a metano y CO₂ (Huser *et al.*, 1982).

Los OTU 8 y 9 que estuvieron afiliados a *Methanomassiliicoccus luminyensis* B10, puede producir metano mediante la reducción de metanol con hidrógeno como donante de electrones (Dridi *et al.*, 2012), fue únicamente dominante en el inóculo (H1) en presencia con 1.681 % y actividad con 3.109 % de abundancia relativa. De igual forma, los OTUs 10 y 13 afiliados a *Staphylothermus marinus* F1 fueron solo dominantes en el inóculo con 1.27 % en presencia y 3.69 % en actividad de abundancia relativa, debido a que este microorganismo solo crece en medios complejos (peptona, extracto de levadura, extracto de carne) pero no en carbohidratos o aminoácidos simples, además el azufre elemental es necesario para el crecimiento, siendo los productos metabólicos CO₂, H₂S, acetato e isovalerato (Anderson *et al.*, 2009).

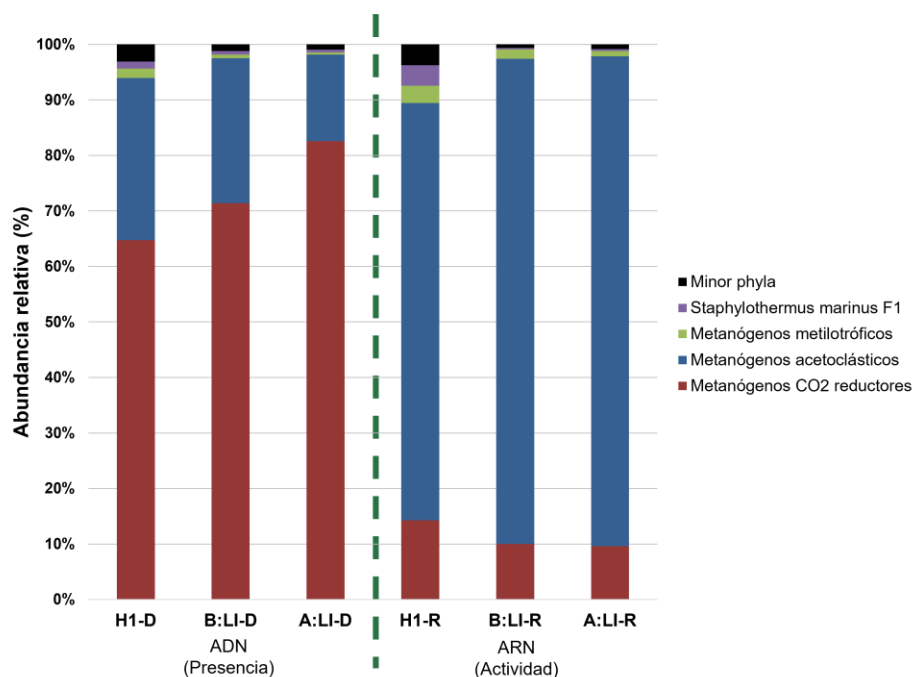


Figura 10. Abundancia relativa (%) de las poblaciones dominantes del dominio *Archaea* de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.

La dinámica de las poblaciones del dominio *Bacteria* dominantes en presencia (ADN) y actividad (ARN) se muestra en la Figura 11, agrupado en grupos tróficos bacterias fermentativas, fermentadores sintróficos facultativos, acetogénicos sintróficos obligados y bacterias sulfato reductoras, además los OTUs que fueron solo dominantes en el inóculo tanto en presencia como actividad fueron agrupados en *Mayor phyla* presentes solo en el inóculo, estos fueron los OTUs 17, 21, 33, 34, 36, 40, 41, 47, 49, 56, 61 y 91.

La población bacteriana fue dominada principalmente por el grupo trófico de fermentadores en ambos tratamientos. Con la condición B:LI los fermentadores tuvieron una abundancia relativa de 44.31 % y 53.14 % en presencia y actividad respectivamente, por otra parte, la condición A:LI-D obtuvieron 60.65 % y 42.83 % respectivamente. La principal especie activa perteneciente a este grupo trófico fue *Clostridium quinii* DSM 6736, el cual fermenta glucosa a formiato, acetato, lactato, etanol y H₂ (Svensson *et al.*, 1992), otras de las especies dominantes fermentadoras fueron *Prolixibacter bellariivorans* F2, *Gracilinema caldarium* DSM 7334 y *Propionicimonas paludicola* Wd las cuales fermentan glucosa a H₂, acetato, CO₂ y propionato. Siendo estos productos de la fermentación sustratos para la comunidad *Archaea* para la producción de metano, en caso del propionato es sustrato para los acetógenos sintróficos facultativos.

En el caso del grupo trófico de los acetógenos sintróficos obligados, la condición A:LI obtuvo una abundancia relativa de 11.67 % en presencia y 6.04 % en actividad, siendo mayor en ambos casos que en la condición B:LI. Debido a la concentración inicial de acetato en la condición A:LI (14.152 g/L, Tabla 10) se esperaba que la comunidad de los acetógenos sintróficos obligados fuera más afectada por cuestiones termodinámicas, esto es debido a la alta concentración de acetato presente inhibiera a la comunidad provocando la disminución de la actividad, mientras que los fermentadores sintróficos facultativos pueden seguir produciendo acetato sin verse afectados por la concentración de este en el medio, este grupo alcanzó 34.13 % de abundancia relativa en actividad en A:LI, mientras que en B:LI solo obtuvo 18.70 %. Las especies *Syntrophobacter wolinii* DB y no cultivable *Candidatus Cloacamonas* sp. clone ALB21 fueron las más representativas en actividad y presencia, respectivamente de los acetógenos sintróficos obligados. Mientras que *Aggregatilinea lenta* MO-CFX2 y *Ornatilinea apprima* P3M-1 fueron los más representativos en actividad de los fermentadores sintróficos facultativos.

Por otra parte, las bacterias sulfato reductoras (BSR) fueron dominantes únicamente en actividad siendo la especie *Solidesulfobivrio alcoholivorans* SPSN la más representativa con una abundancia relativa de 2.76 % en la condición B:LI-R y 2.36 % en A:LI-R. Este grupo trófico compite por el acetato e hidrógeno con las arqueas metanógenas, causando una disminución en la producción de metano, sin embargo, no existieron indicios de que este grupo afectara el desarrollo de los sistemas.

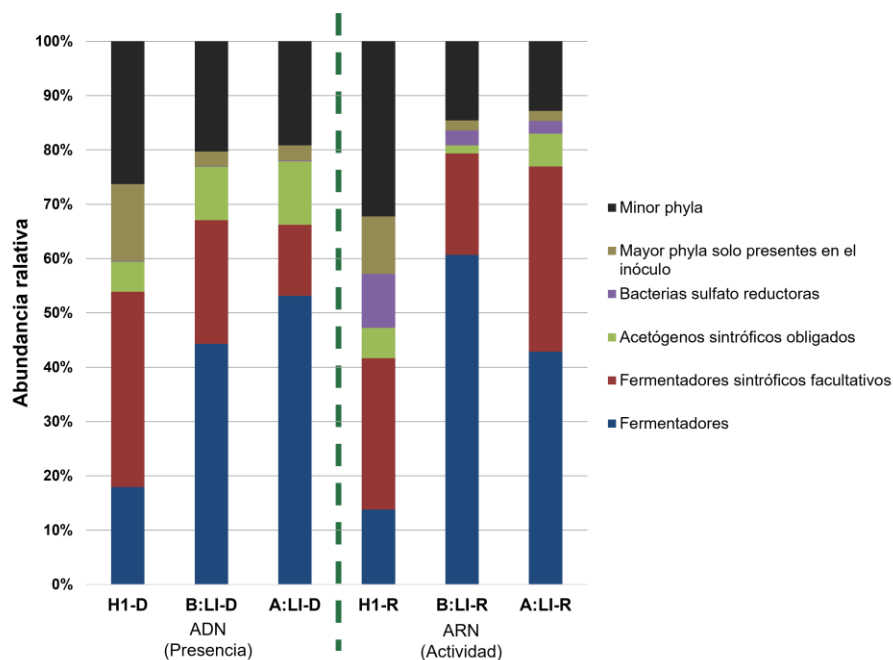


Figura 11. Abundancia relativa (%) de las poblaciones dominantes del dominio Bacteria de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano

3.1.2.4 Análisis de componentes principales de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano

El ACP indicó que el componente principal 1 explicó el 59.32 % de la varianza total; mientras que, el componente principal 2 explicó el 40.68 %. De acuerdo con los pesos de los componentes de las variables de funcionamiento asociados a los datos de la comunidad microbiana se correlacionaron para obtener tres grupos denominados I, II y III (Anexo M).

En la Figura 12 se muestran los tres grupos que conforman el ACP de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano. El grupo I se explica por el componente principal 1, correlaciono las abundancias relativas de los metanógenos acetoclásticos (AcemtD) y los fermentadores sintróficos facultativos (FSFD) con el índice de diversidad Shannon *Archaea* (HAp) y de *Bacteria* (HBp). Estas variables tendieron a disminuir sus valores, teniendo el valor más bajo en la condición A:LI-D. Este grupo sugiere una interacción entre los fermentadores sintróficos facultativos, productores de acetato como *Longilinea arvoryzae* y *Ornatilinea apprima* principales especies de este grupo trófico, y los metanógenos acetoclásticos los cuales consumen acetato para producir metano como *Methanotherix soehngeni* GP6 (Anexo L), por otra parte, al disminuir estos grupos tróficos afecto la riqueza del sistema disminuyendo así el índice de Shannon-Weaver para el dominio *Bacteria* y *Archaea*.

El grupo II también es explicado por el componente principal 1, correlaciono la abundancia relativa de los metanógenos CO₂ reductores (CO₂metD) y los fermentadores (FermD) con la concentración final de acetato (FinAc), propionato (FinPro), concentración de glucosa consumida (ConsGlu), índice de diversidad Simpson *Bacteria* (DBp) y *Archaea* (DAp). En este grupo las variables tienen una tendencia a aumentar, con el valor más alto en la condición A:LI-D. Las correlaciones de las variables sugieren que el grupo trófico de fermentadores como *Clostridium quinii*, *Succinispira mobilis* y *Gracilinema caldarium* fermentan la glucosa presente en el medio a CO₂ y H₂ (Anexo L), principales sustratos de los metanógenos CO₂ reductores como *Methanobacterium beijingense* y *Methanobacterium petrolearium* para producir metano, de igual forma otros fermentadores como *Bacteroides graminisolvens*, *Prolixibacter bellariivorans*, *Propionicimonas paludicola* y *Succinispira mobilis* fermentan glucosa a acetato y propionato (Anexo L), llevando a la acumulación de estos compuestos en la parte final del proceso al no consumirse. Por último, al ser los fermentadores y metanógenos CO₂ reductores los grupos tróficos más dominantes para el dominio de *Bacteria* y *Archaea* respectivamente, fueron relacionados al índice de Simpson porque indica la dominancia de las especies en el sistema.

Finalmente, el grupo III se explica por el componente principal 2, correlaciono la abundancia relativa de *Smithella propionica* (S.prop), *Syntrophobacter wolinii* (S.wolinii) y *Syntrophorhabdus aromaticivorans* (S.aromat) con el volumen de metano (CH₄vol), rendimiento (CH₄Y), velocidad volumétrica de producción de metano (VVPM) y la concentración final de butirato (FinBut). En este grupo todas las variables tienden a disminuir su valor. Las correlaciones de las variables sugieren que la disminución de los parámetros fisicoquímicos como el volumen de metano, rendimiento y la velocidad volumétrica de producción de metano se debe a la baja en la abundancia relativa de los acetogénicos sintróficos obligados conformados por *S. propionica*, *S. wolinii* y *S. aromaticivorans*, los cuales metabolizan propionato a acetato y H₂, sustratos para las arqueas metanogénicas. Siendo la condición A:LI-D la más afectada al tener los parámetros fisicoquímicos más bajos. Por otra parte, la acumulación de butirato al final del proceso se debe a *S. propionica*, la cual también metaboliza propionato a butirato (Anexo L). De esta forma se evidencio que la sintrofia obligada en el sistema fue por la vía del propionato, al correlacionarse los acetógenos sintróficos obligados que consumen propionato. En el estudio realizado por Snell Castro *et al.*, (2019) se mostró que la ruta de degradación de los hidrolizados ácidos de BATA fue por la vía del propionato, igual que en este estudio.

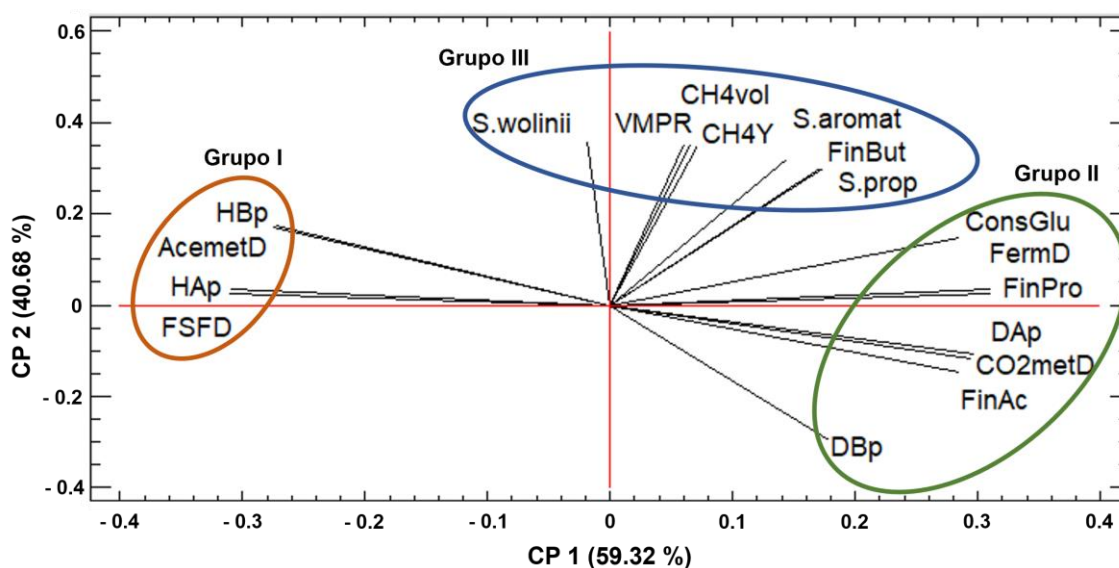


Figura 12. Correlaciones de las variables obtenidas mediante el ACP a partir de los valores de las variables biológicas y fisicoquímicas durante la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano. Los círculos de cada color indican la formación de los 3 grupos en base al peso de cada variable en los componentes 1 y 2. Abreviaturas: CP: Componente Principal; CH4vol: Volumen de metano (NmL); VMPR: Tasa de producción volumétrica de metano (NmL-CH₄/L·d); CH4Y: Rendimiento (NmL-CH₄/g-glucosa removida); FinAc: acetato final (g/L); FinPro: Final propionato (g/L); FinBut: Final butirato (g/L); ConsGlu: Concentración de glucosa consumida (g/L); CO2metD: abundancia relativa (a.r.) metanógenos CO₂ reductores presentes; AcemetD: a.r. metanógenos acetoclásticos presentes; FermD: a.r. fermentadores presentes; FSFD: a.r. fermentadores sintróficos facultativos presentes; S.wolinii: a.r. *Syntrophobacter wolinii* DB presente; S.pro: a.r. *Smithella propionica* LYP presente; S.aromat: *Syntrophorhabdus aromaticivorans* UI presente; HAp: Índice de diversidad Shannon *Archaea* presentes; HBp: Índice de diversidad Shannon *Bacteria* presentes; DAp: Índice de diversidad Simpson *Archaea* presentes; DBp: Índice de diversidad Simpson *Bacteria* presentes.

3.2 Pruebas de potencial de metano con glucosa (sustrato modelo) y [EAO][OAc]

La evaluación del efecto del [EAO][OAc] en la producción de metano se realizó partiendo de un diseño 2^K con puntos centrales, utilizando glucosa como sustrato modelo y [EAO][OAc], los resultados de las corridas realizadas en el equipo AMPTS se muestran en la Tabla 14. A los volúmenes de producción de metano se les restó la producción obtenida en el control negativo (endógeno) la cual fue de 23.25 NmL.

Cabe resaltar que la producción más baja se tuvo en el punto K4 (95.12 y 101.35 NmL de metano), el cual corresponde al nivel alto de ambos factores en el diseño, por otro lado, la producción más alta se obtuvo en los puntos centrales (CP1-CP5).

Tabla 14. Resultados del diseño 2^k con puntos centrales para la evaluación del efecto del [EAO][OAc] en la producción de metano

Identificación del reactor	[EOA][OAc] (% p/v)	Glucosa (g/L)	Producción de metano (NmL)	
			Réplica 1	Réplica 2
K1	1.5	3	2130.25	2053.05
K2	3.5	3	1195.15	1288.95
K3	1.5	7	219.25	192.55
K4	3.5	7	95.15	101.35
CP1	2.5	5	2767.85	2590.15
CP2	2.5	5	2855.15	2659.05
CP3	2.5	5	2675.05	2855.15
CP4	2.5	5	2574.05	2675.05
CP5	2.5	5	2675.25	2574.05

En el ANOVA del diseño 2^k con puntos centrales (Tabla 15), muestra que los factores significativos ($p > 0.05$) fueron tanto la concentración de [EAO][OAc] y de glucosa. El modelo de primer orden para la producción de metano tuvo un factor de correlación ajustado $R^2 = 32.078\%$, por lo que este modelo no describe los datos experimentales adecuadamente, esto se comprueba en el valor de la falta de ajuste ($p = 0.0000$).

Tabla 15. ANOVA del diseño 2^k con puntos centrales para la evaluación del efecto de [EAO][OAc] en la producción de metano.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: [EAO][OAc]	155264	1	155264	217.30	0.0000
B: Glucosa	5.8809E6	1	5.88091E6	5.74	0.0324
AB	58464.9	1	58464.9	2.16	0.1654
Falta de ajuste	1.25534E7	1	1.25534E7	463.85	0.0000
Error puro	352821	13	27063.2		
Total (corr.)	1.89998E7	17			

Debido a la falta de ajuste se procedió a elaborar un diseño de composición central, el cual se ajusta a un modelo de segundo orden y permite modelar la variable de respuesta (producción de metano) al agregar puntos axiales al diseño previo, por lo cual se añadieron 4 puntos axiales al diseño.

3.3 Optimización de la producción de metano con glucosa (sustrato modelo) y [EAO][OAc]

Los resultados obtenidos después de añadir los 4 puntos axiales para crear el diseño de composición central se muestran en la Tabla 16, en el punto axial alto de glucosa (A1) y de [EAO][OAc] (A3) se pueden observar las producciones más bajas de metano.

Tabla 16. Resultados del diseño de composición central para la optimización de la producción de metano con glucosa (sustrato modelo) y [EAO][OAc]

Identificación del reactor	[EAO][OAc] (% p/v)	Glucosa (g/L)	Producción de metano (NmL)	
			Réplica 1	Réplica 2
K1	1.5	3	2130.25	2053.05
K2	3.5	3	1195.15	1288.95
K3	1.5	7	219.25	192.55
K4	3.5	7	95.15	101.35
A1	2.5	7.83	103.65	98.95
A2	2.5	2.18	2728.95	2526.05
A3	3.92	5	383.95	708.55
A4	1.09	5	1739.75	1877.15
CP1	2.5	5	2767.85	2590.15
CP2	2.5	5	2855.15	2659.05
CP3	2.5	5	2675.05	2855.15
CP4	2.5	5	2574.05	2675.05
CP5	2.5	5	2675.25	2574.05

De acuerdo con la gráfica de efectos principales (Figura 13), en los niveles altos de los factores la producción de metano se ve afectada negativamente, sin embargo, en niveles bajos la producción se ve favorecida. Además, se puede observar que a bajas concentraciones de [EAO][OAc] (como 2.5 % p/v), la producción de metano se ve favorecida a medida que disminuye la concentración de glucosa.

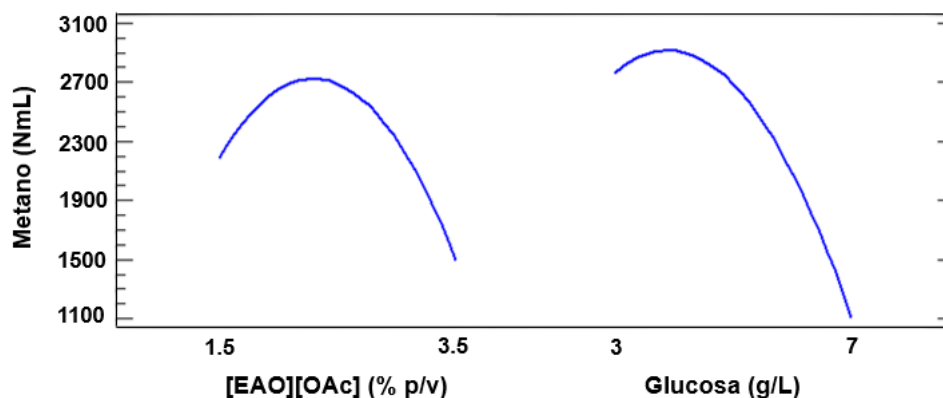


Figura 13. Gráfica de efectos principales para la producción de metano en el diseño de composición central

El ANOVA del diseño central compuesto (Tabla 17) arrojó que los efectos significativos, es decir, tienen un valor de $p < 0.05$, son la concentración de [EAO][OAc], la concentración de glucosa, la interacción entre sí misma de la concentración de [EAO][OAc], la interacción entre sí misma de la concentración de glucosa y la interacción de la glucosa con la concentración de [EAO][OAc]. El factor de correlación ajustado R^2 fue de 96.79 %, por lo cual este modelo describe los datos experimentales adecuadamente.

Tabla 17. ANOVA del diseño central compuesto para optimización de la producción de metano con glucosa (sustrato modelo) y [EAO][OAc].

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: [EAO][OAc]	1.88001E6	1	1.88001E6	39.29	0.0000
B: Glucosa	1.0897E7	1	1.0897E7	227.72	0.0000
AA	9.97481E6	1	9.97481E6	208.45	0.0000
AB	275245.	1	275245.	5.75	0.0263
BB	7.89297E6	1	7.89297E6	164.94	0.0000
Error total	957058.	20	47852.9		
Total (corr.)	2.98317E7	25			

El modelo de segundo orden que se obtuvo con el diseño experimental se presenta a continuación

$$\text{Metano} = -3230.0 + 3427.13 * [\text{EAO}][\text{OAc}] + 1238.5 * \text{Glucosa} - 846.727 * [\text{EAO}][\text{OAc}] * [\text{EAO}][\text{OAc}] + 188.299 * \text{Glucosa} * \text{Glucosa} + 92.7438 * [\text{EAO}][\text{OAc}] * \text{Glucosa}.$$

Este modelo se utilizó para elaborar la gráfica de superficie de respuesta (Figura 14), donde se puede observar que existe un punto óptimo de los factores para la producción de metano, los

cuales son para el [EAO][OAc] de 2.234 % p/v y para la glucosa de 3.839 g/L, el valor predicho para la producción de metano es de 2975.26 NmL.

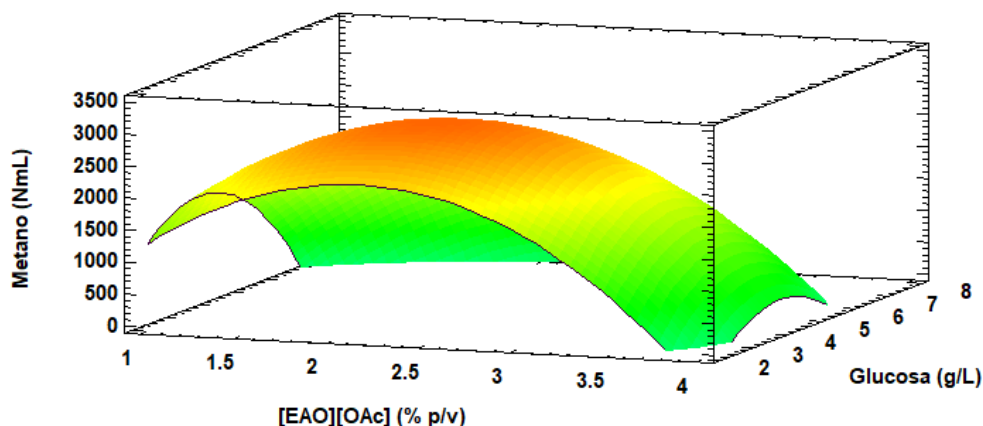


Figura 14. Superficie de respuesta estimada para la producción de metano.

3.3.1 Parámetros fisicoquímicos de la producción de metano con glucosa y [EAO][OAc]

Con el propósito de evaluar el proceso de la prueba de potencial bioquímico de metano en las corridas experimentales en la Tabla 18 se presentan los parámetros de rendimientos, es importante mencionar que los valores reportados para la producción de metano se calcularon restando los valores obtenidos del control endógeno con el propósito de eliminar el aporte de DQO del inóculo al proceso.

Tabla 18. Parámetros de rendimiento de la prueba de potencial de metano con sustrato modelo (glucosa) y [EAO][OAc].

Identificación del reactor	Metano (NmL)*	Glucosa (g/L)		DQO inicial (g/L)	DQO final (g/L)	DQO removida (%)	VVPM	Rendimiento (L CH ₄ / g DQO _{removida})
		Inicial	Final					
K1	2091.65	2.682	ND	25.874	6.991	73	0.528	0.308
K2	1242.05	2.599	ND	43.453	31.352	28	0.345	0.285
K3	205.90	5.291	ND	28.815	18.816	35	0.143	0.107
K4	98.25	5.631	ND	48.533	39.081	19	0.136	0.029
A1	101.30	5.845	ND	39.452	32.733	17	0.281	0.042
A2	2627.50	1.704	ND	31.798	10.957	66	0.561	0.350
A3	546.25	3.913	ND	57.555	29.132	49	0.190	0.053

A4	1808.45	3.030	ND	21.185	6.110	71	0.558	0.333
PC	2690.09	3.825	ND	36.388	13.670	62	0.575	0.329
C+	470.10	4.270	ND	6.293	2.642	58	0.163	0.358

*Promedio de las réplicas; PC- Punto central; C+ Control positivo (5 g/L glucosa); VVPM - Flujo de producción volumétrica de metano; ND – No detectado.

En la Figura 15, se presenta la cinética de la producción de metano a partir de glucosa y [EOA][OAc]. Los puntos centrales tuvieron la mayor producción (2690.09 NmL) lo que se esperaba en el diseño para lograr la correcta optimización de la producción de metano, además de tener la mayor VVPM (0.575 L CH₄/L d).

Los reactores K4 (nivel alto de glucosa, 7 g/L) y A1 (nivel alto axial de glucosa, 7.83 g/L), tuvieron las producciones más bajas, así como los rendimientos (0.029 y 0.042 L CH₄/g DQO removida, respectivamente), además, se mantuvieron activos entre uno y dos días (Figura 17), lo que nos puede indicar que sufrieron algún tipo de represión. Castillo Preciado, (2022) evaluó la digestión anaerobia con concentraciones de 10 y 15 g/L de glucosa en presencia de [EAO][OAc] a diferentes concentraciones encontrando una posible represión catabólica por parte de la glucosa en las concentraciones mencionadas, debido a que obtuvo producciones menores al control positivo.

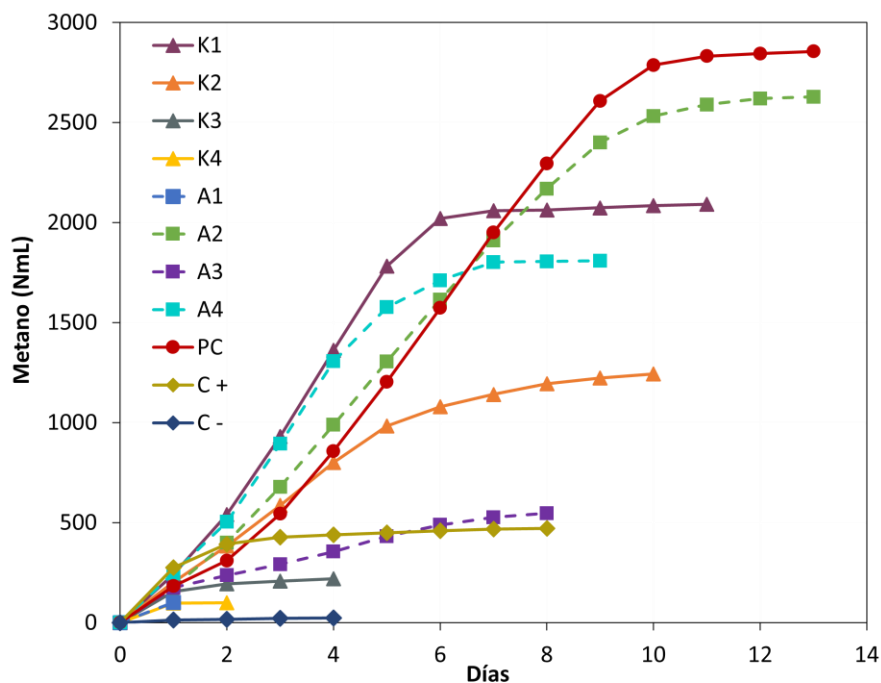


Figura 15. Cinética de la producción de metano a partir de glucosa (sustrato modelo) y [EOA][OAc].

Además, en la Tabla 19 se presentan las concentraciones iniciales y finales para los AGV, lactato y pH durante el proceso de la digestión anaerobia. Las concentraciones iniciales de acetato se deben al [EAO][OAc] presente debido a que al comienzo de la digestión anaerobia el reactor solo contenía glucosa, LI, medio mineral y el carbonato de calcio. Cabe resaltar que los reactores K1, K2, A2, A4 y PC tuvieron una disminución de la concentración inicial de acetato, por lo cual se supone que los metanógenos acetótrofos pudieron consumir el acetato inicial durante la digestión anaerobia. Este efecto también se presentó en los trabajos realizados por García López, (2020) y Castillo Preciado, (2022).

En los puntos K3, K4 (nivel alto de glucosa), A1 y A3 (axial alto de glucosa y [EAO][OAc], respectivamente) la concentración final de propionato fue inhibitoria para el proceso, se ha reportado que a concentraciones de propionato mayores a 900 mg/L existe una inhibición significativa de los metanógenos (Wang *et al.*, 2009). La acumulación de propionato se puede deber al colapso de la relación sintrófica obligada para la oxidación de acetato entre las poblaciones bacterianas acetogénicas que consumen el propionato para producir acetato y las arqueas acetótrofas que lo consumen para producir metano; el cambio de energía libre estándar de Gibbs, $\Delta G_0'$, de la reacción propionato a acetato es de + 76 kJ/mol, siendo la mayor entre los sustratos utilizados por las bacterias acetogénicas sintróficas, por lo cual es el primer sustrato en acumularse al existir un fallo en la sintrofía. Adicionalmente, se puede relacionar la acumulación de AGV con la caída de pH del medio de estos puntos (K3, K4, A1 y A3) los cuales tuvieron un pH final entre 5.30 – 5.60 siendo estos valores no adecuados para la etapa metanogénica.

Referente al butirato, los reactores K2 y PC tuvieron las concentraciones finales más altas entre todas las condiciones, de igual forma el butirato es consumido para producir acetato por las acetógenas sintróficas, su cambio de energía libre estándar de Gibbs es de + 48 kJ/mol siendo menor al propionato. Sin embargo, las concentraciones alcanzadas no son inhibitorias para el proceso, se ha reportado inhibición por el butirato a concentraciones mayores de 1.8 g/L (Wang *et al.*, 2009). Con los resultados obtenidos en los reactores K3, K4, A1 y A3 se puede inferir que si existió un efecto negativo en el sistema debido al acetato proveniente del LI dado que provocó un fallo en las comunidades sintróficas obligadas llevando a la acumulación de propionato y butirato al final del proceso.

Con el propósito de evaluar el posible cambio de concentración del [EAO][OAc] durante la digestión anaerobia se realizaron pruebas con espectroscopía infrarroja por FTIR, no obstante, la presencia de metabolitos del proceso como los AGV interfirieron en el espectro, por lo cual los resultados no fueron concluyentes (Anexo N).

Tabla 19. Valores iniciales y finales para los ácidos grasos volátiles y pH en el diseño central compuesto para la optimización de la producción de metano.

Identificación	Fórmico		Acetato		Propionato		Isobutirato		Butirato		pH	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
K1	17.06	8.15	5.50	2.34	0.07	ND	0.07	0.08	ND	ND	7.55	8.13
K2	18.42	3.88	12.66	10.53	0.08	0.82	ND	0.07	ND	0.94	7.45	6.24
K3	11.50	4.30	5.40	6.46	0.08	1.12	ND	ND	ND	0.04	7.46	5.34
K4	18.08	4.06	13.61	12.64	ND	1.21	0.06	0.09	ND	0.13	7.65	5.56
A1	11.31	9.92	9.47	9.52	0.09	1.35	ND	0.08	ND	0.09	7.48	5.60
A2	8.70	6.97	8.61	3.11	0.08	0.33	0.06	0.08	ND	0.06	7.52	8.06
A3	8.55	7.67	18.18	14.67	ND	1.21	ND	0.09	ND	0.47	7.74	5.43
A4	2.75	11.90	4.15	0.42	0.07	0.09	ND	0.09	ND	ND	7.63	8.09
PC	11.12	7.75	8.83	2.72	ND	0.53	0.07	0.09	ND	1.02	7.37	7.92
Control +	ND	ND	0.04	ND	0.08	ND	ND	0.13	ND	ND	7.91	7.77

ND – No detectado; Concentraciones en g/L

3.4 Efecto del pretratamiento de BATA con [EAO][OAc]

El análisis composicional de BATA sin pretratar y pretratado con [EAO][OAc] se muestra en la Tabla 20, se alcanzó una deslignificación del 28.9 % siendo menor a la lograda por Castillo Preciado, 2022 (37.4 %) utilizando las mismas condiciones de pretratamiento.

Tabla 20. Análisis composicional de BATA sin pretratar y pretratado.

Sustrato	Recuperación de sólidos (%)	Glucano (%)	Xilano (%)	Lignina (%)
BATA sin pretratar	100	33.20	18.30	18.76
BATA pretratado con [EAO][OAc]	63.76	47.60	23.73	13.34

3.5 Caracterización de los hidrolizados enzimáticos de BATA

Los hidrolizados enzimáticos obtenidos de la sacarificación de BATA pretratado con [EAO][OAc] se caracterizaron para conocer su composición (Tabla 21), la cual se utilizó para diseñar y elaborar los hidrolizados enzimáticos sintéticos.

Tabla 21. Caracterización de los hidrolizados enzimáticos de BATA pretratado con [EAO][OAc].

Compuesto	Concentración (g/L)
DQO	146.56 ± 2.83
Azúcares totales (AT)	125.06 ± 2.93
Carbohidratos	
Glucosa	43.13 ± 1.28
Xilosa	14.70 ± 0.46
Arabinosa	3.21 ± 1.07
Ácidos Grasos Volátiles	
Lactato	0.420
Fórmico	0.104
Acetato	0.243
Propionato	0.112
Isobutirato	0.084
Butirato	0.072

La concentración de azúcares totales obtenidos contribuye mayoritariamente (85 %) al valor de la DQO y en menor medida las proteínas provenientes del cóctel enzimático, AGV y diversos

compuestos secundarios del BATA. Finalmente, en la Tabla 22 se presenta la composición de los hidrolizados enzimáticos sintéticos ajustados al valor óptimo. Debido a la dilución realizada para obtener la cantidad adecuada de AT, la arabinosa y AGV no están presentes en el diseño final de los hidrolizados enzimáticos sintéticos.

Tabla 22. Composición de los hidrolizados enzimáticos sintéticos de BATA.

Compuesto	Concentración (g/L)
Azúcares totales (AT)	3.839
Carbohidratos	
Glucosa	1.732
Xilosa	0.803

3.6 Pruebas de potencial bioquímico de metano con valores óptimos con diferentes sustratos

De acuerdo con la metodología de superficie de respuesta de la sección 3.3, el punto óptimo de para la producción de metano fue 2.234 % p/v [EAO][OAc] y 3.839 g/L de glucosa para producir 2975.26 NmL de metano.

Los sustratos utilizados para las pruebas con los valores óptimos fueron glucosa, glucosa con [EAO][OAc], hidrolizados enzimáticos, hidrolizados enzimáticos con [EAO][OAc], hidrolizados enzimáticos sintéticos con [EAO][OAc] y [EAO][OAc]. Se mantuvo una relación constante de 3.839 AT g/L entre las pruebas.

3.6.1 Desempeño de las condiciones óptimas con los diferentes sustratos

Los resultados de la producción de metano con las condiciones óptimas utilizando los diferentes sustratos se presentan en la Tabla 23, los valores de producción de metano se calcularon restando los valores obtenidos del control endógeno (15.4 NmL) con el propósito de eliminar el aporte del inóculo al proceso.

Tabla 23. Resultados de la producción de metano con los valores óptimos con los diferentes sustratos.

Condición	Identificación	Producción de metano (NmL)				Promedio
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	
Glucosa	Glu	425.40	444.50	418.00	455.50	435.85 ± 17.21
Glucosa + LI	Glu-LI	2727.50	2793.80	2540.70	2531.20	2648.30 ± 132.58
Hidrolizados	HE	399.40	399.20	441.40	406.50	411.63 ± 20.14
Hidrolizados + LI	HE-LI	2694.30	2530.40	2713.20	2507.80	2611.43 ± 107.28
Hidrolizados sintéticos + LI	HES-LI	2720.50	2697.10	2620.90	2331.50	2592.50 ± 179.12
LI	LI	1907.30	2062.60	1878.20	1831.10	1919.80 ± 100.24

LI - [EAO][OAc]

Los tratamientos con glucosa con [EAO][OAc] (Glu-LI), hidrolizados enzimáticos reales con [EAO][OAc] (HE-LI) e hidrolizados enzimáticos sintéticos con [EAO][OAc] (HES-LI) tuvieron las mayores producciones de metano (2648.30, 2611.43 y 2592.50 NmL, respectivamente), no existe una diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) entre las varianzas de estos tratamientos, además el volumen acumulado alcanzó un ~ 90 % de la producción máxima teórica esperada de acuerdo con la metodología de superficie de respuesta (2975.26 NmL, Figura 14).

Castillo Preciado, (2022) logró una producción de 2556 ± 443 NmL de metano bajo las condiciones de 5 g/L AT y 2.5 % p/v [EAO][OAc]. Por su parte, García López, (2020) alcanzó una producción de ~ 2800 NmL de metano con 5 AT g/L y 2.5 % p/v [EAO][OAc], lo cual coincide con el resultado obtenido en este estudio.

La condición con solo [EAO][OAc] alcanzó un volumen de 1919.0 ± 100.24 NmL, además del menor rendimiento ($0.26 \text{ L CH}_4 / \text{g-DQO}_{\text{removida}}$) entre todas las muestras (Tabla 23). Si se realiza la sumatoria del volumen acumulado de la condición de glucosa (Glu) más la condición de LI, se obtiene ~ 2300 NmL de metano, teniendo una diferencia de ~ 300 NmL con la condición Glu-LI (~ 2600 NmL), la diferencia se puede deber a que al tener ambos sustratos en el medio se favorecen las rutas de producción de metano de una forma más eficiente. Las concentraciones

iniciales y finales de AT, glucosa y xilosa se presentan en la tabla 25, el consumo de AT alcanzó más del 95 % en todas las condiciones.

Tabla 24. Parámetros de rendimiento de la producción de metano usando los valores óptimos con los diferentes sustratos.

Identificación	DQO inicial (g/L)	DQO final (g/L)	DQO removida (%)	VVPM	Rendimiento (L CH ₄ / g DQO _{removida})
Glu	6.994	2.989	57	0.202	0.302
Glu-LI	36.339	9.033	75	0.334	0.269
HE	6.776	2.894	57	0.229	0.295
HE-LI	34.488	8.354	76	0.315	0.278
HES-LI	34.452	7.776	77	0.300	0.270
LI	30.894	10.362	66	0.157	0.260

LI - [EAO][OAc]; VVPM - Velocidad volumétrica de producción de metano (L CH₄/L d)

Tabla 25. Valores iniciales y finales de azúcares totales (AT), glucosa y xilosa por HPLC usando los valores óptimos con los diferentes sustratos.

Identificación	AT (g/L)		Glucosa (g/L)		Xilosa (g/L)	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
Glu	4.057 ± 0.05	0.019 ± 0.002	4.004	ND	ND	ND
Glu-LI	3.810 ± 0.20	0.057 ± 0.004	3.848	ND	ND	ND
HE	3.737 ± 0.09	0.105 ± 0.008	1.749	ND	0.813	ND
HE-LI	3.535 ± 0.06	0.055 ± 0.002	1.717	ND	0.787	ND
HES-LI	3.532 ± 0.12	0.057 ± 0.002	1.763	ND	0.861	ND

LI - [EAO][OAc]; ND - No detectado

En la Figura 16 se muestra la cinética de producción de metano a partir de los puntos óptimos con diferentes sustratos, como se puede observar la condición con glucosa (Glu) e hidrolizados enzimáticos (HE) muestran la misma tendencia de producción de metano, en el cual ambas condiciones alcanzaron un volumen acumulado de ~ 400 NmL de metano. Sin embargo, en las condiciones con [EAO][OAc] (Glu-LI, HE-LI y HES-LI) la producción de metano continuó hasta por 22-24 días, llegando a un volumen acumulado de ~ 2600 NmL.

Por otra parte, la condición con solo [EAO][OAc] se mantuvo activo por 34 días, teniendo la menor VVPM (0.158 L CH₄/L-d) (Tabla 29) de las condiciones probadas debido a que el medio solo aporta acetato como sustrato, por lo cual la producción de metano solo puede darse por la ruta acetotrófica. A diferencia de las demás condiciones que aportan azúcares, los cuales pueden ser fermentados para producir AGV, hidrógeno o CO₂ permitiendo tener activa ambas rutas de metanogénesis (ruta del CO₂ reductor y acetotrófica), esto se puede ver en los primeros días de producción, las condiciones con glucosa, hidrolizados reales e hidrolizados sintéticos con [EAO][OAc] tuvieron una pendiente más pronunciada comparada con el LI.

No obstante, para analizar el aporte de la etanolamina (MEA) que conforma el [EAO][OAc] como fuente de carbono y de nitrógeno en la digestión anaerobia, se utilizó como sustrato la etanolamina a una concentración de 1.125 % p/v la cual representa la fracción de la etanolamina en el [EAO][OAc] (2.234 % p/v) utilizado en las pruebas con los puntos óptimos. Además, el medio mineral utilizado en esta prueba no contenía una fuente de nitrógeno, se eliminó el NH₄Cl del medio mineral descrito en la Tabla 6. Esta condición identificada como MEA en la Figura 16, se mantuvo durante 6 días, sin embargo, no existió una producción de metano al final de la prueba.

En un estudio realizado por Wang *et al.*, (2013) en un digestor anaeróbico operado con glucosa, extracto de levadura, peptona y residuos de MEA durante 486 días, alcanzaron una remoción de DQO superior al 90 %, no obstante, disminuyó gradualmente hasta el 45 % cuando la carga volumétrica aplicada (CVA) fue de 2.8 kg DQO/m³- d y la relación MEA/DQO de 0.60. Existió una acumulación de acetato en el sistema lo cual ocasionó la inhibición de la metanogénesis acetoclástica. En este estudio la relación MEA/DQO fue de 0.40 en las condiciones Glu-LI, HE-LI y HES-LI menor al aplicado por Wang *et al.*, (2013), sin embargo, en la condición MEA la relación fue de 1.0 debido a esto fue la falla en la prueba.

Los cosustratos (glucosa, peptona y extracto de levadura) se usaron para proporcionar los nutrientes, minerales y diversos compuestos orgánicos fácilmente degradables necesarios para mantener una biomasa que pueda tolerar la exposición a sustancias químicas tóxicas e

inhibidoras de los residuos de MEA. Debido a esto, la comunidad microbiana de la prueba realizada con MEA (1.125 % p/v) no fue capaz de producir metano.

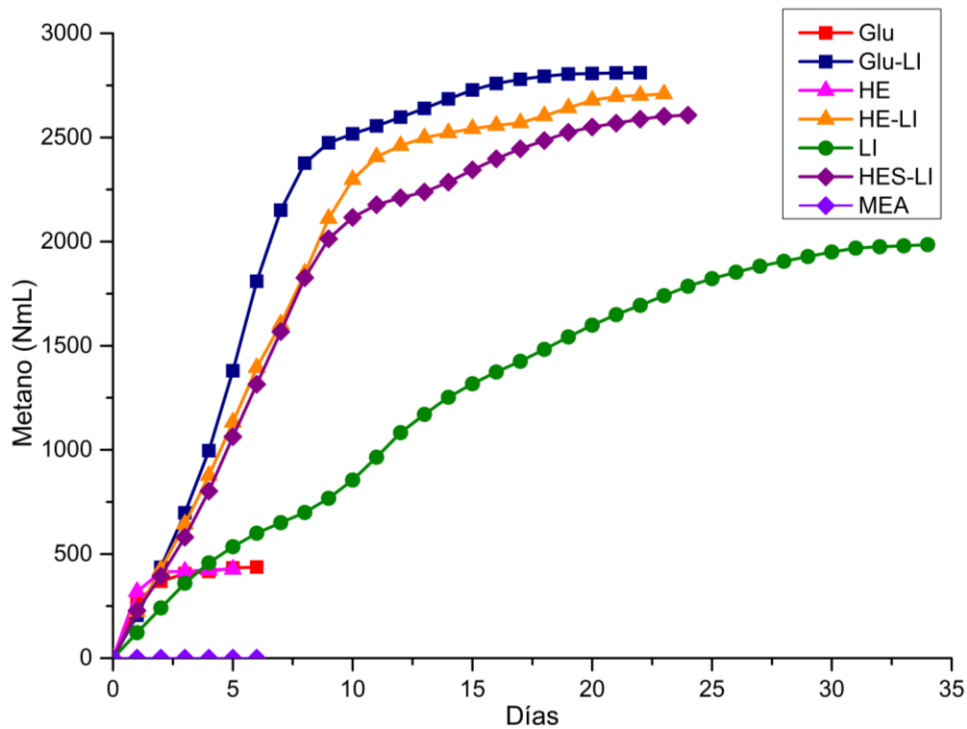


Figura 16. Cinética de la producción de metano a partir de los puntos óptimos con diferentes sustratos.

Finalmente, en las condiciones de glucosa con [EAO][OAc] (Glu-LI), hidrolizados enzimáticos con [EAO][OAc] (HE-LI) e hidrolizados enzimáticos sintéticos con [EAO][OAc] (HES-LI) hubo una reducción del ~ 64 % de la concentración de acetato inicial (Tabla 26), mientras que la condición de solo [EAO][OAc] alcanzó un 43 % de reducción en la concentración de acetato inicial. Lo que nuevamente confirma que el acetato inicial proveniente del LI es utilizado como sustrato en la digestión anaerobia. Por otro lado, los ácidos grasos volátiles como propionato, isobutirato y butirato no presentan una concentración final inhibitoria, lo que indica que la acetogénesis se desarrolló de una manera adecuada durante el proceso. Por último, al final del proceso todas las condiciones terminaron con un pH entre 7.5 – 8.5, el cual es adecuado para la fase metanogénica.

Tabla 26. Valores iniciales y finales para los ácidos grasos volátiles y pH con los valores óptimos con los diferentes sustratos.

Identificación	Fórmico		Acetato		Propionato		Isobutirato		Butirato		Isovalerato		pH	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
Glu	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.69	7.52
Glu-LI	24.97	15.45	10.19	3.92	0.05	0.27	ND	0.01	ND	0.17	ND	0.06	7.32	7.73
HE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.03	8.36
HE-LI	23.59	15.11	9.59	4.00	0.04	0.24	ND	0.03	ND	ND	ND	0.04	7.92	7.85
HES-LI	23.09	15.81	8.96	3.57	0.04	0.04	ND	0.01	ND	0.11	ND	0.05	7.50	7.98
LI	23.26	15.63	9.78	5.75	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.89	7.94

ND – No detectado; Concentraciones en g/L

3.7 Estudio de la comunidad microbiana en las pruebas de potencial bioquímico de metano en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.

La diversidad, abundancia y dinámica de las poblaciones microbianas presentes durante la digestión anaerobia en condiciones óptimas con diferentes sustratos se evaluó mediante la extracción de ADN (B36-D, B41-D, B42-D y B48-D) y ARN (B29-R, B37-R y B45-R). Las claves y descripciones de las muestras procesadas se encuentran en la Tabla 27.

Tabla 27. Claves asignadas al ADN genómico y ARN ribosomal extraídos de las muestras recolectadas de los reactores en condiciones óptimas con diferentes sustratos para el análisis de las comunidades microbianas.

Clave	Descripción de la muestra
Glu-R	Máximo flujo de producción de metano en la digestión anaerobia con glucosa y [EAO][OAc]. Clave BIOMOL B29-R.
HE-R	Máximo flujo de producción de metano en la digestión anaerobia con hidrolizados enzimáticos y [EAO][OAc]. Clave BIOMOL B37-R.
HES-R	Máximo flujo de producción de metano en la digestión anaerobia con hidrolizados enzimáticos sintéticos y [EAO][OAc]. Clave BIOMOL B45-R.
Glu-D	Final del proceso de digestión anaerobia con glucosa y [EAO][OAc] a los 22 días. Clave BIOMOL B36-D.
HE-D	Final del proceso de digestión anaerobia con hidrolizados enzimáticos y [EAO][OAc] a los 23 días. Clave BIOMOL B42-D.
HES-D	Final del proceso de digestión anaerobia con hidrolizados enzimáticos sintéticos y [EAO][OAc] a los 24 días. Clave BIOMOL B48-D.
Ino-D	Inóculo del proceso de digestión anaerobia después de las dos reactivaciones con glucosa. Clave BIOMOL B41-D.

3.7.1 Corroboración de extracción de ADN y ARN

La integridad del ADN extraído de las muestras Glu-D, HE-D, HES-D y Ino-D se verificó por medio de electroforesis obteniendo una banda de aproximadamente 20 kb (Figura 17), lo que se considera como un ADN de calidad.

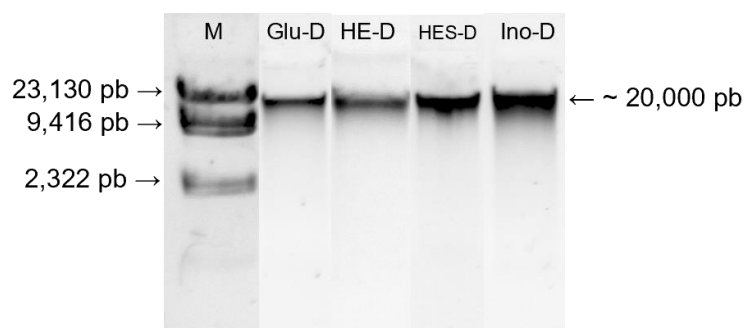


Figura 17. Visualización del ADN extraído de las muestras B36-D, B42-D, B48-D y B41-D en un gel de agarosa al 0.7 %. M- Marcador Fago Lambda/*HindIII*. Colorante SYBR Safe.

La pureza y la concentración del ADN extraído (Tabla 28) se realizó mediante la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, la pureza óptima del ADN es un valor de la relación A260/A280 de 1.8 a 2.0

Tabla 28. Concentración y pureza del ADN extraído de las muestras Glu-D, HE-D, HES-D y Ino-D.

Clave de la muestra	ng/ μ L	A260/A280
Glu-D	58.9	1.90
HE-D	95.1	1.91
HES-D	110.7	1.86
Ino-D	158.0	1.86

Con respecto a la caracterización de las poblaciones activas de *Archaea* y *Bacteria* se realizó la extracción de ARN de las muestras Glu-R, HE-R y HES-R sin embargo, no se obtuvo un gel de calidad adecuado (Figura 18), las dos bandas que corresponden al ARNr 23S y 16S tienen una intensidad baja o no se encuentran presentes, debido a esto no se consiguió realizar la síntesis de ADNc, por lo cual estas muestras destinadas a la caracterización de las poblaciones activas no fueron enviadas al INRAE para la secuenciación genética masiva.

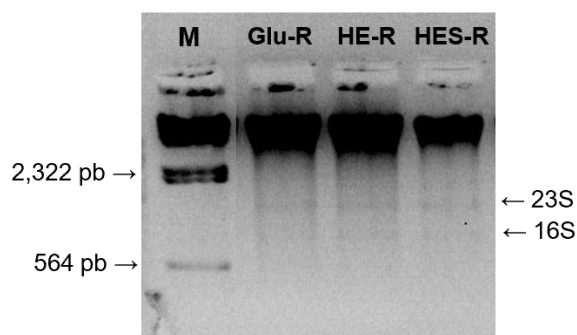


Figura 18. Gel de calidad de la extracción de ARN ribosomal de las muestras Glu-R, HE-R y HES-R. M- Fago Lambda ADN/*HindIII*. Colorante SYBR Green.

3.7.2 Diversidad microbiana de los dominios *Archaea* y *Bacteria*

El comportamiento de la diversidad y riqueza de las poblaciones microbianas de las pruebas con las condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano fueron obtenidos mediante secuenciación genética masiva a través de los índices de diversidad (Tabla 29). El número total de secuencias y de OTUs es muy similar entre todas las muestras, en la condición Ino-D es ligeramente menor al resto, sin embargo, no ocasiona un sesgo en los resultados de diversidad y riquezas de las poblaciones microbianas para analizar el efecto de los diferentes sustratos y [EAO][OAc] en la digestión anaerobia.

El índice de Shannon-Weaver (H) para *Bacteria* es mayor en las condiciones Glu-D, HE-D y HES-D respecto al inóculo (Ino-D), lo cual nos indica que el número de especies aumentó a lo largo del proceso con los diferentes sustratos. Entre estas condiciones el índice H es muy similar, siendo ligeramente mayor en la condición HE-D, debido posiblemente a la variedad de sustratos contenidos en los hidrolizados enzimáticos lo cual permitió el desarrollo de varias especies. En el caso de *Archaea*, todas las condiciones tuvieron un valor ligeramente menor del índice H respecto al inóculo, lo que nos indica que la diversidad de estas poblaciones no fue afectada durante el proceso de la digestión anaerobia con los diferentes sustratos utilizados.

Por último, el índice de Simpson (D), el cual indica la dominancia de la especie, las condiciones Glu-D, HE-D y HES-D tuvieron un valor menor respecto al inóculo en el dominio *Bacteria*, lo cual muestra que la diversidad fue mayor en estas condiciones, mientras que en *Archaea* el índice D aumentó para HE-D y HES-D por lo cual el sistema fue más dominado por un grupo trófico comparado con el inóculo, sin embargo, la condición Glu-D tuvo un índice levemente menor al inóculo, indicando una mayor diversidad en el dominio *Archaea*.

Tabla 29. Resumen de datos de la secuenciación genética masiva y análisis filogenético para dominios de *Bacteria* y *Archaea* de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.

	Ino-D	Glu-D	HE-D	HES-D
Número total de secuencias				
<i>Bacteria</i>	13,499	19,868	20,204	24,760
<i>Archaea</i>	7,772	11,344	13,813	19,220
Número de OTUs y cobertura				
Número de OTUs para <i>Bacteria</i>	300	319	332	342
Número de OTUs para <i>Archaea</i>	28	29	21	27
Cobertura de curvas de rarefacción para <i>Bacteria</i> (%)	99.82	99.83	99.87	99.91
Cobertura de curvas de rarefacción para <i>Archaea</i> (%)	99.98	99.97	99.98	99.99
Índices de diversidad				
Índice de Shannon-Weaver para <i>Bacteria</i>	3.40	3.72	3.79	3.73
Índice de Shannon-Weaver para <i>Archaea</i>	1.06	1.03	0.99	0.91
Índice de Simpson para <i>Bacteria</i>	0.120	0.053	0.059	0.069
Índice de Simpson para <i>Archaea</i>	0.517	0.492	0.530	0.556
Índice de Ace para <i>Bacteria</i>	312.63	338.23	345.61	352.85
Índice de Ace para <i>Archaea</i>	28.49	30.72	22.04	27.43

La diversidad microbiana de los dominios *Archaea* y *Bacteria* presentada por los OTUs con abundancia relativa ≥ 1 % fue considerada como dominante, mientras que los OTUs con abundancias relativas menores al 1 % fueron consideradas como *Minor Phyla*. En el caso del dominio *Archaea* un total de 7 OTUs fueron dominantes. La afiliación filogenética del pariente más cercano a los OTUs y su similitud se presenta en el anexo O. Los metanógenos CO₂ reductores OTUs 1, 4, 8 y 15 (*Methanobacterium beijingense* 8-2, *Methanolinea tarda* NOBI-1, *Methanobacterium subterraneum* A8p y *Methanobrevibacter boviskoreani* JH1, respectivamente) representan el ~ 57 % del total de OTUs, siendo el grupo más dominante, mientras que los metanógenos acetoclásticos OTU 2 y 6 (*Methanotherix soehngenii* GP6 y *Methanotherix harundinacea* 8Ac, respectivamente) representan el ~ 28 % del total de OTUs.

En cuanto al dominio *Bacteria* un total de 36 OTUs fueron dominantes, la afiliación filogenética del pariente más cercano a los OTUs y su similitud se presenta en el anexo P. El phylum *Firmicutes* con 13 OTUs representa el ~ 36 % del total de OTUs, siendo el phylum más dominante del sistema. Le sigue en dominancia el phylum *Bacteroidetes* con 8 OTUs representando el ~ 22 % del total de OTUs, mientras que el phylum *Chloroflexi* con 6 OTUs representa el ~ 17 del total de OTUs. En el anexo Q se muestra el árbol de distancia evolutiva de los OTU y secuencias afiliadas del dominio *Archaea* y *Bacteria*.

Por último, las características de las poblaciones bacterianas y arqueas dominantes se encuentran en el anexo R. Están divididos por grupos tróficos, la comunidad *Bacteriana* se encuentra dividida en bacterias fermentativas, fermentadores sintróficos facultativos, acetogénicos sintróficos obligados y bacterias sulfato reductoras, mientras que la comunidad *Archaea* se encuentra dividida en metanógenos reductores de CO₂ y acetotróficos.

3.7.3 Dinámica poblacional de las pruebas en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.

La dinámica de las poblaciones del dominio *Archaea* dominantes en presencia (ADN) se presentan en la Figura 19. Se observó una comunidad compuesta principalmente por los géneros *Methanobacterium*, *Methanothrix* y *Methanolinea*.

Los metanógenos CO₂ reductores fueron el grupo más dominante alcanzando 69.14 %, 74.37 y 75.56 % de abundancia relativa en Glu-D, HE-D y HES-D, respectivamente; la especie más representativa fue *Methanobacterium beijingense* 8-2. Por otra parte, los metanógenos acetótrofos representan el 28.80 %, 24.00 % y 23.10 % siendo el segundo grupo más relevante del sistema; la especie más representativa de este grupo trófico fue *Methanothrix soehngenii* GP6. En general la comunidad del dominio *Archaea* fue muy similar en abundancia relativa de los grupos tróficos entre todas las condiciones, posiblemente debido a esto no existió una diferencia en la producción de metano (Tabla 26).

Finalmente, el OTU 16 afiliado a *Ignisphaera aggregans* DSM 17230 AQ1.S1 pertenece al phylum *Crenarchaeota*, fue únicamente dominante en el inóculo (Ino-D) con 1.119 % de abundancia relativa, aunque utiliza glucosa como fuente de carbono es una arquea hipertermofílica (rango de crecimiento 85 – 95 °C) (Niederberger *et al.*, 2006), por lo cual las condiciones del proceso (37 °C) no permitieron su proliferación.

En un estudio realizado por López-Gutiérrez *et al.*, (2021) utilizando hidrolizados enzimáticos de BATA en un CSTR con un CVA de 6.7 g-DQO/L la comunidad de arqueas fue co-dominada por *Methanosaeta* y *Methanobacterium* con abundancia relativa de 58.4 % y 19.4 %, respectivamente, por lo cual se puede asumir que la producción de metano fue por la ruta acetotrófica, mientras que en este estudio la comunidad arqueana fue dominada por los metanógenos CO₂ reductores.

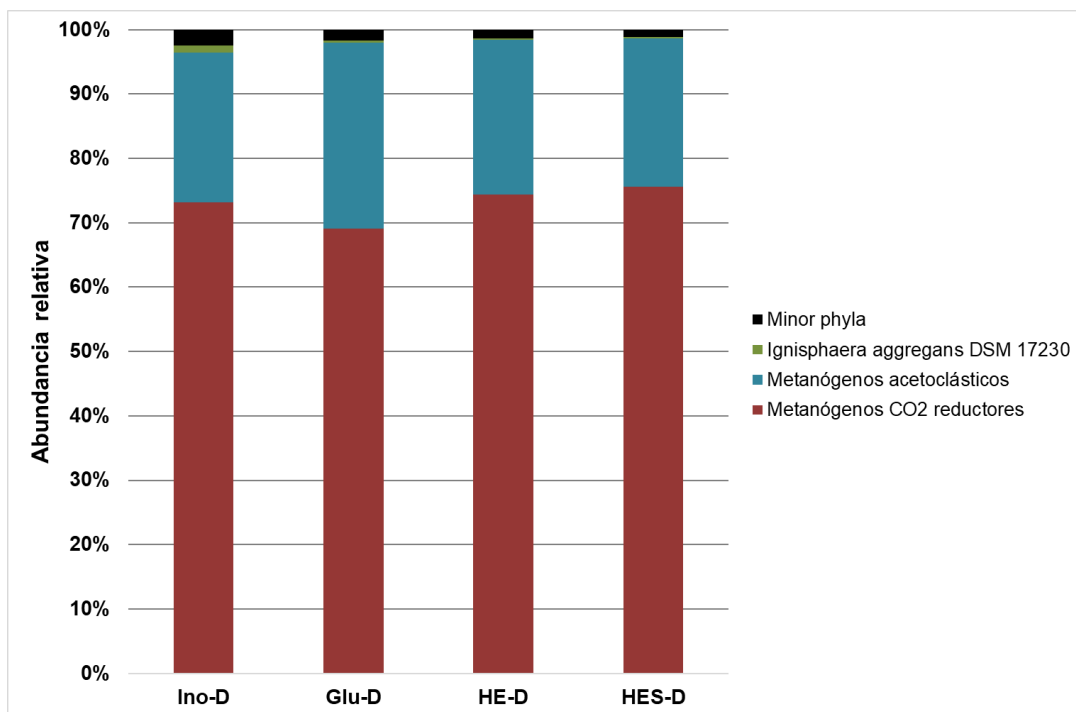


Figura 19. Abundancia relativa (%) de las poblaciones dominantes del dominio *Archaea* de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.

En la dinámica de las poblaciones bacterianas presentes (Figura 20) fue dominada principalmente por el grupo trófico de fermentadores en todas las condiciones con una abundancia relativa de 56.54 %, 45.88 % y 58.27 % Glu-D, HE-D y HES-D, respectivamente. La especie más abundante de este grupo fue *Flavonifractor plautii* 265 (OTU 1, 15 y 75), el cual fermenta glucosa a acetato y butirato (Carlier *et al.*, 2010), teniendo una abundancia relativa en los tratamientos de 24.00 %, 20.48 % y 21.00 %, respectivamente (Anexo R).

Posteriormente en dominancia le sigue *Clostridium quinii* DSM 6736 (OTU 2) el cual fermenta glucosa y xilosa a formiato, acetato, lactato y H₂ (Svensson *et al.*, 1992), esta especie fue más abundante en la condición HES-D con 10.46 % probablemente al estar presente la glucosa y xilosa teniendo así dos fuentes de carbono, aunque en la condición HE-D también se encuentra

presente la xilosa la abundancia relativa fue de 4.27 %, en la condición solo con glucosa (Glu-D) la abundancia relativa fue de 5.15 % (Anexo R).

El siguiente grupo trófico más dominante fueron los fermentadores sintróficos facultativos con 13.46 %, 18.10 % y 15.68 % de abundancia relativa en Glu-D, HE-D y HES-D, respectivamente.

Por último, los acetogénicos sintróficos obligados tuvieron una abundancia relativa de 12.32 % en Glu-D, 10.79 % en HE-D y 4.22 % en HES-D. En las condiciones Glu-D y HE-D aumentó la abundancia de este grupo respecto al inóculo (8.19 %), lo que indica que las condiciones de estas pruebas favorecieron la relación sintrófica permitiendo la proliferación de estas especies. Mientras que en la condición HES-D existió una reducción de ~ 50 % en abundancia respecto al inóculo, siendo la especie no cultivable *Candidatus Cloacamonas* sp la más afectada con 1.07 % de abundancia relativa (Anexo R).

En conclusión, la diversidad de la comunidad bacteria se vio afectada debido a la complejidad de los sustratos, teniendo un impacto negativo en los acetógenos sintróficos obligados en la condición HES-D, mientras que se observó una proliferación en los fermentadores sintróficos facultativos en HE-D aunque los fermentadores se vieron afectados.

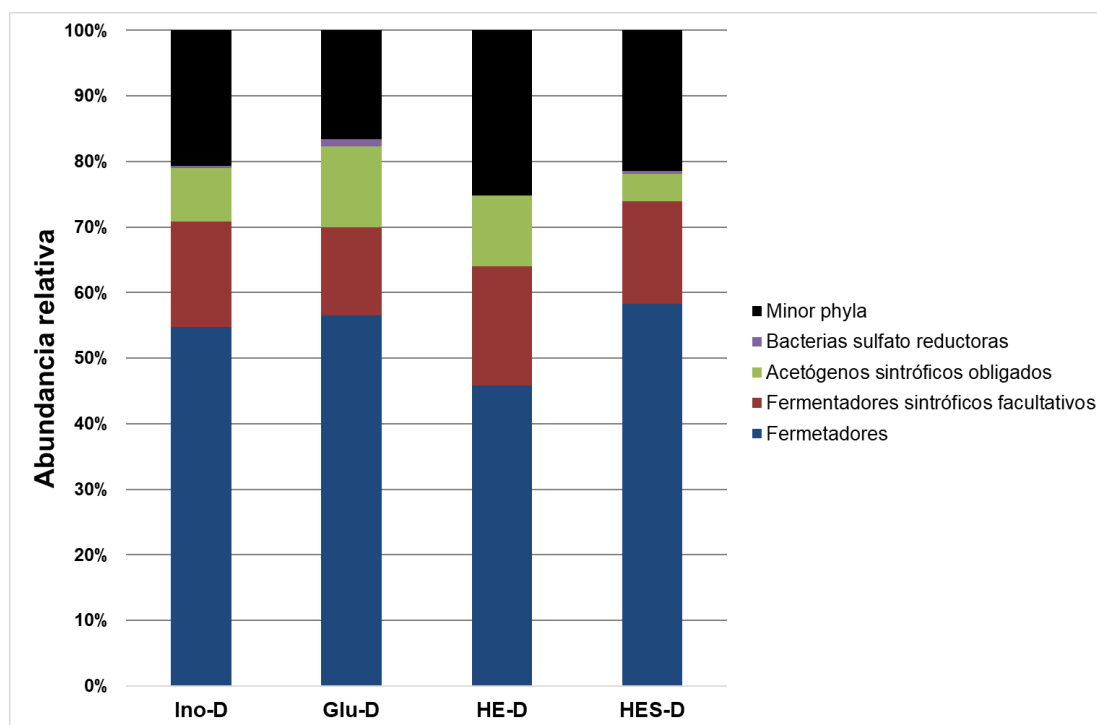


Figura 20. Abundancia relativa (%) de las poblaciones dominantes del dominio Bacteria de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.

3.7.4 Análisis de componentes principales de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.

El ACP indicó que el componente principal 1 explicó el 68.64 % de la varianza total; mientras que, el componente principal 2 explicó el 31.36 %. De acuerdo con los pesos de los componentes de las variables de funcionamiento asociados a los datos de la comunidad microbiana se correlacionaron para obtener cuatro grupos denominados I, II, III y IV (Anexo S).

En la Figura 21 se presenta los cuatro grupos que conforman el ACP de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano excluyendo del análisis la condición del inoculo (Ino-D). El grupo I se explica por el componente principal 1, correlaciono las abundancias relativas de los metanógenos CO₂ reductores (CO₂met) y los fermentadores sintróficos facultativos (FSF) con el índice de diversidad Simpson *Archaea* (DA) y el índice de diversidad Simpson *Bacteria* (DB). La tendencia de las variables incrementó alcanzando los valores más altos en HES-D, en cambio la variable FSF tuvo una tendencia a incrementar en la condición HE-D y disminuir en HES-D. Esta correlación sugiere que la vía CO₂ reductora fue secundaria en el sistema, debido a que los fermentadores sintróficos facultativos como *Ornatilinea apprima*, *Longilinea arvoryzae*, *Bellilinea caldifistulae* y *Leptolinea tardivitalis* suministran el CO₂ y H₂ para los metanógenos CO₂ reductores, al no estar presentes las poblaciones microbianas pertenecientes a la clase *Clostridia*, que forma parte del grupo trófico de fermentadores, productores principales de H₂ y CO₂. Debido a que los metanógenos CO₂ reductores fueron el grupo trófico más dominante para el dominio de *Archaea*, se relacionó al índice de Simpson al indicar la dominancia de las especies *Methanobacterium beijingense* y *Methanobacterium subterraneum* en el sistema (Anexo R). Mientras que, en el caso de *Bacteria*, especies de los fermentadores sintróficos facultativos como *Bellilinea caldifistulae* y *Leptolinea tardivitalis* (OTU 41 y 53) disminuyeron su abundancia relativa menor al 1 % por lo cual dejaron de ser dominantes en la condición HES-D afectando así la dominancia de las demás especies del grupo trófico, por lo tanto, relacionándose con el índice de Simpson.

El grupo II también es explicado por el componente principal 1, correlaciono la abundancia relativa de metanógenos acetoclásticos (Acemt), acetógenos sintróficos obligados (ASO) y fermentadores (Ferm) con el consumo de acetato (ConsAc), la concentración final de propionato (FinPro), volumen de metano (CH₄vol), velocidad volumétrica de producción de metano (VVPM), concentración de DQO removida (gDQO) y el índice de diversidad Shannon *Archaea* (HA). Las tendencias de las variables fueron a disminuir, por lo tanto, los valores más bajos se tuvieron en HES-D, por el contrario, las variables Ferm y gDQO tuvieron la tendencia a disminuir en la condición HE-D y aumentar sus valores en HES-D. Las correlaciones de las

variables sugieren que el volumen de metano producido y la VVPM fue debido a los metanógenos acetoclásticos que consumen acetato, por lo cual la ruta dominante en el sistema fue la vía acetotrófica obligada. Este acetato proviene tanto del medio debido al [EAO][OAc], además del producido por los fermentadores como *Clostridium quinii*, *Flavonifractor plauti* y *Prolixibacter bellariivorans*, a parte de los acetógenos sintróficos obligados que consumen el propionato para producir acetato como la especie no cultivable *Candidatus Cloacamonas* y *Syntrophobacter wolinii* (Anexo R). De igual forma, los fermentadores proveen de propionato al sistema, como las especies *Prolixibacter bellariivorans*, *Paludibacter propionicigenes*, *Succinispira mobilis* y *Bacteroides graminisolvens*. Además, estos grupos tróficos contribuyen a la remoción de DQO en el sistema, al utilizar los azúcares o acetato presentes en el sistema. Al disminuir la abundancia relativa de los metanógenos acetoclásticos perturbo la riqueza de la comunidad *Archaea* ocasionando así una disminución del índice de Shannon (HA).

El grupo III es explicado por el componente principal 2, correlaciono la abundancia relativa de los fermentadores sintróficos facultativos (FSF) y los acetógenos sintróficos obligados (ASO) con el rendimiento de producción de metano (CH₄Y), la concentración final de propionato (FinPro), butirato (FinBut) y el índice de diversidad Shannon *Bacteria* (HB). La tendencia de las variables FinPro y ASO tienden a disminuir sus valores por lo que sugieren que la sintrófia obligada se vio más afectada en la condición de HES-D, al existir menor concentración de propionato, sustrato para los acetógenos sintróficos obligados como la especie no cultivable *Candidatus Cloacamonas* (Anexo R). Mientras que el resto de las variables tienden a incrementar en la condición HE-D y disminuir sus valores en HES-D, por lo cual sugieren que el rendimiento de la producción de metano en todas las condiciones se debió a la presencia de los fermentadores sintróficos facultativos como *Ornatilinea apprima*, *Longilinea arvoryzae* y *Bellilinea caldifistulae* que fermenta la glucosa y xilosa a acetato (Anexo R), sin verse afectados por la concentración de acetato presente en el sistema, sin embargo, la condición HE-D fue la más favorecida al tener los valores de las variables más altas. A pesar de que los acetógenos sintróficos obligados bajan su abundancia relativa, sobre todo en la condición HES-D, se observa una concentración final de propionato más baja en los tratamientos HE-D y HES-D respecto a Glu-D, indicando que las poblaciones que se mantienen dominantes son muy activas. Sin embargo, este fenómeno no se observó con la concentración final de butirato, el cual muestra otra tendencia lo que podría indicar que el metabolismo del butirato si fue afectado por la reducción de la abundancia relativa de las poblaciones sintróficas. Por otro lado, al disminuir la abundancia relativa de los grupos de fermentadores sintróficos facultativos y acetógenos sintróficos obligados afecto la diversidad de las especies en el sistema,

disminuyendo así el índice de diversidad Shannon *Bacteria* (HB), siendo la condición HES-D la más afectada como se mencionó previamente.

Finalmente, el grupo IV es explicado por el componente principal 2, correlaciono la abundancia relativa de fermentadores (Ferm) y el índice de diversidad Simpson *Bacteria* (DB) con la concentración de DQO removida (gDQO). La tendencia de la variable DB fue a incrementar, teniendo el valor más alto en HES-D, mientras que la tendencia de Ferm y gDQO fue a disminuir en la condición HE-D y aumentar sus valores en HES-D. Este grupo sugiere que los fermentadores fueron uno de los grupos tróficos más involucrados en la remoción de DQO a la largo del proceso. La abundancia relativa más baja de los fermentadores fue en condición HE-D, debido a que es el único sustrato que puede contener polisacáridos afectando así la etapa de hidrólisis, al perturbar la velocidad de crecimiento de los fermentadores. Sin embargo, la concentración de DQO removida fue similar al valor del tratamiento con Glu-D, esto pudo deberse por dos situaciones. La primera es que los fermentadores dominantes tengan una alta actividad para fermentar los sustratos disponibles que no son necesarios de hidrolizar, la segunda es que el tratamiento HE-D contenga otros sustratos que abastecen directamente de fuentes de carbono y energía a acetógenos o metanógenos acelerando globalmente la cadena trófica, reflejándose en la concentración de DQO removida. Por último, al ser los fermentadores el grupo trófico más dominantes para el dominio de *Bacteria* fue relacionado al índice de Simpson porque indica la dominancia de las especies en el sistema.

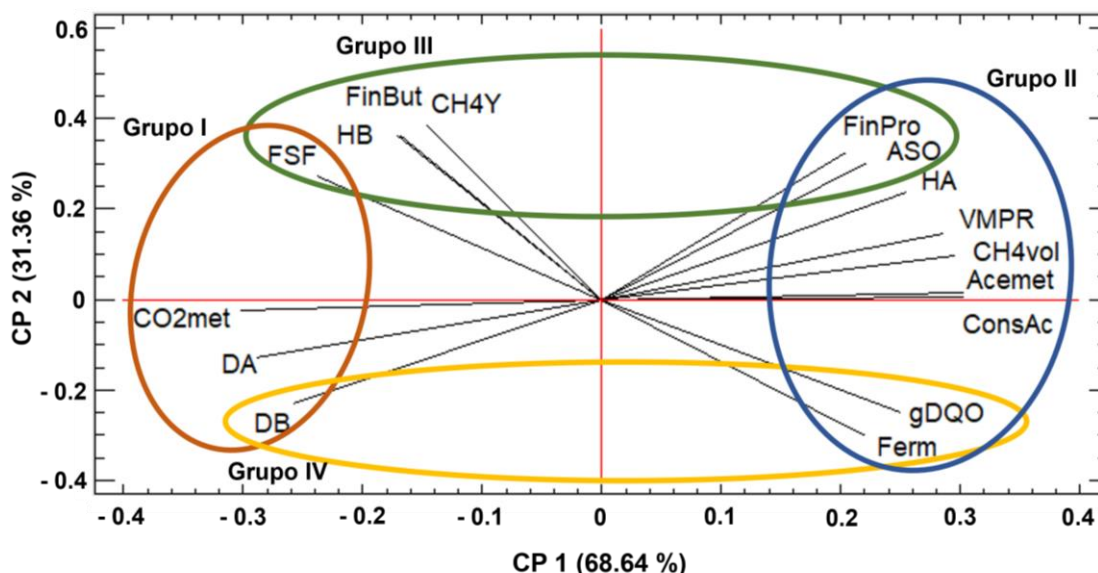


Figura 21. Correlaciones de las variables obtenidas mediante el ACP a partir de los valores de las variables biológicas y fisicoquímicas con base a la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano. Los círculos de cada color indican la formación de los 4 grupos en base al peso de cada variable en los componentes 1 y 2. Abreviaturas: CP:

Componente Principal; CH₄vol: Volumen de metano (NmL); VMPR: Tasa de producción volumétrica de metano (NmL-CH₄/L·d); CH₄Y: Rendimiento (NmL-CH₄/g-DQO removida); gDQO: Concentración de DQO removida (gDQO); ConsAc: Concentración de acetato consumido (g/L); FinPro: Final propionato (g/L); FinBut: Final butirato (g/L); CO₂met: abundancia relativa (a.r.) metanógenos CO₂ reductores; Acemt: a.r. metanógenos acetoclásticos; Ferm: a.r. fermentadores (3 %); FSF: a.r. fermentadores sintróficos facultativos; ASO: a.r. acetógenos sintróficos obligados; HA: Índice de diversidad Shannon *Archaea*; HB: Índice de diversidad Shannon *Bacteria*; DA: Índice de diversidad Simpson *Archaea*; DB: Índice de diversidad Simpson *Bacteria*.

4. Conclusiones y perspectivas

4.1 Conclusiones

En el presente trabajo se realizó una prueba preliminar para estudiar el efecto de una concentración alta de [EAO][OAc] (5 % p/v) y una concentración baja (2.5 % p/v) sobre las comunidades microbianas durante la digestión anaerobia, usando como sustrato 5 g/L de glucosa en ambas pruebas. El análisis metagenómico de las comunidades microbianas presentes mostró que los metanógenos CO₂ reductores fueron el grupo más dominante tanto en baja como alta concentración de [EAO][OAc], concluyéndose que la vía de producción de metano CO₂-reductora pudo ser responsable de la producción de metano. Sin embargo, se observó que los fermentadores sintróficos facultativos productores de acetato, acetógenos sintróficos obligados y metanógenos acetótrofos estuvieron favorecidos en la condición con baja concentración del [EAO][OAc]; evidenciado que las vías acetótrofas facultativa y obligada para la producción de metano estuvieron presentes a dicha concentración. En base al resultado del análisis de componentes principales (ACP) de la prueba preliminar, se sugiere que la concentración del [EAO][OAc] impactó en la sintrofia obligada para la transferencia de acetato fue por la vía de la oxidación del propionato a acetato y CO₂, ya que se correlacionaron los acetógenos sintróficos obligados consumidores de propionato como *Smithella propionica*, *Syntrophobacter wolinii* y *Syntrophorhabdus aromaticivorans* con el volumen de metano, rendimiento y velocidad volumétrica de producción de metano (VVPM). Estas correlaciones confirmaron un efecto negativo sobre la producción de metano a una alta concentración del [EAO][OAc].

En la optimización de la producción de metano durante la digestión anaerobia con la concentración de [EAO][OAc] y glucosa como factores, se confirmó que existió un efecto negativo del aporte de acetato proveniente del [EAO][OAc] en concentraciones mayores a 3.5 % p/v al existir un colapso de la relación sintrófica obligada para la oxidación de acetato entre las poblaciones de acetógenos sintróficos obligados y los metanógenos acetoclásticos debido a una acumulación de propionato y butirato al final del proceso, siendo una concentración inhibitoria en el caso del propionato afectando así la producción de metano.

En las pruebas de potencial bioquímico de metano con diferentes sustratos glucosa, hidrolizados enzimáticos reales de bagazo de *Agave tequilana* var. azul (BATA) e hidrolizados enzimáticos sintéticos de BATA utilizando los valores óptimos obtenidos, se alcanzó un volumen acumulado de ~ 2600 NmL de CH₄, no existió una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de estos tratamientos. De igual forma, otros parámetros como DQO removida, VVPM y rendimiento fueron muy similares entre estas condiciones. Por otra

parte, el volumen acumulado alcanzó un ~ 90 % de la producción máxima teórica esperada de acuerdo con la metodología de superficie de respuesta, por lo cual la validación de las condiciones optimizadas fue bastante cercana a la predicción del modelo. En cuanto a la condición con solo [EAO][OAc] (2.234 % p/v) alcanzó un volumen de 1920 NmL, teniendo el menor rendimiento y VVPM entre todas las muestras, sin embargo, se puede corroborar que a esta concentración las comunidades microbianas pueden utilizar el [EAO][OAc] como sustrato para la digestión anaerobia.

Respecto a las dinámicas de las poblaciones microbianas de las pruebas de potencial bioquímico de metano con diferentes sustratos utilizando los valores óptimos obtenidos, la comunidad del dominio *Archaea* fue muy similar en abundancia relativa de los grupos tróficos entre todas las condiciones, siendo dominada por los metanógenos CO₂ reductores. En cuanto al dominio *Bacteria*, la diversidad de las comunidades microbianas se vio afectada por la complejidad de los sustratos utilizados, los fermentadores fueron el grupo dominante en todas las condiciones, a pesar de ello la condición con los hidrolizados reales tuvo la abundancia relativa más baja (45.88 %) entre todos los tratamientos, posiblemente debido a que en los hidrolizados reales se puede encontrar además de monosacáridos (glucosa y xilosa), restos de polisacáridos lo cual afectó el desarrollo de los fermentadores.

Por otro lado, en el grupo trófico de los acetogénicos sintróficos obligados existió una reducción de ~ 50 % en abundancia respecto al inóculo en la condición con hidrolizados sintéticos, mientras que en las condiciones con glucosa e hidrolizados reales aumentó la abundancia de este grupo respecto al inóculo, lo que indica que las condiciones de estas pruebas favorecieron la relación sintrófica permitiendo la proliferación de estas especies.

Finalmente, el ACP de esta prueba sugiere que la ruta dominante en el sistema fue la vía acetotrófica obligada, al correlacionar los parámetros de volumen de metano producido y la VVPM con los metanógenos acetoclásticos y los acetógenos sintróficos obligados, mientras que la ruta secundaria fue la vía CO₂ reductora, donde los fermentadores sintróficos facultativos fueron los proveedores de sustrato para los metanógenos CO₂ reductores.

4.2 Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se proponen las siguientes actividades para estudios posteriores:

- Estudiar el efecto del [EOA][OAc] en la digestión anaerobia en reactores continuos o semicontínuos, partiendo del uso de hidrolizados enzimáticos sintéticos con el fin de encontrar las mejores condiciones de operación, para posteriormente cambiar a hidrolizados enzimáticos reales. En ambos casos, caracterizar las comunidades microbianas utilizando ADN genómico y ARN-ADN complementario mediante metagenómica y metatranscriptómica.
- Analizar la cinética del consumo de azúcares totales a lo largo de la digestión anaerobia para conocer el desarrollo del sistema.
- Evaluar la monoetanolamina como fuente de nitrógeno y su impacto en la digestión anaerobia con un co-sustrato como glucosa, realizando determinaciones de nitrógeno total a lo largo del proceso.
- Evaluar la configuración one-pot desde el pretratamiento del BATA con [EAO][OAc] hasta la digestión anaerobia para analizar el comportamiento de las comunidades microbianas a lo largo del proceso utilizando ADN genómico y ARN-ADN complementario mediante metagenómica y metatranscriptómica.
- Analizar el consumo del [EAO][OAc] durante la digestión anaerobia por medio de FTIR, considerando los metabolitos generados durante el proceso en los blancos utilizados.

Bibliografía

- Abraham, A. *et al.* (2020) 'Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass', *Bioresource Technology*, 301, p. 122725. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122725.
- Akasaka, H. *et al.* (2003) 'Propionicimonas paludicola gen. nov., sp. nov., a novel facultatively anaerobic, Gram-positive, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), pp. 1991–1998. doi: 10.1099/ijs.0.02764-0.
- Alayoubi, R. *et al.* (2020) 'Low temperature ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass to enhance bioethanol yield', *Renewable Energy*, 145, pp. 1808–1816. doi: 10.1016/j.renene.2019.07.091.
- Allison, S. D. and Martiny, J. B. H. (2008) 'Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities', *In the Light of Evolution*, 2, pp. 149–166. doi: 10.17226/12501.
- Álvarez, V. H. *et al.* (2010) 'Synthesis and thermophysical properties of two new protic long-chain ionic liquids with the oleate anion', *Fluid Phase Equilibria*, 299(1), pp. 42–50. doi: 10.1016/j.fluid.2010.08.022.
- Amani, T., Nosrati, M. and Sreekrishnan, T. R. (2010) 'Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects - A review', *Environmental Reviews*, 18(1), pp. 255–278. doi: 10.1139/A10-011.
- Amha, Y. M. *et al.* (2018) 'Inhibition of anaerobic digestion processes: Applications of molecular tools', *Bioresource Technology*, 247, pp. 999–1014. doi: 10.1016/j.biortech.2017.08.210.
- Amin, F. R. *et al.* (2017) 'Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion', *Amb Express*, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13568-017-0375-4.
- Anderson, I. J. *et al.* (2009) 'Complete genome sequence of staphylothermus marinus stetter and fiala 1986 type strain F1', *Standards in Genomic Sciences*, 1(2), pp. 183–188. doi: 10.4056/sigs.30527.
- Arreola Vargas, J. *et al.* (2016) 'Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of Agave tequilana bagasse', *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(2), pp. 897–904. doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.11.016.
- Arreola Vargas, J. *et al.* (2018) 'Effect of the organic loading rate on the performance and microbial populations during the anaerobic treatment of tequila vinasses in a pilot-scale packed bed reactor', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(2), pp. 591–599. doi: 10.1002/jctb.5413.
- Bae, H. S. *et al.* (2006) 'Brooklawnia cerclae gen. nov., sp. nov., a propionate-forming bacterium isolated from chlorosolvent-contaminated groundwater', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), pp. 1977–1983. doi: 10.1099/ijs.0.64317-0.
- Barbosa, F. C. *et al.* (2020) 'Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes', *Biomass and Bioenergy*, 141, p. 105697. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105697>.
- Baruah, J. *et al.* (2018) 'Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products', *Frontiers in Energy Research*, 6, pp. 1–19. doi: 10.3389/fenrg.2018.00141.
- Beat A. Huser; Karl Wuhrmann; Alexander J. B. Zehnder (1982) 'Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in Methanotherix soehngenii and Methanosarcina spp', *FEMS Microbiology Reviews*, 8, pp. 181–197.
- Bhatia, S. K. *et al.* (2020) 'Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges', *Bioresource Technology*, 300, p. 122724. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122724.
- Breitenstein, A. *et al.* (2002) 'Reclassification of Clostridium hydroxybenzoicum as Sedimentibacter hydroxybenzoicus gen. nov., comb. nov., and description of Sedimentibacter saalensis sp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), pp. 801–807. doi: 10.1099/ijs.0.01998-0.

- Breton Deval, L. *et al.* (2018) 'Agave tequilana bagasse for methane production in batch and sequencing batch reactors: Acid catalyst effect, batch optimization and stability of the semi-continuous process', *Journal of Environmental Management*, 224, pp. 156–163. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.07.053.
- Brune, A. *et al.* (2022) 'A new family for "termite gut treponemes": description of Breznakiellaceae fam. nov., Gracilinema caldarium gen. nov., comb. nov., Leadbettera azotonutricia gen. nov., comb. nov., Helmutkoenigia isopterocolens gen. nov., comb. nov., and Zuelzera stenostre', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(5), pp. 1–6. doi: 10.1099/ijsem.0.005439.
- Cabezas, A. *et al.* (2015) 'How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?', *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), pp. 555–593. doi: 10.1007/s11157-015-9380-8.
- Castillo Preciado, D. J. (2022) 'Optimización de la sacarificación de bagazo de Agave tequilana pretratado con el líquido iónico acetato de etanolamina y su efecto en la producción de metano', *Tesis de Maestría - Universidad de Guadalajara*.
- Carlier, J. P. *et al.* (2010) 'Proposal to unify Clostridium orbiscindens Winter et al. 1991 and Eubacterium plautii (Séguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982, with description of Flavonifractor plautii gen. nov., comb. nov., and reassignment of Bacteroides capillosus to Pseudoflavonifrac', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3), pp. 585–590. doi: 10.1099/ijms.0.016725-0.
- Chen, J. L. *et al.* (2014) 'Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review', *Biotechnology Advances*, 32(8), pp. 1523–1534. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.005.
- Cho, C. W. *et al.* (2021) 'Review of the toxic effects of ionic liquids', *Science of the Total Environment*, 786, p. 147309. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147309.
- CIATEJ (2017) *Panorama del aprovechamiento de los agaves en México, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves*. Available at: www.agared.org.
- Collins, M. D. and Shah, H. N. (1986) 'Reclassification of Bacteroides praeacutus Tissier (Holdeman and Moore) in a new genus, Tissierella, as Tissierella praeacuta comb. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36(3), pp. 461–463. doi: 10.1099/00207713-36-3-461.
- Corona-González, R. I. *et al.* (2016) 'Bagasse hydrolyzates from Agave tequilana as substrates for succinic acid production by Actinobacillus succinogenes in batch and repeated batch reactor', *Bioresource Technology*, 205, pp. 15–23. doi: 10.1016/j.biortech.2015.12.081.
- Costa, K. C. and Leigh, J. A. (2014) 'Metabolic versatility in methanogens', *Current Opinion in Biotechnology*, 29(1), pp. 70–75. doi: 10.1016/j.copbio.2014.02.012.
- Costa, S. P. F. *et al.* (2015) 'Toxicity assessment of ionic liquids with Vibrio fischeri: An alternative fully automated methodology', *Journal of Hazardous Materials*, 284, pp. 136–142. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.10.049.
- CRT (2023) Consejo Regulador del Tequila, Acceso: 26.07.2023. Available at: <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>.
- Cruz Cedeño, M. and Álvarez Jacobs, J. (2003) 'Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes', in *Production of tequila from agave: historical influences and contemporary processes*, pp. 225–242.
- Dridi, B. *et al.* (2012) 'Methanomassiliicoccus luminyensis gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), pp. 1902–1907. doi: 10.1099/ijms.0.033712-0.
- DuBois, M. *et al.* (1956) 'Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances', *Analytical Chemistry*, 28(3), pp. 350–356. doi: 10.1021/ac60111a017.
- Duran-Cruz, V., Hernández, S. and Ortíz, I. (2021) 'Evaluation of Steam Explosion Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis Conditions for Agave Bagasse in Biomethane Production', *Bioenergy Research*, 14(4), pp. 1328–1337. doi: 10.1007/s12155-021-10245-9.

- Feng, L. and Chen, Z. (2008) 'Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids', *Journal of Molecular Liquids*, 142(1), pp. 1–5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2008.06.007>.
- Flieger, J. and Flieger, M. (2020) 'Ionic liquids toxicity—benefits and threats', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), pp. 1–41. doi: 10.3390/ijms21176267.
- Flores-Gómez, C. A. *et al.* (2018) 'Conversion of lignocellulosic agave residues into liquid biofuels using an AFEX™-based biorefinery', *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), p. 7. doi: 10.1186/s13068-017-0995-6.
- Friedrich, M. *et al.* (1996) 'Two New Strict Anaerobes Growing with Glycolic Acid', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4), pp. 1065–1069.
- Gama, R., Van Dyk, J. S. and Pletschke, B. I. (2015) 'Optimisation of enzymatic hydrolysis of apple pomace for production of biofuel and biorefinery chemicals using commercial enzymes', *3 Biotech*, 5(6), pp. 1075–1087. doi: 10.1007/s13205-015-0312-7.
- García, J., Patel, B. K. C. and Ollivier, B. (2000) 'Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea', *Anaerobe*, 6(4), pp. 205–226. doi: 10.1006/anae.2000.0345.
- García-López, R. M. (2020) 'Pretratamiento de bagazo de Agave tequilana con mezclas de líquido iónico-agua para mejorar su digestibilidad en procesos de digestión anaerobia', *Tesis de Maestría - Universidad de Guadalajara*.
- Gerardi, M. H. (2003) *The microbiology of anaerobic digesters*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Godon, J. J. *et al.* (1997) 'Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis', *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), pp. 2802–2813. doi: 10.1128/aem.63.7.2802-2813.1997.
- González-García, Y. *et al.* (2019) 'Tequila agave bagasse hydrolysate for the production of polyhydroxybutyrate by *Burkholderia sacchari*', *Bioengineering*, 6(4), p. 115. doi: 10.3390/bioengineering6040115.
- Grabowski, A. *et al.* (2005) 'Petrimonas sulfuriphila gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), pp. 1113–1121. doi: 10.1099/ijs.0.63426-0.
- Hameed, S. A. *et al.* (2019) 'Microbial population dynamics in temperature-phased anaerobic digestion of municipal wastewater sludge', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 94(6), pp. 1816–1831. doi: 10.1002/jctb.5955.
- Han, S. I. *et al.* (2013) 'Planifilum composti sp. nov., a thermophile isolated from compost', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, pp. 4557–4561. doi: 10.1099/ijs.0.053199-0.
- Ben Hania, W. *et al.* (2013) 'Mesotoga infera sp. nov., a mesophilic member of the order Thermotogales, isolated from an underground gas storage aquifer', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, pp. 3003–3008. doi: 10.1099/ijs.0.047993-0.
- Hasanov, I., Raud, M. and Kikas, T. (2020) 'The role of ionic liquids in the lignin separation from lignocellulosic biomass', *Energies*, 13(18), pp. 1–24. doi: 10.3390/en13184864.
- Hernández Meléndez, O. *et al.* (2016) 'Characterization of Blue Agave Bagasse (BAB) as Raw Material for Bioethanol Production Processes by Gravimetric, Thermal, Chromatographic, X-ray Diffraction, Microscopy, and Laser Light Scattering Techniques', *Bioenergy Research*, 9(4), pp. 985–997. doi: 10.1007/s12155-016-9760-0.
- Ho, D., Jensen, P. and Batstone, D. (2014) 'Effects of temperature and hydraulic retention time on acetotrophic pathways and performance in high-rate sludge digestion', *Environmental Science and Technology*, 48(11), pp. 6468–6476. doi: 10.1021/es500074j.
- Holliger, C. *et al.* (1998) 'Dehalobacter restrictus gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration', *Archives of*

Microbiology, 169(4), pp. 313–321. doi: 10.1007/s002030050577.

Holmes, D. E. *et al.* (2007) 'Prolixibacter bellariivorans gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting, psychrotolerant anaerobe of the phylum Bacteroidetes, isolated from a marine-sediment fuel cell', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(4), pp. 701–707. doi: 10.1099/ijs.0.64296-0.

Horino, H., Fujita, T. and Tonouchi, A. (2014) 'Description of *Anaerobacterium chartisolvans* gen. nov., sp. nov., an obligately anaerobic bacterium from Clostridium rRNA cluster III isolated from soil of a Japanese rice field, and reclassification of *Bacteroides cellulosolvans* Murray *et al.* 1984 as *Pse*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, pp. 1296–1303. doi: 10.1099/ijs.0.059378-0.

Hou, Q. *et al.* (2017) 'Pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquids and ionic liquid-based solvent systems', *Molecules*, 22(3), pp. 1–24. doi: 10.3390/molecules22030490.

Hu, T. *et al.* (2021) 'Next-generation sequencing technologies: An overview', *Human Immunology*, 82(11), pp. 801–811. doi: 10.1016/j.humimm.2021.02.012.

Huron, M. *et al.* (2016) 'Mechanistic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose integrating substrate morphology and cocktail composition', *Biotechnology and Bioengineering*, 113(5), pp. 1011–1023. doi: 10.1002/bit.25873.

Imachi, H. *et al.* (2008) 'Methanolinea tarda gen. nov., sp. nov. a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), pp. 294–301. doi: 10.1099/ijs.0.65394-0.

Iñiguez, C. G. *et al.* (2014) 'Recycling Agave Bagasse of the Tequila Industry', *Advances in Chemical Engineering and Science*, 04(02), pp. 135–142. doi: 10.4236/aces.2014.42016.

Janssen, P. H. and O'Farrell, K. A. (1999) 'Succinispira mobilis gen. nov., sp. nov., a succinate-decarboxylating anaerobic bacterium', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(3), pp. 1009–1013. doi: 10.1099/00207713-49-3-1009.

Jianga, Y. *et al.* (2003) 'The human-derived novel gut commensal *Luoshenia tenuis* regulates body weight and food intake in mice', *Food Science and Human Wellness*.

Kamagata, Y. (2015) 'Syntrophy in Anaerobic Digestion', *Anaerobic Biotechnology*, pp. 13–30. doi: 10.1142/9781783267910_0002.

Kaval, K. G. and Garsin, D. A. (2018) 'Ethanolamine Utilization in Bacteria', *ASM Journals*, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.1128/mBio.00066-18.

Khan, I. U. *et al.* (2017) 'Biogas as a renewable energy fuel – A review of biogas upgrading, utilization and storage', *Energy Conversion and Management*, 150, pp. 277–294. doi: 10.1016/j.enconman.2017.08.035.

Kim, B. R. *et al.* (2017) 'Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), pp. 2089–2093. doi: 10.4014/jmb.1709.09027.

Koelschbach, J. S. *et al.* (2017) '*Rectinema cohabitans* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped spirochaete isolated from an anaerobic naphthalene-degrading enrichment culture', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), pp. 1288–1295. doi: 10.1099/ijsem.0.001799.

Kotelnokova, S., Macraio, A. J. L. and Pedersen, K. (1998) '*Methanobacterium subterraneurn*', *International journal of systematic bacteriology*, 48, pp. 357–367.

Kumar, A. K. and Sharma, S. (2017) 'Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review', *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), pp. 1–19. doi: 10.1186/s40643-017-0137-9.

Kumar, A. and Ram, C. (2021) 'Agave biomass: a potential resource for production of value-added products', *Environmental Sustainability*, 4(2), pp. 245–259. doi: 10.1007/s42398-021-00172-y.

- Kumari, D. and Singh, R. (2018) 'Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, pp. 877–891. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111>.
- Kwong, W. K. and Moran, N. A. (2016) 'Apibacter adventoris gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from honey bees', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), pp. 1323–1329. doi: 10.1099/ijsem.0.000882.
- Latif, M. A., Mehta, C. M. and Batstone, D. J. (2017) 'Influence of low pH on continuous anaerobic digestion of waste activated sludge', *Water Research*, 113, pp. 42–49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.002>.
- Lee, J. H. *et al.* (2013) 'Methanobrevibacter boviskoreani sp. nov., isolated from the rumen of Korean native cattle', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(11), pp. 4196–4201. doi: 10.1099/ijs.0.054056-0.
- Lee, Y. J. *et al.* (2006) 'Gracilibacter thermotolerans gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermotolerant bacterium from a constructed wetland receiving acid sulfate water', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9), pp. 2089–2093. doi: 10.1099/ijs.0.64040-0.
- Leng, L. *et al.* (2018) 'A review on the bioenergetics of anaerobic microbial metabolism close to the thermodynamic limits and its implications for digestion applications', *Bioresource Technology*, 247, pp. 1095–1106. doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.103.
- Li, Y., Chen, Y. and Wu, J. (2019) 'Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review', *Applied Energy*, 240, pp. 120–137. doi: 10.1016/j.apenergy.2019.01.243.
- Liu, Y. *et al.* (1999) 'Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), pp. 545–556.
- López-Gutiérrez, I. *et al.* (2021) 'Evaluation of the continuous methane production from an enzymatic agave bagasse hydrolysate in suspended (CSTR) and granular biomass systems (UASB)', *Fuel*, 304, p. 121406. doi: 10.1016/j.fuel.2021.121406.
- López López, A. *et al.* (2010) 'Tequila vinasses: Generation and full scale treatment processes', *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 9(2), pp. 109–116. doi: 10.1007/s11157-010-9204-9.
- Lourinho, G., Rodrigues, L. F. T. G. and Brito, P. S. D. (2020) 'Recent advances on anaerobic digestion of swine wastewater', *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(12), pp. 4917–4938. doi: 10.1007/s13762-020-02793-y.
- Ma, K., Liu, X. and Dong, X. (2005) 'Methanobacterium beijingense sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), pp. 325–329. doi: 10.1099/ijs.0.63254-0.
- Ma, K., Liu, X. and Dong, X. (2006) 'Methanosaeta harundinacea sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), pp. 127–131. doi: 10.1099/ijs.0.63887-0.
- Malgas, S. *et al.* (2020) 'Enzymatic hydrolysis of softwood derived paper sludge by an in vitro recombinant cellulase cocktail for the production of fermentable sugars', *Catalysts*, 10(7). doi: 10.3390/catal10070775.
- Mankar, A. R. *et al.* (2021) 'Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances', *Bioresource Technology*, 334, p. 125235. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125235.
- Manyi Loh, C. E. *et al.* (2019) 'Microbial anaerobic digestion: process dynamics and implications from the renewable energy, environmental and agronomy perspectives', *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(7), pp. 3913–3934. doi: 10.1007/s13762-019-02380-w.
- Mayilraj, S. *et al.* (2009) 'Desulfonauticus autotrophicus sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium isolated from oil-production water and emended description of the genus *Desulfonauticus*', *Extremophiles*, 13(2), pp. 247–255. doi: 10.1007/s00792-008-0212-4.

- McCarty, P. L. (1964) 'Anaerobic Waste Treatment Fundamentals', *Public Works*, 95, pp. 91–94.
- Millati, R. *et al.* (2020) 'Pretreatment technologies for anaerobic digestion of lignocelluloses and toxic feedstocks', *Bioresource Technology*, 304, p. 122998. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122998.
- Mori, K. and Harayama, S. (2011) 'Methanobacterium petrolearium sp. nov. and Methanobacterium ferruginis sp. nov., mesophilic methanogens isolated from salty environments', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), pp. 138–143. doi: 10.1099/ijs.0.022723-0.
- Mutungwazi, A., Ijoma, G. N. and Matambo, T. S. (2021) 'The significance of microbial community functions and symbiosis in enhancing methane production during anaerobic digestion: a review', *Symbiosis*, 83(1), pp. 1–24. doi: 10.1007/s13199-020-00734-4.
- Nadkarni, M. A. *et al.* (2002) 'Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set', *Microbiology*, 148(1), pp. 257–266. doi: 10.1099/00221287-148-1-257.
- Nakahara, N. *et al.* (2019) 'Aggregatilinea lenta gen. Nov., sp. nov., a slow-growing, facultatively anaerobic bacterium isolated from subseafloor sediment, and proposal of the new order aggregatilineales ord. nov. within the class anaerolineae of the phylum chloroflexi', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(4), pp. 1185–1194. doi: 10.1099/ijsem.0.003291.
- Nelson, M. C., Morrison, M. and Yu, Z. (2011) 'A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters', *Bioresource Technology*, 102(4), pp. 3730–3739. doi: 10.1016/j.biortech.2010.11.119.
- Nesbø, C. L. *et al.* (2012) 'Mesotoga prima gen. nov., sp. nov., the first described mesophilic species of the Thermotogales', *Extremophiles*, 16(3), pp. 387–393. doi: 10.1007/s00792-012-0437-0.
- Niederberger, T. D. *et al.* (2006) 'Ignisphaera aggregans gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic crenarchaeote isolated from hot springs in Rotorua and Tokaanu, New Zealand', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), pp. 965–971. doi: 10.1099/ijs.0.63899-0.
- Nishiyama, T. *et al.* (2009) 'Bacteroides graminisolvans sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), pp. 1901–1907. doi: 10.1099/ijs.0.008268-0.
- Olatunji, K. O., Ahmed, N. A. and Ogunkunle, O. (2021) 'Optimization of biogas yield from lignocellulosic materials with different pretreatment methods: a review', *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), pp. 1–34. doi: 10.1186/s13068-021-02012-x.
- Palomo-Briones, R. *et al.* (2018) 'Agave bagasse biorefinery: processing and perspectives', *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(7), pp. 1423–1441. doi: 10.1007/s10098-017-1421-2.
- Passino, R. M. A. Y. and Smith, B. (1987) 'Acute bioassays and hazard evaluation of representative contaminants detected in great lakes fish', *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 6(11), pp. 901–907. doi: 10.1002/etc.5620061111.
- Pelletier, E. *et al.* (2008) "'Candidatus Cloacamonas acidaminovorans": Genome sequence reconstruction provides a first glimpse of a new bacterial division', *Journal of Bacteriology*, 190(7), pp. 2572–2579. doi: 10.1128/JB.01248-07.
- Pérez-Pimienta, J. *et al.* (2022) 'One-pot ethanol production under optimized pretreatment conditions using agave bagasse at high solids loading with low-cost biocompatible protic ionic liquid.', *Green Chemistry*, 24, pp. 207-217. doi: 10.1039/x0xx00000x.
- Pérez-Pimienta, J. A. *et al.* (2013) 'Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass', *Bioresource Technology*, 127, pp. 18–24. doi: 10.1016/j.biortech.2012.09.124.
- Pérez-Pimienta, J. A. *et al.* (2016) 'Evaluation of agave bagasse recalcitrance using AFEX™, autohydrolysis, and ionic liquid pretreatments', *Bioresource Technology*, 211, pp. 216–223. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.103.

- Pérez-Pimienta, J. A., Vargas-Tah, A., *et al.* (2017) 'Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production', *Bioresource Technology*, 225, pp. 191–198. doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.064.
- Pérez-Pimienta, J. A., Sathitsuksanoh, N., *et al.* (2017) 'Ternary ionic liquid-water pretreatment systems of an agave bagasse and municipal solid waste blend', *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s13068-017-0758-4.
- Pérez-Pimienta, J. A. *et al.* (2019) 'Mild reaction conditions induce high sugar yields during the pretreatment of Agave tequilana bagasse with 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate', *Bioresource Technology*, 275, pp. 78–85. doi: 10.1016/j.biortech.2018.12.041.
- Pérez-Pimienta, J. A. *et al.* (2020) 'Bioderived ionic liquid-based pretreatment enhances methane production from: Agave tequilana bagasse', *RSC Advances*, 10(24), pp. 14025–14032. doi: 10.1039/d0ra01849j.
- Pérez-Pimienta, J. A. *et al.* (2021) 'Ionic liquid-water mixtures enhance pretreatment and anaerobic digestion of agave bagasse', *Industrial Crops and Products*, 171, p. 113924. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113924.
- Pernak, J., Sobaszekiewicz, K. and Mirska, I. (2003) 'Anti-microbial activities of ionic liquids', *Green Chemistry*, 5(1), pp. 52–56. doi: 10.1039/b207543c.
- Pino, M. S. *et al.* (2019) 'Enhancement and modeling of enzymatic hydrolysis on cellulose from agave bagasse hydrothermally pretreated in a horizontal bioreactor', *Carbohydrate Polymers*, 211, pp. 349–359. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.111>.
- Poddar, B. J. *et al.* (2021) 'A comprehensive review on the pretreatment of lignocellulosic wastes for improved biogas production by anaerobic digestion', *International Journal of Environmental Science and Technology*, (0123456789). doi: 10.1007/s13762-021-03248-8.
- Podosokorskaya, O. A. *et al.* (2013) 'Ornatilinea apprima gen. nov., sp. nov., a cellulolytic representative of the class Anaerolineae', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(1), pp. 86–92. doi: 10.1099/ijs.0.041012-0.
- Pradel, N. *et al.* (2020) 'Anaerohalosphaera lusitana gen. nov., sp. nov., and limihaloglobus sulfuriphilus gen. nov., sp. nov., isolated from solar saltern sediments, and proposal of anaerohalosphaeraceae fam. nov. within the order sedimentisphaerales', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(2), pp. 1321–1330. doi: 10.1099/ijsem.0.003919.
- Prasad, B. R., Padhi, R. K. and Ghosh, G. (2022) 'A review on key pretreatment approaches for lignocellulosic biomass to produce biofuel and value-added products', *International Journal of Environmental Science and Technology*, pp. 1–16. doi: 10.1007/s13762-022-04252-2.
- Qatibi, A. I., Niviere, V. and Garcia, J. L. (1991) 'Desulfovibrio alcoholovorans sp. nov., a sulfate-reducing bacterium able to grow on glycerol, 1, 2-and 1, 3-propanediol', *Archives of Microbiology*, 155, pp. 143–148.
- Qiu, Y. L. *et al.* (2008) 'Syntrophorhabdus aromaticivorans gen. nov., sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), pp. 2051–2058. doi: 10.1128/AEM.02378-07.
- Qiu, Y. L. *et al.* (2014) 'Lactivibrio alcoholicus gen. nov., sp. nov., an anaerobic, mesophilic, lactate-, alcohol-, carbohydrate- and amino-acid-degrading bacterium in the phylum Synergistetes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(6), pp. 2137–2145. doi: 10.1099/ijs.0.060681-0.
- Rajagopal, R., Massé, D. I. and Singh, G. (2013) 'A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia', *Bioresource Technology*, 143, pp. 632–641. doi: 10.1016/j.biortech.2013.06.030.
- Rieland, J. M. and Love, B. J. (2020) 'Ionic liquids: A milestone on the pathway to greener recycling of cellulose from biomass', *Resources, Conservation and Recycling*, 155(September 2019), p. 104678. doi:

10.1016/j.resconrec.2019.104678.

Ritalahti, K. M. *et al.* (2011) 'Sphaerochaeta globosa gen. nov., sp. nov. and sphaerochaeta pleomorpha sp. nov., free-living, spherical spirochaetes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(1), pp. 210–216. doi: 10.1099/ijs.0.023986-0.

Rocha, E. G. A. *et al.* (2017) 'Evaluation of the use of protic ionic liquids on biomass fractionation', *Fuel*, 206, pp. 145–154. doi: 10.1016/j.fuel.2017.06.014.

Saucedo-Luna, J. *et al.* (2011) 'Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(6), pp. 725–732. doi: 10.1007/s10295-010-0853-z.

Schink, B. and Stams, A. J. M. (2006) *Syntrophism among Prokaryotes, The Prokaryotes: Vol. 2: Ecophysiology and Biochemistry*. New York: Springer International Publishing.

Schipp, C. J. *et al.* (2013) 'Organic cofactors in the metabolism of dehalococcoides mccartyi strains', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1616). doi: 10.1098/rstb.2012.0321.

Semerci, I. and Güler, F. (2018) 'Protic ionic liquids as effective agents for pretreatment of cotton stalks at high biomass loading', *Industrial Crops and Products*, 125, pp. 588–595. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.046>.

Simpson, E. (1949) 'Measurement of Diversity', *Nature*, 163(1943), p. 688. Available at: <https://doi.org/10.1038/163688a0>.

Slobodkina, G. B. *et al.* (2012) 'Carboxydocella manganica sp. nov., a thermophilic, dissimilatory Mn(IV)- and Fe(III)-reducing bacterium from a Kamchatka hot spring', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(4), pp. 890–894. doi: 10.1099/ijs.0.027623-0.

Snell Castro, R. *et al.* (2019) 'Active prokaryotic population dynamics exhibit high correlation to reactor performance during methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana var. azul bagasse', *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), pp. 1618–1630. doi: 10.1111/jam.14234.

Sriariyanun, M. *et al.* (2022) 'One-Pot Ionic Liquid-Mediated Bioprocess for Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw with Ionic Liquid-Tolerance Bacterial Cellulase', *Bioengineering*, 9(1). doi: 10.3390/bioengineering9010017.

Suen, G. *et al.* (2011) 'The complete genome sequence of fibrobacter succinogenes s85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist', *PLoS ONE*, 6(4). doi: 10.1371/journal.pone.0018814.

Sun, J. *et al.* (2017) 'One-pot integrated biofuel production using low-cost biocompatible protic ionic liquids', *Green Chemistry*, 19(13), pp. 3152–3163. doi: 10.1039/c7gc01179b.

Sun, W. *et al.* (2020) 'Puteibacter caeruleilacunae gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic bacterium isolated from Yongle Blue Hole in the South China Sea', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3), pp. 1623–1629. doi: 10.1099/ijsem.0.003948.

Sun, Y.-X. *et al.* (2018) 'Screening of potential IL-tolerant cellulases and their efficient saccharification of IL-pretreated', *RSC Advances*, 8(54), pp. 30957–30965. doi: 10.1039/c8ra05729j.

Svensson, B. H. *et al.* (1992) 'Clostridium quinii sp. nov., a new saccharolytic anaerobic bacterium isolated from granular sludge.', *Archives of microbiology*, 157, pp. 97–103.

Tan, H. T. and Lee, K. T. (2012) 'Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on biomass and enzymatic hydrolysis', *Chemical Engineering Journal*, 183, pp. 448–458. doi: 10.1016/j.cej.2011.12.086.

Toledo Cervantes, A. *et al.* (2018) 'Performance and microbial dynamics in packed-bed reactors during the long-term two-stage anaerobic treatment of tequila vinasses', *Biochemical Engineering Journal*, 138, pp. 12–20. doi: 10.1016/j.bej.2018.06.020.

Trachsel, J., Humphrey, S. and Allen, H. K. (2018) 'Butyricoccus porcorum sp. nov., a butyrate-producing bacterium from swine intestinal tract', *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology, 68(5), pp. 1737–1742. doi: 10.1099/ijsem.0.002738.

Ueki, A. *et al.* (2006) 'Paludibacter propionicigenes gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), pp. 39–44. doi: 10.1099/ijse.0.63896-0.

Urrea Valencia, S. *et al.* (2021) 'Molecular Techniques to Study Microbial Wastewater Communities', *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 64, pp. 1–13. doi: 10.1590/1678-4324-2021200193.

Usmani, Z. *et al.* (2020) 'Ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion', *Bioresource Technology*, 304, p. 123003. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123003.

Velázquez-Valadez, U. *et al.* (2016) 'Tequilana weber Agave Bagasse Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable Sugars: Oxidative-Alkaline Pretreatment and Kinetic Modeling', *Bioenergy Research*, 9(4), pp. 998–1004. doi: 10.1007/s12155-016-9757-8.

Venkiteshwaran, K. *et al.* (2015) 'Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function: Supplementary Issue: Water Microbiology', *Microbiology Insights*, 8s2, p. MBI.S33593. doi: 10.4137/mbi.s33593.

Wang, S., Hovland, J. and Bakke, R. (2013) 'Efficiency of the anaerobic digestion of amine wastes', *Biotechnology Letters*, 35(12), pp. 2051–2060. doi: 10.1007/s10529-013-1296-1.

Wang, Y. *et al.* (2009) 'Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria', *Biomass and Bioenergy*, 33(5), pp. 848–853. doi: 10.1016/j.biombioe.2009.01.007.

Wang, Y. and Qian, P.-Y. (2009) 'Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies', *PLoS one*, 4(10), p. e7401. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>.

Weber, B. *et al.* (2020) 'Agave bagasse response to steam explosion and anaerobic treatment', *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10(4), pp. 1279–1289. doi: 10.1007/s13399-020-00619-y.

Werner, J. J. *et al.* (2011) 'Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(10), pp. 4158–4163. doi: 10.1073/pnas.1015676108.

Westerholm, M., Moestedt, J. and Schnürer, A. (2016) 'Biogas production through syntrophic acetate oxidation and deliberate operating strategies for improved digester performance', *Applied Energy*, 179, pp. 124–135. doi: 10.1016/j.apenergy.2016.06.061.

Widdel, F., Kohring, G.-W. and Mayer, F. (1983) 'Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids', *Archives of Microbiology*, 134(4), pp. 286–294. doi: 10.1007/bf00407804.

Xu, J. *et al.* (2017) 'Pretreatment of eucalyptus with recycled ionic liquids for low-cost biorefinery', *Bioresource Technology*, 234, pp. 406–414. doi: 10.1016/j.biortech.2017.03.081.

Yamada, R. *et al.* (2017) 'Direct Ethanol Production from Ionic Liquid-Pretreated Lignocellulosic Biomass by Cellulase-Displaying Yeasts', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), pp. 229–237. doi: 10.1007/s12010-016-2322-2.

Yamada, T. *et al.* (2006) 'Anaerolinea thermolimosae sp. nov., Levilinea saccharolytica gen. nov., sp. nov. and Leptolinea tardivitalis gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes Anaerolineae classis nov. and Caldilineae classis nov. in the ', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(6), pp. 1331–1340. doi: 10.1099/ijse.0.64169-0.

Yamada, T. *et al.* (2007) 'Bellilinea caldifistulae gen. nov., sp. nov. and Longilinea arvoryzae gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), pp. 2299–2306. doi: 10.1099/ijse.0.65098-0.

Yoo, C. G., Pu, Y. and Ragauskas, A. J. (2017) 'Ionic liquids: Promising green solvents for lignocellulosic

biomass utilization', *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5, pp. 5–11. doi: 10.1016/j.cogsc.2017.03.003.

Yu, C. *et al.* (2016) 'Ionic liquid-tolerant microorganisms and microbial communities for lignocellulose conversion to bioproducts', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(24), pp. 10237–10249. doi: 10.1007/s00253-016-7955-0.

Yuan, H. and Zhu, N. (2016) 'Progress in inhibition mechanisms and process control of intermediates and by-products in sewage sludge anaerobic digestion', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, pp. 429–438. doi: 10.1016/j.rser.2015.12.261.

Zhang, Y. *et al.* (2019) 'Theoretical elucidation of β -O-4 bond cleavage of lignin model compound promoted by sulfonic acid-functionalized ionic liquid', *Frontiers in Chemistry*, 7, p. 78. doi: 10.3389/fchem.2019.00078.

Zhao, C., Shao, Q. and Chundawat, S. P. S. (2020) 'Recent advances on ammonia-based pretreatments of lignocellulosic biomass', *Bioresource Technology*, 298, p. 122446. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122446>.

Zhao, Y. *et al.* (2019) 'Biological pretreatment enhances the activity of functional microorganisms and the ability of methanogenesis during anaerobic digestion', *Bioresource Technology*, 290(April), p. 121660. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121660.

Zhou, L. Y. *et al.* (2019) 'Maribellus luteus gen. Nov., sp. nov., a marine bacterium in the family prolixibacteraceae isolated from coastal seawater', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(8), pp. 2388–2394. doi: 10.1099/ijsem.0.003495.

Anexos

Anexo A Preparación buffer de citratos

El buffer de citratos 50 mM se prepara disolviendo 9.606 g de ácido cítrico en 1 L de agua bidestilada, posteriormente con ayuda de un potenciómetro se ajusta al pH deseado, en este caso a 4.26 añadiendo la cantidad necesaria de NaOH. Se conserva en refrigeración hasta el momento de su uso.

Anexo B Colecta y conservación de biomasa microbiana destinadas a la extracción de ácidos nucleicos.

1. Se colectan 20 mL de la muestra líquida homogénea, se deposita 10 mL en dos tubos Falcon de 50 mL esterilizados. Si la muestra contiene poca biomasa se puede colectar un volumen mayor de la muestra.
2. Ambos tubos se balancean y se centrifugan a 10,000 rpm (11,200 g) durante 10 minutos a una temperatura de 10 °C.
3. Al finalizar la centrifugación, se remueve el sobrenadante evitando resuspender los botones celulares. El sobrenadante se debe recolectar en otro tubo falcon de 50 mL para la cuantificación de ácidos grasos volátiles, DQO, azúcares etc.
4. Las muestras suspendidas en medios con [EAO][OAc] son lavadas con 10 mL de buffer fosfato salino (PBS) 1X agitando suavemente el tubo.
5. En seguida, ambos tubos se balancean y son centrifugados a 10,000 rpm (11,200 g) durante 10 minutos a una temperatura de 10 °C.
6. Al finalizar la centrifugación se remueve todo el PBS 1X.
7. Se toma con una espátula esterilizada los botones celulares de ambos microtubos para colocarlos en el mortero.

Nota: El mortero y el pistilo esterilizados se deben colocar en un congelador a – 20 °C durante 12 horas mínimo antes de la colecta de la muestra. Al momento de desenvolver el pistilo se debe evitar que toque superficies contaminadas

8. Posteriormente, se añaden 4 mL de tiocianato de guanidina 4 M, Tris-HCl 0.1 M (pH 7.55) para macerar la biomasa con el pistilo hasta obtener una suspensión homogénea y fluida.
9. Cuando se obtenga la suspensión homogénea se añaden 600 µL de la solución de N-lauril-sarcosina 10 %. Se mezcla suavemente para no generar burbujas.

10. Finalmente, se reparte la suspensión en 8 alícuotas de 500 μ L en microtubos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) esterilizados Bead Bug etiquetados previamente tanto en la pared del tubo como en el tapón con una crio-etiqueta.
Nota: La punta utilizada para repartir la suspensión se corta un poco con tijeras metálicas esterilizadas para evitar que se tape con la muestra durante el pipeteo.
11. Las alícuotas de la muestra son conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de las cajas criogénicas.

Anexo C Protocolo para la extracción y purificación de ADN

1. Se añaden 500 μ L de la solución de N-lauril-sarcosina 5 % a la alícuota de la muestra conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. En seguida, se coloca la muestra en el baño seco a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se incuba durante 1 hora para iniciar con la lisis celular. Después de un minuto de incubación se agita la muestra en el vórtex orbital IKA mediante un pulso a la máxima velocidad.
3. Después del periodo de incubación, se coloca el microtubo dentro de hielo molido. Se agregan 500 μ L de perlas de zirconio de 0.1 mm de diámetro esterilizadas a la muestra, posteriormente se coloca dentro del rompedor de células BeadBug a una velocidad de 400 por 60 segundos.
4. Al finalizar el ciclo en el rompedor de células se coloca la muestra en el hielo, se añaden 15 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). La muestra se agita en el vórtex GENIE2 a una velocidad de 3000 hasta observar que las perlas y la muestra se mezclan apropiadamente, el tiempo no debe superar los 10 segundos.
5. Posteriormente, se centrifuga la muestra durante 3 minutos a 12,000 rpm (9,670 g) en la centrifuga Minispin plus.
6. Al finalizar la centrifugación, se recupera 400 μ L del sobrenadante que contiene el ADN en un nuevo microtubo de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) Axygen esterilizado. La muestra debe mantenerse en hielo molido.
7. En seguida, se añaden 500 μ L de TENP (solución de TRIS-Cl, EDTA, NaCl y PVPP) al sedimento del microtubo de la muestra y se agita durante 2-10 segundos en el vórtex GENIE2.
8. Después, se centrifuga de nuevo la muestra durante 3 minutos a 12,000 rpm (9,670 g). Al finalizar se recupera 400 μ L del sobrenadante y se colocan en el mismo microtubo donde se colectó el primer sobrenadante.
9. Se añaden nuevamente 500 μ L de TENP al sedimento del microtubo de la muestra y se agita durante 2-10 segundos en el vórtex GENIE2, después, se centrifuga la muestra

- durante 3 minutos a 12,000 rpm (9,670 g). Al finalizar se recupera 400 μ L del sobrenadante y se colocan en el mismo microtubo donde se colectó el primer sobrenadante.
10. El microtubo con la totalidad del sobrenadante obtenido (~ 1200 μ L) se centrifuga durante 3 minutos a 12,000 rpm (9,670 g).
 11. Al finalizar la centrifugación, se reparte el sobrenadante obtenido en volúmenes iguales usando dos microtubos nuevos de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) Axygen esterilizado.
 12. A continuación, se añade 600 μ L de isopropanol a cada microtubo y se agita suavemente invirtiendo los microtubos cerca de la superficie del hielo durante 3 minutos. Después de la agitación se deja reposar los dos microtubos durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 13. Al finalizar la incubación, se centrifugan ambos microtubos de la muestra durante 15 minutos a 14,500 rpm (14,120 g).
Nota: Colocar una marca en la parte del microtubo donde se acumulará el botón durante la centrifugación.
 14. Al finalizar la centrifugación, se decanta suavemente el sobrenadante de ambos microtubos. Posteriormente, se añade a uno de los tubos 200 μ L de agua para PCR para resuspender el sedimento usando la misma punta de la micropipeta succionando y expulsando el líquido.
 15. Después de resuspender el sedimento, se realiza lo mismo con el otro microtubo utilizando la suspensión de ADN del primer microtubo para realizarlo, con el propósito de tener la totalidad del ADN precipitado en el mismo microtubo.
 16. En seguida, se añaden 10 μ L de ARNasa pancreática bovina (Sigma) a 2.5 mg/mL (concentración final 1 mg/mL) a la suspensión de ADN, se agita en el vórtex orbital IKA mediante un pulso a 2000 rpm para posteriormente colocar el microtubo en un baño seco para ser incubado durante 30 minutos a 37 °C.
 17. Al finalizar el periodo de incubación, se añaden 200 μ L de Buffer AL (Kit QIAamp DNA de QIAGEN) al microtubo de la muestra, se agita la mezcla en el vórtex orbital IKA mediante un pulso a 2000 rpm y se incuba en el baño seco a 70 °C por 10 minutos.
 18. A continuación, se agrega 200 μ L de etanol puro y se agita la mezcla en el vórtex orbital IKA mediante un pulso a 2000 rpm. La muestra se debe mantener en hielo molida durante el proceso.

19. La suspensión de ADN mezclada con el buffer AL y el etanol puro se agrega a una microcolumna (Kit QIAamp DNA) y se centrifuga durante 3 minutos a 14,000 rpm (13,170 g).
20. Al finalizar la centrifugación, se desecha el microtubo con el filtrado. Por otra parte, la microcolumna se coloca dentro de un microtubo nuevo de 2 mL del Kit QIAamp DNA. En seguida se añaden 500 µL del Buffer AW1 (Kit QIAamp DNA) a la microcolumna y se centrifuga a 14,000 rpm (13,170 g) por 3 minutos.
21. Posterior a la centrifugación, se desecha nuevamente el microtubo con el filtrado y se coloca la microcolumna dentro de otro microtubo nuevo de 2 mL del Kit QIAamp DNA, se agrega 500 µL del Buffer AW2 (Kit QIAamp DNA) a la microcolumna y se centrifuga a 14,000 rpm por 3 minutos (13,170 g).
22. Después se elimina el microtubo con el filtrado y se coloca la microcolumna dentro de un microtubo nuevo de 1.5 mL Axygen esterilizado con la tapa cortada previamente para añadir 50 µL del Buffer AE (Kit QIAamp DNA) a la microcolumna. Se deja incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
23. Cuando finalice el tiempo de incubación se centrifuga la muestra a 8,000 rpm (4,300 g) por 3 minutos.
24. Al finalizar la centrifugación, se desecha la microcolumna y se recupera el filtrado en un microtubo de 2 mL con tapa roscada y anillo de goma (o-ring) Axygen esterilizado etiquetado previamente tanto en la pared del microtubo como en el tapón con una criotiqueta.
25. El microtubo con la muestra de ADN extraído se conserva a - 80 °C.

Todos los microtubos utilizados durante el proceso deben estar etiquetados tanto en la pared del tubo como en el tapón. Además, se debe mantener en todo momento la muestra en hielo molido para evitar la hidrólisis del ADN a menos que se indique lo contrario en el protocolo.

Anexo D Protocolo para la extracción y purificación de ARN ribosomal

La extracción de ARN ribosomal se debe realizar en la estación de trabajo UV3 previamente limpiada con etanol al 70 % y RNase Away Reagent. Todos los microtubos utilizados durante el proceso deben ser expuestos a la luz ultravioleta y estar etiquetados tanto en la pared del microtubo como en el tapón.

1. Se añaden 500 μL de la solución PBS 1X disuelta en agua ultrapura con DEPC al 0.1 % y 200 μL de perlas de zirconio con diámetro de 0.1 mm a la alícuota de la muestra conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. En seguida, se coloca el microtubo con la muestra en el rompedor de células BeadBug a una velocidad de 400 por 3 minutos, una vez terminado el ciclo se coloca la muestra en una caja criogénica durante 5 minutos. Posteriormente se repite el ciclo en el rompedor de células bajo las mismas condiciones.
3. Después, se centrifuga las muestras a 12,000 rpm (9,670 g) por 3 minutos, el sobrenadante obtenido se colecta en microtubos nuevos o-ring de 2 mL Axygen.
4. Se añaden 200 μL del buffer RLT (Kit RNeasy Mini de QIAGEN) y se agita la mezcla en el vortex IKA a una velocidad de 1,500 rpm aplicando 3 pulsos de 3 segundos. Se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Al finalizar la incubación, se centrifuga las muestras a 14,500 rpm (14,120 g) por 5 minutos para remover todos los residuos celulares de la muestra. Después de la centrifugación, se colecta 700 μL del sobrenadante en un microtubo nuevo o-ring de 2 mL Axygen.
6. En seguida, se agregan 700 μL de etanol al 70 % (previamente preparado utilizando agua DEPC) y se mezcla suavemente succionando y devolviendo el líquido al microtubo 5 veces con una punta con filtro esterilizada. Se debe procurar que el líquido resbale por las paredes al devolverlo al microtubo.
7. Se añaden 700 μL de la solución muestra-etanol a la microcolumna con microtubo colector de 2 mL del RNeasy Mini kit, posteriormente se centrifuga a 14,000 rpm (13,170 g) por 15 segundos.
8. Al terminar la centrifugación, se desecha el líquido que quedo en el microtubo colector y se coloca de nuevo la microcolumna para añadir los 700 μL restantes de la solución muestra-etanol, se centrifuga bajo las mismas condiciones.
9. Al finalizar la segunda centrifugación, se coloca la microcolumna en un microtubo colector nuevo y se agregan 700 μL del buffer RW1 (RNeasy Mini kit), después se centrifuga a 14,000 rpm (13,170 g) por 15 segundos.
10. De igual forma se desecha el líquido que quedo en el microtubo colector y se coloca de nuevo la microcolumna, se añaden 500 μL del buffer RPE (RNeasy Mini kit) y se centrifuga a 14,000 rpm (13,170 g) por 15 segundos.
11. Posteriormente se elimina el líquido que quedo en el microtubo colector y se coloca de nuevo la microcolumna para agregar 500 μL del buffer RPE (RNeasy Mini kit) y se centrifuga a 14,000 rpm (13,170 g) por 2 minutos.

12. Al terminar la centrifugación, se desecha el microtubo colector con el líquido y la microcolumna se coloca en el microtubo de 1.5 mL del RNeasy Mini kit con la tapa cortada previamente. En seguida, se añaden 50 μ L del agua libre de RNAsas (RNeasy Mini kit), se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Se centrifuga la muestra a 14,000 rpm por 2 minutos, después de la centrifugación se colecta la solución con el ARN extraído en un microtubo o-ring nuevo de 2 mL.
14. Antes de almacenar el ARN extraído, se toma una alícuota de 12 μ L de la solución y se coloca en un microtubo de 500 μ L Safe-Lock. Esta alícuota se conserva a -20°C para realizar las pruebas de visualización y degradación del ADN contaminante, el resto del ARN extraído se conserva a -80°C .

Anexo E Electroforesis para la visualización de ARN

La visualización del ARN extraído se realiza en un gel de agarosa desnaturalizante al 1.5 % (p/v).

1. El gel se prepara añadiendo 50 mL de la solución TBE-DEPC 1X, que fue diluida previamente con agua ultrapura con DEPC al 0.1 % a partir de una solución TBE 10X.
2. Se añaden 0.75 g de agarosa y se calienta la solución en un horno de microondas en intervalos de 5-10 segundos con una agitación ligera entre intervalos, se debe tener cuidado de que la solución no ebulle. Continuar con el calentamiento hasta disolver por completo la agarosa.
3. Cuando la agarosa se disolvió, se deja enfriar la solución a temperatura ambiente por 5 minutos aproximadamente. Entonces se añaden 750 μ L de hipoclorito de sodio de marca comercial CLORALEX aroma floral (6 %), después se agita suavemente la solución.
4. Posteriormente, cuando la solución llegue a una temperatura soportable en la palma de la mano se añade 0.5 μ L de SYBR-GOLD y se agita la solución del gel suavemente hasta observar una coloración uniforme.
5. La solución del gel aún en estado líquido se coloca en la base de acrílico sobre el soporte de plástico para la solidificación a temperatura ambiente. Se debe proteger de la luz el gel en esta etapa por lo cual se cubre con una bolsa de plástico negra o con una caja cuidando de no tocar el gel. Se deja solidificar por lo menos durante una hora.
6. Una vez solidificado, se coloca en la cámara de electroforesis y se añade el buffer TBE-DEPC 1X, para posteriormente cargar las muestras. El buffer se mantiene en refrigeración hasta su uso para evitar el calentamiento de este durante la electroforesis.

7. El gel desnaturalizante se corre a 80 V y 400 mA durante 40 minutos.
8. En seguida, se visualiza en el fotodocumentador BioRad, utilizando el software "ImageLab" para el procesamiento de la imagen.

En caso de no lograr la visualización de las bandas del ARN ribosomal extraído se debe realizar el gel de agarosa desnaturalizante al 1.5 % (p/v) utilizando el colorante SYBR-Green.

1. El gel se prepara añadiendo 50 mL de la solución TBE-DEPC 1X y 0.75 g de agarosa, se disuelve la agarosa en un horno de microondas en intervalos de 5-10 segundos con agitación entre cada uno, se debe tener cuidado de que no ebulle la solución.
2. Cuando la agarosa se disolvió, se deja enfriar la solución a temperatura ambiente por 5 minutos aproximadamente. Entonces se añaden 750 µL de hipoclorito de sodio de marca comercial CLORALEX aroma floral (6 %), después se agita suavemente la solución.
3. A continuación, la solución se coloca en la base de acrílico sobre el soporte de plástico para la solidificación. **No** se añade ningún colorante a la solución del gel. La base de acrílico con el gel en estado líquido se deja enfriar por lo menos durante una hora.
4. Una vez solidificado, se coloca en la cámara de electroforesis y se añade el buffer TBE-DEPC 1X, para posteriormente cargar las muestras
5. La deposición de las muestras se realiza sobre un pedazo de Parafilm donde se coloca 1 µL del colorante SYBR-Green 6X por 5 µL de muestra, por lo cual la concentración final del SYBR-Green es 1X. No es necesario agregar la solución de deposición (BlueJuice). La mezcla de la muestra y el SYBR-Green se agita usando la pipeta succionando y expulsando por lo menos 10 veces. Después se deposita en la celda del gel designada.
6. El gel desnaturalizante se corre a 80 V y 400 mA durante 40 minutos.
7. En seguida, se visualiza en el fotodocumentador BioRad, utilizando el software "ImageLab" para el procesamiento de la imagen.

Anexo F Protocolo para la degradación de ADN contaminante

La degradación de ADN contaminante del ARN extraído se debe realizar en la estación de trabajo UV3 previamente limpiada con etanol al 70 % y RNase Away Reagent. Todos los microtubos utilizados durante el proceso deben ser expuestos a la luz ultravioleta y estar etiquetados tanto en la pared del microtubo como en el tapón.

1. En un microtubo de 200 μL para PCR Axygen se realiza la mezcla de 2 μL de ARN extraído, 8 μL de RQ1 DNase Reaction Buffer 10X y 6 μL de RQ1 RNase-Free DNase. Se agita en el vortex IKA con un pulso a 2,000 rpm.
2. Después, se incuba la mezcla en un baño seco a 37 °C por 30 minutos.
3. Al finalizar la incubación, se adiciona 2 μL de reactivo RQ1 DNase Stop Solution. Se agita el microtubo en el vortex IKA con un pulso a 2,000 rpm.
4. Posteriormente, el microtubo se coloca en el termociclador Veriti y se ejecuta el programa “STOP ADNasa”, el cual consiste en 10 minutos a 65 °C.
5. Al terminar la incubación, se conserva la muestra a -20°C hasta posteriores procedimientos. La muestra se etiqueta como ARN-P.

Anexo G Protocolo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción PCR se debe realizar en la estación de trabajo UV3 previamente limpiada con etanol al 70 % y RNase Away Reagent. Todos los microtubos utilizados durante el proceso deben ser expuestos a la luz ultravioleta y estar etiquetados tanto en la pared del microtubo como en el tapón.

1. Se prepara una mezcla con los reactivos indicados en la Tabla 1 en un microtubo de 500 μL Safe-Lock de acuerdo con la cantidad de muestras a procesar.

Tabla 1. Mezcla de reactivos para la reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad para 1 muestra
Agua para PCR	34 μL
Buffer Red-Taq Polimerasa (10X)	5 μL
dNTP (2.5 mM)	4 μL
Primer delantero (100 ng/ μL)	2 μL
Primer reverso (100 ng/ μL)	2 μL
Red-Taq ADN Polimerasa	2 μL
<i>Volumen</i>	<i>49 μL</i>
Muestra o control	1 μL
<i>Volumen total de reacción</i>	<i>50 μL</i>

2. Se agrega cada reactivo en el orden indicado en la Tabla 20. Primero se adiciona el volumen total de agua para PCR, después el volumen total del buffer Red-Taq Polimerasa (10X). Esta solución se agita en el vortex IKA con un pulso a 2,000 rpm.
3. En seguida, se añade el volumen total de los dNTP (2.5 mM) y de cada primer (100 ng/μL). De igual forma, se agita la solución en el vortex IKA con un pulso a 2,000 rpm.
4. Después, se añade el volumen total de la enzima Red-Taq ADN Polimerasa, la mezcla se agita hasta que el color rojo de la enzima sea homogéneo en la solución.
5. Posteriormente, se reparte la solución de los reactivos agregando 49 μL en un microtubo de 200 μL para PCR.
6. Se agrega 1 μL de la muestra al microtubo con la solución. Se agita en el vortex IKA mediante un pulso a 2,000 rpm. Se debe de tener cuidado que no quede solución en las paredes del microtubo, si fuera el caso se centrifuga la muestra.
7. Finalmente, se coloca el microtubo de 200 μL con la mezcla de reactivos y la muestra en el termociclador Veriti y se corre el programa "PCR Eubacteria", las condiciones del programa se muestran en la Figura 1.

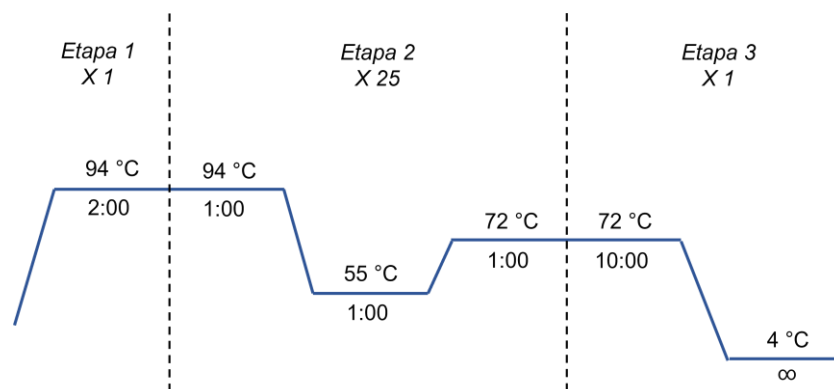


Figura 1. Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Anexo H Protocolo para la síntesis de ADN complementario

La reacción PCR se debe realizar en la estación de trabajo UV3 previamente limpiada con etanol al 70 % y RNase Away Reagent.

Todos los microtubos utilizados durante el proceso deben ser expuestos a la luz ultravioleta y estar etiquetados tanto en la pared del microtubo como en el tapón. Los reactivos utilizados se deben descongelar lentamente sobre una cama de hielo.

1. Se realiza la “Mezcla 1” para cada muestra y el control negativo en un microtubo de 200 μ L para PCR.
Para cada muestra
 - 1 μ L de random primes
 - 4 μ L de ARN-P
 Para el control negativo
 - 1 μ L de random primes
 - 4 μ L de agua para PCR
2. En seguida, se agita la “Mezcla 1” en el vortex IKA mediante un pulso a 2,000 rpm y se incuba a 70 °C por 5 minutos en un baño seco.
3. Al finalizar la incubación, el microtubo con la “Mezcla 1” se coloca en el soporte dentro un contenedor de unicel con hielo molido y agua ultrapura durante 5 minutos.
4. Posteriormente, se centrifuga la muestra durante 15 segundos a 3,000 rpm para recuperar toda la solución de las paredes del microtubo.
5. Después, se agrega rápidamente 15 μ L de la “Mezcla 2” (Tabla 31) al microtubo con la “Mezcla 1”, se agita mediante un pulso a 2,000 rpm.
Nota: La “Mezcla 2” se prepara durante la incubación en hielo.

Tabla 2. Reactivos de la Mezcla 2 para la reacción de retrotranscripción.

Reactivos	Cantidad para 1 muestra
Agua para PCR	7.6 μ L
GoScript Buffer 5X	4.0 μ L
MgCl ₂	1.2 μ L
Mezcla de nucleótidos	1.0 μ L
Inhibidor de ribonucleasa RNasin	0.2 μ L
GoScript Reverse Transcriptase	1.0 μ L
<i>Volumen final de la reacción</i>	<i>15.0 μL</i>

6. Finalmente, se coloca el microtubo en el termociclador Veriti y se corre el programa “ADNc síntesis”, las condiciones del programa se muestran en la Figura 2.

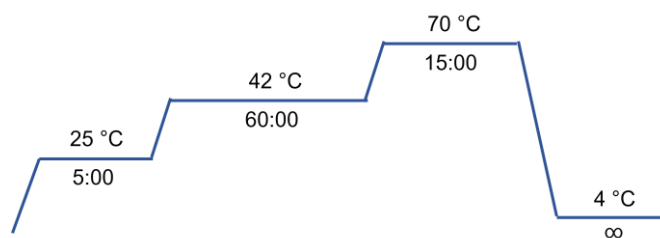


Figura 2. Condiciones para la síntesis de ADNc.

Anexo I Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio *Archaea* de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.

Tabla 3. Afiliación filogenética del pariente más cercano a las secuencias de ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio *Archaea* aisladas de las pruebas en el AMPTS para la evaluación del efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano. Entre paréntesis se indica el número de acceso de la base de datos NCBI.

Número de OTU	Afiliación filogenética del gen ARNr 16S	Similitud (%)	Origen
1	<i>Methanotherix soehngeni</i> GP6 (NR102903)	99.21	Colección ATCC: BAA-1996
2	<i>Methanobacterium beijingense</i> 8-2 (NR028202)	98.68	Digestor anaerobio
3	<i>Methanotherix harundinacea</i> 8Ac (NR043203)	98.68	Reactor UASB
5	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12 (NR113044)	97.60	Lodo del fondo del tanque de almacenamiento de aceite crudo
7	<i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1 (NR028163)	100	Lodo de digestor anaerobio
8 ⁺	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> B10 (NR118098)	94.75	Heces humanas
9 ⁺	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> B10 (NR118098)	99.47	Heces humanas
10 [*]	<i>Staphylothermus marinus</i> F1 (NR044909)	79.15	Colección DSM:3639
12	<i>Methanobrevibacter boviskoreani</i> JH1 (NR118565)	80.59	Líquido ruminal
13 [*]	<i>Staphylothermus marinus</i> F1 (NR044909)	82.55	Colección DSM:3639

⁺ Divergencia entre OTUs 8 y 9 de 5.25 %. ^{*} Divergencia entre OTUs 10 y 13 de 5.17 %.

Anexo J Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio *Bacteria* de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.

Tabla 4. Afiliación filogenética del pariente más cercano a las secuencias de ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio *Bacteria* aisladas de las pruebas en el AMPTS para la evaluación del efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano. Entre paréntesis se indica el número de acceso de la base de datos NCBI.

Número de OTU	Afiliación filogenética del gen ARNr 16S	Similitud (%)	Origen
Phylum <i>Actinobacteria</i>			
27	<i>Propionicimonas paludicola</i> Wd (NR104769)	97.58	Colección DSM:15597
80	<i>Brooklawnia cerclae</i> BL-34 (NR043631)	98.12	Aguas subterráneas contaminadas con clorosolventes
Phylum <i>Bacteroidetes</i>			
3	<i>Maribellus luteus</i> XSD2 (NR165017)	92.60	Agua de mar
4	<i>Prolixibacter bellariivorans</i> F2 (NR043273)	80.56	Sedimentos marinos
5	<i>Bacteroides graminisolvens</i> JCM 15093 (NR113069)	99.46	Colección ATCC:25777
10	<i>Puteibacter caeruleilacunae</i> JC036 (NR180177)	89.65	Yongle Blue Hole
42	<i>Puteibacter caeruleilacunae</i> JC036 (NR180177)	89.36	Yongle Blue Hole
68	<i>Paludibacter propionicigenes</i> WB4 (NR074577)	99.94	Residuos de plantas de arroz en suelo de campo de arroz anóxico
Phylum <i>Chloroflexi</i>			
1	<i>Ornatilinea apprima</i> P3M-1 (NR109544)	82.73	Estera microbiana
6	<i>Aggregatilinea lenta</i> MO-CFX2 (NR173523)	87.63	Sedimentos del fondo marino
13	<i>Longilinea arvoryzae</i> KOME-1 (NR041355)	87.00	Suelo de arrozal
14	<i>Aggregatilinea lenta</i> MO-CFX2 (NR173523)	84.43	Sedimentos del fondo marino
19	<i>Longilinea arvoryzae</i> KOME-1 (NR041355)	88.87	Suelo de arrozal

21	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195 (NR074116)	80.06	Lodos de digestor
22	<i>Ornatilinea apprima</i> P3M-1 (NR109544)	92.77	Estera microbiana
24	<i>Aggregatilinea lenta</i> MO-CFX2 (NR173523)	88.18	Sedimentos del fondo marino
26	<i>Bellilinea caldifistulae</i> GOMI-1 (NR041354)	90.59	Lodo de digestor termofílico
29	<i>Longilinea arvoryzae</i> KOME-1 (NR041355)	97.57	Suelo de arrozal
34	<i>Leptolinea tardivitalis</i> YMTK-2 (NR040971)	90.69	Lodo granular de un UASB mesófilo
37	<i>Longilinea arvoryzae</i> KOME-1 (NR041355)	87.94	Suelo de arrozal
39	<i>Leptolinea tardivitalis</i> YMTK-2 (NR040971)	89.48	Lodo granular de un UASB mesófilo
63	<i>Aggregatilinea lenta</i> MO-CFX2 (NR173523)	87.56	Sedimentos del fondo marino
<hr/>			
Phylum <i>Candidatus Cloacamonas</i>			
7	No cultivable <i>Candidatus Cloacamonas</i> sp. clone ALB21 (JQ906964)	89.60	Laguna anaeróbica porcina
<hr/>			
Phylum <i>Fibrobacteres</i>			
91	<i>Fibrobacter succinogenes</i> subsp. <i>succinogenes</i> S85 (NR074293)	83.91	Colección ATCC:19169
<hr/>			
Phylum <i>Firmicutes</i>			
2	<i>Clostridium quinii</i> DSM 6736 (NR026149)	99.73	Colección DSM:6736
12	<i>Carboxydocella manganica</i> SLM 61 (NR108839)	85.41	Colección DSM:23132
17	<i>Dehalobacter restrictus</i> DSM 9455 (NR121722)	88.53	Colección DSM:9455
33	<i>Syntrophobotulus glycolicus</i> DSM 8271 (NR074993)	88.22	Cocultura sintrófica FIGlyM (DSM 6945) aislada de lodos de aguas residuales anóxicas
36	<i>Luoshenia tenuis</i> NSJ-44 (NR181383)	93.64	Suelo de arrozal
40	<i>Butyricoccus porcorum</i> BB10 (NR179713)	80.69	Mucosa del íleon distal
65	<i>Succinispira mobilis</i> 19gly1 (NR028868)	99.60	Colección DSM:622
<hr/>			
Phylum <i>Planctomycetes</i>			

41	<i>Anaerohalospaera lusitana</i> ST-NAGAB-D1 (NR179106)	86.37	Sedimento hipersalino de estanque de evaporación
Phylum <i>Proteobacteria</i>			
62	<i>Dissulfurirhabdus thermomarina</i> SH388 (NR149782)	89.18	Respiradero hidrotermal de aguas poco profundas
Phylum <i>Spirochaetes</i>			
16	<i>Gracilinema caldarium</i> DSM 7334 (NR074757)	100	Aguas termales
47	<i>Rectinema cohabitans</i> HM (NR156915)	90.48	Cultivo de enriquecimiento degradante de naftaleno anaeróbico
Phylum <i>Synergistetes</i>			
25	<i>Lactivibrio alcoholicus</i> TWAY-8-7 (NR125451)	90.61	Suelo de campo de arroz
Phylum <i>Thermodesulfobacteriota</i>			
8	<i>Solidesulfovibrio alcoholivorans</i> SPSN (NR037130)	100	Colección DSM:5433
11	<i>Syntrophobacter wolinii</i> DB (NR028020)	95.63	Colección DSM:2805
28	<i>Smithella propionica</i> LYP (NR024989)	95.62	Colección ATCC:700169
35	<i>Syntrophobacter wolinii</i> DB (NR028020)	99.97	Colección DSM:2805
44	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> UI (NR041306)	98.11	Lodo granular de UASB
49	<i>Desulfonauticus autotrophicus</i> DSM 4206 (NR044591)	77.24	Colección DSM:4206
61	<i>Desulfonema magnum</i> str. Montpellier 4be13 (NR025990)	93.35	Lodo anaeróbico de una laguna de agua de mar
Phylum <i>Thermotogota</i>			
20	<i>Mesotoga prima</i> MesG1.Ag.4.2 (NR117755)	99.73	Sedimentos

Anexo K Árbol filogenético del dominio *Archaea* y *Bacteria* de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.

En la Figura 3 se muestra el árbol de distancia evolutiva de los OTU y secuencias afiliadas del dominio *Archaea*, se añadió una secuencia del dominio *Bacteria* en este caso de *Clostridium swellfunianum* JB67 como una raíz para el árbol con el propósito de lograr una correcta construcción filogenética.

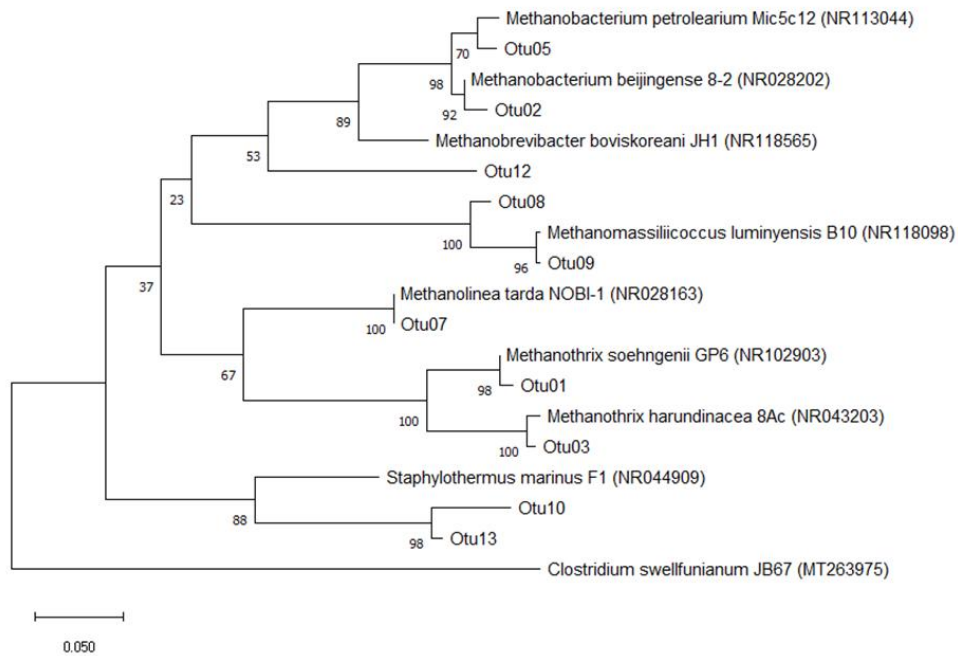


Figura 3. Árbol filogenético *Archaea* generado por el método de Máxima Parsimonia aplicando el algoritmo de Jukes-Cantor con 1000 bootstrap usando el software Mega 11.

Debido a la diversidad del dominio *Bacteria* se dividió el árbol de distancia evolutiva de los OTU y secuencias afiliadas en diferentes grupos filogenéticos, los cuales se presentan a continuación en la Figura 4, se añadió una secuencia del dominio *Archaea* en este caso de *Methanobacterium beijingense* BC-7 como una raíz para el árbol con el propósito de lograr una correcta construcción filogenética. Los OTUs 4, 10 y 42 formaron un clúster filogenéticamente separado en el árbol filogenético del phylum *Bacteroidetes*, por lo tanto, se propuso el nombre EAOAc1 para definir a este grupo de OTUs. De la misma forma los OTUs 13, 19 y 37 formaron otro clúster en el árbol filogenético del phylum *Chloroflexi*, al cual se le denominó EAOAc2.

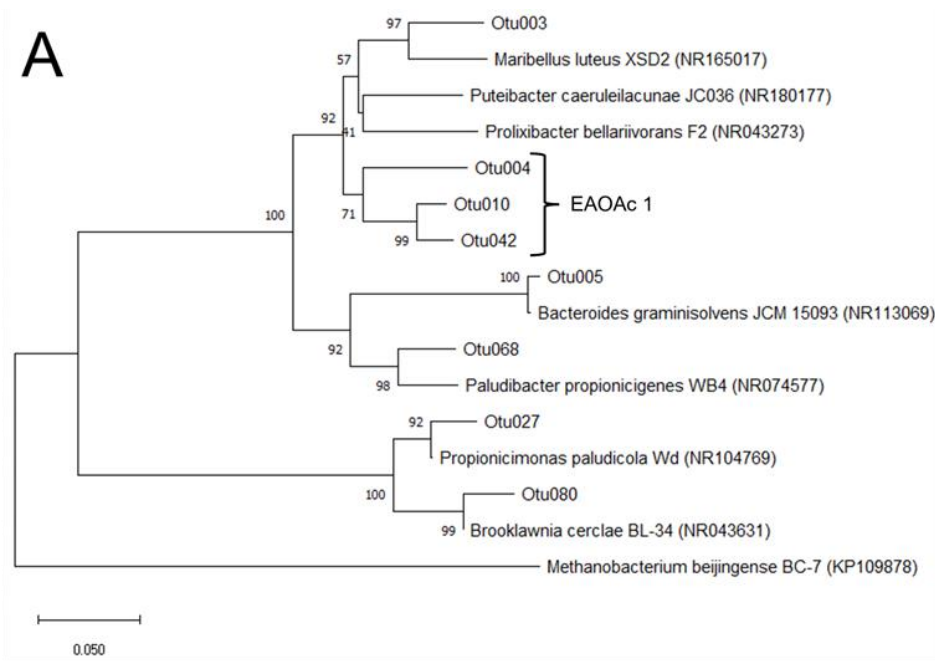
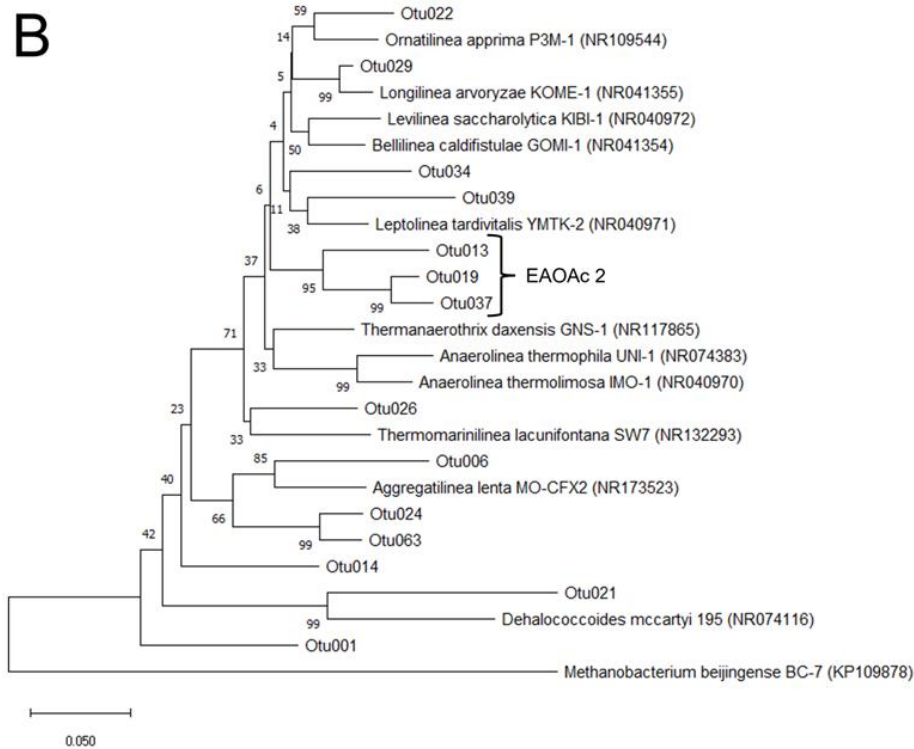
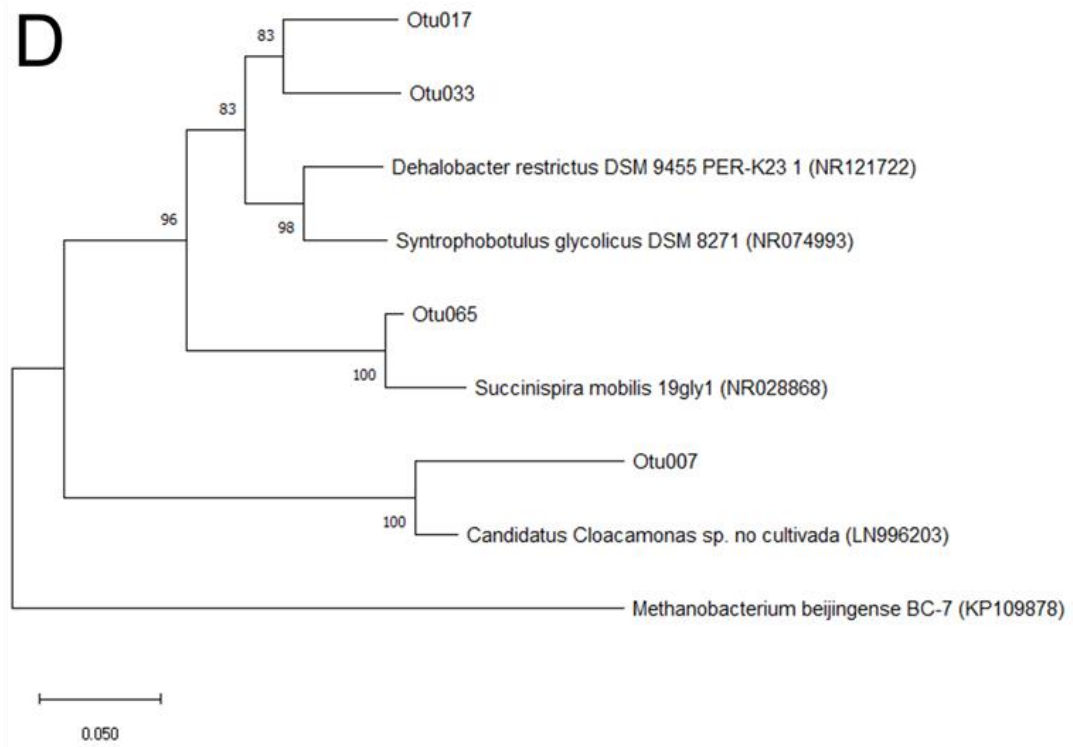
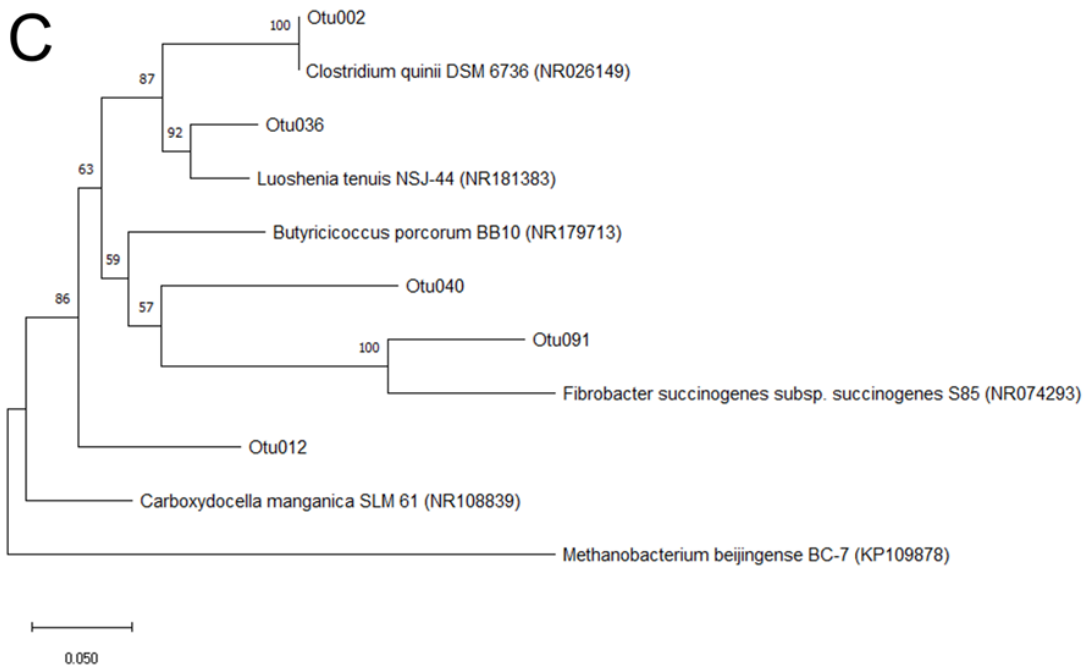
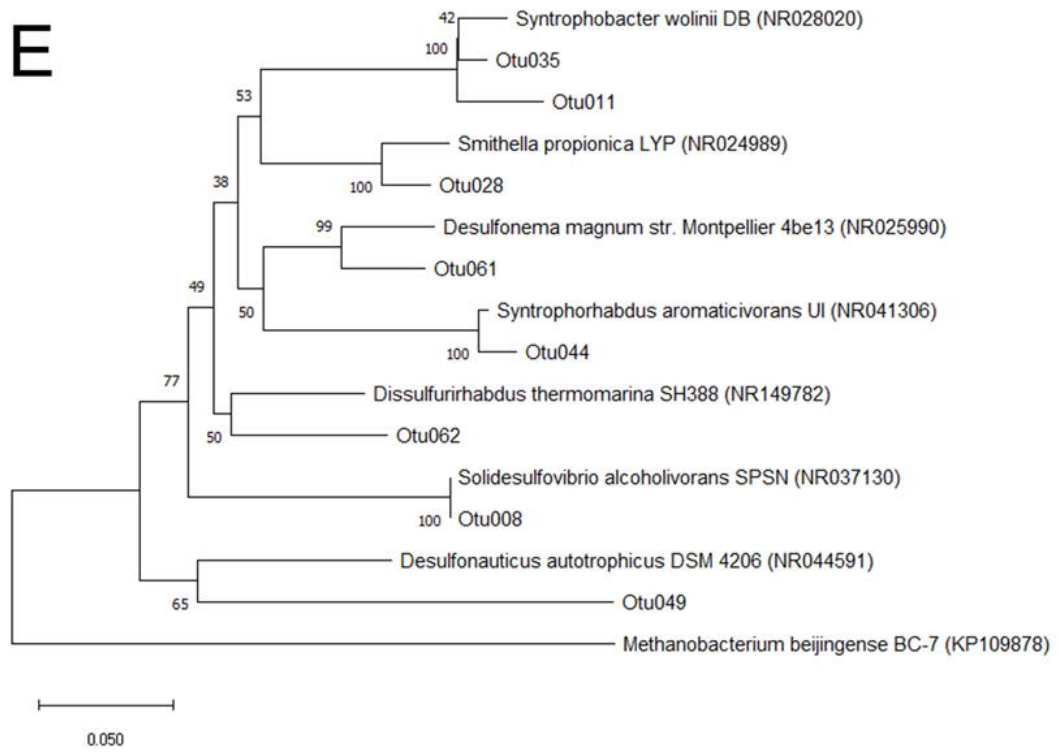


Figura 4. Árbol filogenético del dominio *Bacteria* generado por el método de Máxima Parsimonia aplicando el algoritmo de Jukes-Cantor con 1000 bootstrap usando el software Mega 11. (A) Phyla *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. (B) Phylum *Chloroflexi*. (C) Phyla *Fibrobacterota* y *Firmicutes*. (D) Phylum *Fibrobacterota*. (E) Phyla *Proteobacteria* y *Thermodesulfobacteria*.





E



Anexo L Abundancia relativa de poblaciones bacterianas y arqueas dominantes y sus características biológicas de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.

Tabla 5. Resultados de la abundancia relativa del gen 16S rRNA (ADN genómico y ADNc) en porcentaje de poblaciones bacterianas y arqueas dominantes ($\geq 1\%$), características biológicas como respiración, rango de temperatura para el crecimiento, sustratos fermentados y principales subproductos.

Poblaciones dominantes	H1-D	B:LI-D	A:LI-D	H1-R	B:LI-R	A:LI-R	Características biológicas	Referencias
Comunidad <i>Bacteria</i>								
Bacterias fermentativas								
Phylum <i>Actinobacteria</i>								
<i>Brooklawnia cerclae</i>	0.02	0.00	0.00	0.18	0.56	1.10	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 10 - 40 °C. Fermenta glucosa a acetato, y propionato.	Bae <i>et al.</i> , 2006
<i>Propionicimonas paludicola</i>	0.00	0.02	0.01	0.71	3.61	2.69	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 10 - 40 °C. Fermenta glucosa a acetato, propionato, lactato, y CO ₂	Akasaka <i>et al.</i> , 2003
Phylum <i>Bacteroidetes</i>								
<i>Bacteroides graminisolvens</i>	0.02	7.98	15.35	0.00	0.00	0.54	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 5 - 40 °C. Fermenta glucosa a acetato y propionato.	Nishiyama <i>et al.</i> , 2009
<i>Maribellus luteus</i>	9.11	9.99	16.75	1.13	2.07	5.22	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 20 - 40 °C. Puede oxidar como fuente de carbono el acetato.	Zhou <i>et al.</i> , 2019

<i>Paludibacter propionicigenes</i>	0.43	0.22	1.21	0.09	0.00	0.05	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 15 - 40 °C. Fermenta glucosa a propionato y acetato.	Ueki <i>et al.</i> , 2006
<i>Prolixibacter bellariivorans</i>	2.33	7.19	6.16	1.39	3.15	2.02	Anaerobio facultativo. Rango de temperatura de crecimiento: 4 - 42 °C. Fermenta glucosa a acetato, succinato y propionato.	Holmes <i>et al.</i> , 2007
<i>Puteibacter caeruleilacunae</i> (OTU 10)	2.64	5.505	3.02	1.97	0.55	0.35	Anaerobio facultativo. Rango de temperatura de crecimiento: 4 - 37 °C. Fermenta glucosa.	Sun <i>et al.</i> , 2020
<i>Puteibacter caeruleilacunae</i> (OTU 42)	0.18	1.98	0.89	0.23	0.00	0.19	Ídem	Sun <i>et al.</i> , 2020
Phylum <i>Fibrobacteres</i>								
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0.24	0.00	0.00	1.06	0.00	0.00	Anaerobio facultativo. Fermenta celulosa a succinato, acetato y formiato.	Suen <i>et al.</i> , 2011
Phylum <i>Firmicutes</i>								
<i>Butyricoccus porcorum</i>	1.31	0.31	0.18	1.35	0.15	0.17	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 30 - 45 °C. Fermenta glucosa a butirato, H ₂ y CO ₂ .	Trachsel, <i>et al.</i> , 2018
<i>Carboxydocella manganica</i>	1.36	0.74	0.58	5.26	4.10	0.91	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 26 - 70 °C. Fermenta glucosa a acetato.	Slobodkina <i>et al.</i> , 2012
<i>Clostridium quinii</i>	0.00	6.49	4.57	0.00	39.56	24.93	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 15 - 45 °C. Fermenta glucosa a formiato, acetato, lactato, etanol y H ₂ .	Svensson <i>et al.</i> , 1992
<i>Dehalobacter restrictus</i>	3.01	0.19	0.85	0.28	0.00	0.00	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 35 °C. Utiliza H ₂ como donante de electrones, no presenta crecimiento fermentativo.	Holliger <i>et al.</i> , 1998

<i>Luoshenia tenuis</i>	1.96	0.22	0.50	0.04	0.00	0.06	Anaerobio obligado. Temperatura óptima de crecimiento: 37 °C. Fermenta glucosa a propionato y butirato.	Jianga <i>et al.</i> , 2003
<i>Succinispira mobilis</i>	0.07	1.08	1.02	0.00	0.00	0.02	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 37 °C. Fermenta piruvato a formiato, acetato, propionato, CO ₂ y H ₂ .	Janssen y O'Farrell, 1999
Phylum <i>Planctomycetes</i>								
<i>Anaerohalospaera lusitana</i>	0.32	0.29	0.20	1.42	0.55	0.33	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 45 °C. Fermenta glucosa a acetato, H ₂ , etanol y en trazas lactato y formiato.	Pradel <i>et al.</i> , 2020
Phylum <i>Spirochaetes</i>								
<i>Gracilinema caldarium</i>	0.06	0.93	0.97	0.41	4.82	3.98	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 12 - 50 °C. Fermenta glucosa a acetato, H ₂ y CO ₂ .	Brune <i>et al.</i> , 2022
<i>Rectinema cohabitans</i>	1.82	0.20	0.07	0.48	0.00	0.04	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 12 - 50 °C. Fermenta glucosa a etanol, acetato y H ₂ .	Koelschbach <i>et al.</i> , 2017
Phylum <i>Synergistetes</i>								
<i>Lactivibrio alcoholicus</i>	1.54	1.61	2.09	0.53	0.09	0.06	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 40 °C. Fermenta glucosa a acetato y H ₂ .	Qiu <i>et al.</i> , 2014
Phylum <i>Thermotogota</i>								
<i>Mesotoga prima</i>	0.20	1.04	0.53	0.67	0.86	0.44	Aerotolerante. Rango de temperatura de crecimiento: 30 - 50 °C. Fermenta glucosa a acetato.	Nesbø <i>et al.</i> , 2012
Fermentadores sintróficos facultativos								

Phylum <i>Chloroflexi</i>								
<i>Aggregatilinea lenta</i> (OTU 6)	10.88	5.56	2.10	1.48	0.35	1.48	Anaerobio facultativo. Rango de temperatura de crecimiento: 20 - 37 °C. No fermenta glucosa, utiliza fumarato y piruvato como fuente de carbono.	Nakahara <i>et al.</i> , 2019
<i>Aggregatilinea lenta</i> (OTU 14)	0.12	0.04	0.02	3.14	4.97	3.53	Ídem	Nakahara <i>et al.</i> , 2019
<i>Aggregatilinea lenta</i> (OTU 24)	0.28	0.18	0.05	2.98	1.30	2.19	Ídem	Nakahara <i>et al.</i> , 2019
<i>Aggregatilinea lenta</i> (OTU 63)	0.08	0.08	0.03	1.18	0.46	0.63	Ídem	Nakahara <i>et al.</i> , 2019
<i>Bellilinea caldifistulae</i>	0.22	1.35	0.49	1.65	0.83	1.20	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 30 - 65 °C. Fermenta glucosa a acetato, lactato, formiato y H ₂ .	Yamada <i>et al.</i> , 2007
<i>Dehalococcoides mccartyi</i>	2.30	0.25	0.20	3.21	0.18	0.27	Anaerobio obligado. Utiliza H ₂ como donador de electrones y acetato más CO ₂ / bicarbonato como fuentes de carbono, además utiliza compuestos alifáticos o aromáticos halogenados como aceptor de electrones.	Schipp <i>et al.</i> , 2013
<i>Leptolinea tardivitalis</i> (OTU 34)	1.41	0.96	0.97	0.00	0.00	0.05	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 50 °C. Fermenta glucosa a acetato, lactato, piruvato y H ₂	Yamada <i>et al.</i> , 2006
<i>Leptolinea tardivitalis</i> (OTU 39)	0.34	1.19	1.61	0.03	0.08	0.16	Ídem	Yamada <i>et al.</i> , 2006
<i>Longilinea arvoryzae</i> (OTU 13)	4.35	2.70	1.21	1.29	0.00	0.56	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 30 - 40 °C. Fermenta glucosa a acetato, lactato y H ₂ .	Yamada <i>et al.</i> , 2007
<i>Longilinea arvoryzae</i> (OTU 19)	1.33	0.52	0.37	0.50	0.00	0.52	Ídem	Yamada <i>et al.</i> , 2007

<i>Longilinea arvoryzae</i> (OTU 29)	0.27	0.66	0.50	0.65	0.96	1.99	Ídem		Yamada <i>et al.</i> , 2007
<i>Longilinea arvoryzae</i> (OTU 37)	1.33	0.71	0.53	0.44	0.36	0.44	Ídem		Yamada <i>et al.</i> , 2007
<i>Ornatilinea apprima</i> (OTU 1)	14.78	8.31	4.80	11.97	8.32	18.86	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 30 - 45 °C. Fermenta glucosa a acetato, etanol y H ₂ .		Podosokorskaya <i>et al.</i> , 2013
<i>Ornatilinea apprima</i> (OTU 22)	0.53	0.51	0.39	2.55	1.05	2.52	Ídem		Podosokorskaya <i>et al.</i> , 2013

Acetogénicos sintróficos obligados

Phylum *Candidatus Cloacimonadota*

Uncultured <i>Candidatus Cloacamonas</i>	3.15	4.18	8.39	0.00	0.00	0.06	Anaerobio obligado. Metaboliza propionato a acetato y CO ₂ .		Pelletier <i>et al.</i> , 2008
--	------	------	------	------	------	------	---	--	--------------------------------

Phylum *Thermodesulfobacteriota*

<i>Smithella propionica</i>	0.41	2.01	1.05	1.03	0.18	0.98	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 10 - 40 °C. Metaboliza propionato a acetato, butirato y H ₂ .		Liu <i>et al.</i> , 1999
<i>Syntrophobacter wolinii</i> (OTU 11)	1.34	1.66	1.38	2.48	1.02	3.72	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 10 - 40 °C. Metaboliza propionato a acetato, H ₂ y formiato.		Liu <i>et al.</i> , 1999
<i>Syntrophobacter wolinii</i> (OTU 35)	0.31	0.36	0.15	1.55	0.29	1.12	Ídem		Liu <i>et al.</i> , 1999
<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i>	0.32	1.61	0.71	0.52	0.00	0.17	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 10 - 40 °C. Metaboliza propionato a acetato, H ₂ y formiato.		Qiu <i>et al.</i> , 2008

Bacterias sulfato reductoras

Phylum *Firmicutes*

<i>Desulfonauticus autotrophicus</i>	3.01	0.19	0.85	0.28	0.00	0.00	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 30 – 60 °C. H ₂ y formiato pueden ser utilizados como donador de electrones, y como aceptores de electrones utiliza sulfato, sulfito, tiosulfato y azufre.	Mayilraj <i>et al.</i> , 2009
<i>Syntrophobotulus glycolicus</i>	1.48	0.28	0.27	0.13	0.00	0.19	Anaerobio obligado. Crece quimiotróficamente por oxidación de glicolato o H ₂ (en presencia de CO ₂ y trazas de acetato), con sulfato como aceptor de electrones	Friedrich <i>et al.</i> , 1996
Phylum Thermodesulfobacteriota								
<i>Desulfonema magnum</i>	0.32	0.20	0.12	1.29	0.33	0.23	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 15 – 37. Acetato, propionato y butirato sirven como donantes de electrones y fuentes de carbono.	Widdel <i>et al.</i> , 1983
<i>Solidesulfovibrio alcoholivorans</i>	0.15	0.11	0.13	9.94	2.76	2.36	Anaerobio obligado. Utiliza el azufre, sulfato, sulfito y tiosulfato como aceptores de electrones y se reducen a sulfuro. La utilización de H ₂ , formiato y metanol requiere acetato como fuente de carbono.	Qatibi <i>et al.</i> , 1991
Comunidad Archaea								
Metanógenos reductores de CO₂								
<i>Methanobacterium beijingense</i>	61.06	66.85	77.97	8.59	7.72	7.07	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 50 °C. Metaboliza CO ₂ + H ₂ y formiato a metano.	Ma <i>et al.</i> , 2005
<i>Methanobacterium petrolearium</i>	1.89	3.22	3.48	0.57	1.13	1.36	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 20 - 40 °C. Metaboliza CO ₂ + H ₂ a metano.	Mori y Harayama, 2011

<i>Methanobrevibacter boviskoreani</i>	0.91	0.64	0.50	1.03	0.26	0.21	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 37 - 40 °C. Metaboliza CO ₂ + H ₂ y formiato a metano.	Lee <i>et al.</i> , 2013
<i>Methanolinea tarda</i>	0.85	0.70	0.63	4.10	0.89	0.97	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 35 - 55 °C. Metaboliza CO ₂ + H ₂ y formiato a metano.	Imachi <i>et al.</i> , 2008
<hr/>								
Metanógenos acetotróficos								
<i>Methanotherix harundinacea</i>	7.48	1.79	1.24	10.95	6.69	6.98	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 45 °C. Metaboliza el acetato a metano y CO ₂ .	Ma <i>et al.</i> , 2006
<i>Methanotherix soehngeni</i>	21.76	24.33	14.33	64.20	80.69	81.30	Anaerobio obligado. Temperatura óptima de crecimiento: 37 °C. Metaboliza el acetato a metano y CO ₂ .	Huser <i>et al.</i> , 1982
<hr/>								
Metanógenos metilotróficos								
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	1.68	0.63	0.42	3.11	1.71	0.96	Anaerobio obligado. Temperatura óptima de crecimiento: 37 °C. Metaboliza H ₂ , metanol o metilaminas a metano	Dridi <i>et al.</i> , 2012

Anexo M Peso de los componentes de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.

Tabla 6. Peso de los componentes de la prueba preliminar sobre el efecto del [EOA][OAc] en la producción de metano.

Variable	Componente 1	Componente 2
<i>Smithella propionica</i> (S.prop)	0.1542	0.3077
<i>Syntrophobacter wolinii</i> (S.wolinii)	-0.0320	0.3576
Volumen de metano (CH ₄ vol)	0.0438	0.3558
Tasa de producción volumétrica de metano (VMPR)	0.0478	0.3550
Rendimiento (CH ₄ Y)	0.0539	0.3537
Concentración final acetato (FinAc)	0.2774	-0.1310
Concentración final propionato (FinPro)	0.2957	0.0433
Concentración final butirato (FinBut)	0.1521	0.3093
Metanógenos CO ₂ reductores (CO ₂ metD)	0.2863	-0.0992
Metanógenos acetoclásticos (AcemetD)	-0.2695	0.1533
Fermentadores (FermD)	0.2948	0.0514
Fermentadores sintróficos facultativos (FSFD)	-0.2975	0.0174
Índice de diversidad Shannon <i>Archaea</i> (HAp)	-0.2978	0.0070
Índice de diversidad Simpson <i>Archaea</i> (DAp)	0.2884	-0.0900
Índice de diversidad Shannon <i>Bacteria</i> (HBp)	-0.2677	0.1577
Índice de diversidad Simpson <i>Bacteria</i> (DBp)	0.1822	-0.2846
<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> (S.aromat)	0.1251	0.3264
Concentración de glucosa consumida (ConsGlu)	0.2660	0.1619

Anexo N Pruebas de espectroscopía infrarroja para el seguimiento del [EAO][OAc] durante la digestión anaerobia

Se realizaron pruebas por Espectroscopía Infrarroja por FTIR con soluciones de [EAO][OAc] a diferentes concentraciones (1.086, 2.5 y 3.914 % p/v), el fondo utilizado fue agua. Finalmente, se realizó la prueba con el medio de cultivo inicial y final de los puntos centrales, en este caso el fondo fue el medio mineral más la concentración inicial de glucosa. Estas pruebas fueron realizadas con el propósito de evaluar el posible cambio de concentración del LI durante la digestión anaerobia. Los espectros en todas las pruebas se obtuvieron con un promedio de 64

barridos en el rango entre 400 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} y una resolución espectral de 4 cm^{-1} , usando un equipo Nicolet iS50 FT-IR.

En la figura 5, se pueden apreciar los picos representativos de los LI en el número de ondas de 1400 y 1550 cm^{-1} aproximadamente en el espectro obtenido del [EAO][OAc] (puro) en absorbancia.

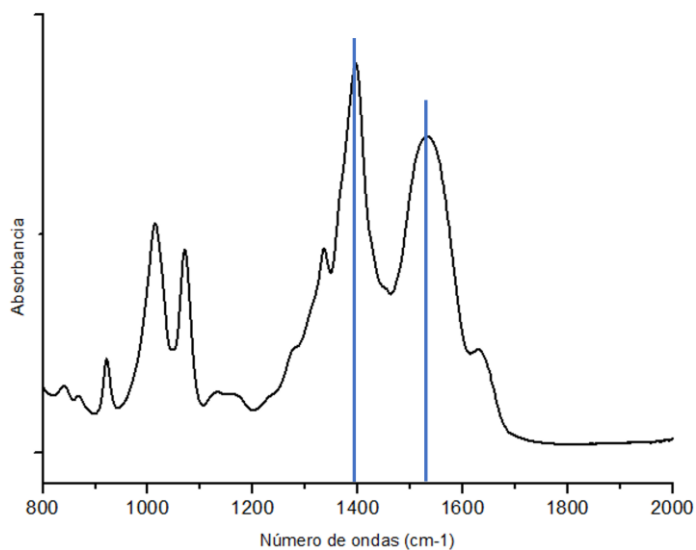


Figura 5. Espectro del [EAO][OAc] puro.

En las soluciones de [EAO][OAc], los picos representativos de los LI (1400 y 1550 cm^{-1}) cambian su intensidad de acuerdo con su concentración como se ve muestra en la Figura 6, sin embargo, a concentraciones bajas por ejemplo 1.08% p/v se presenta más ruido en el espectro comparado con concentraciones altas como 3.91% p/v.

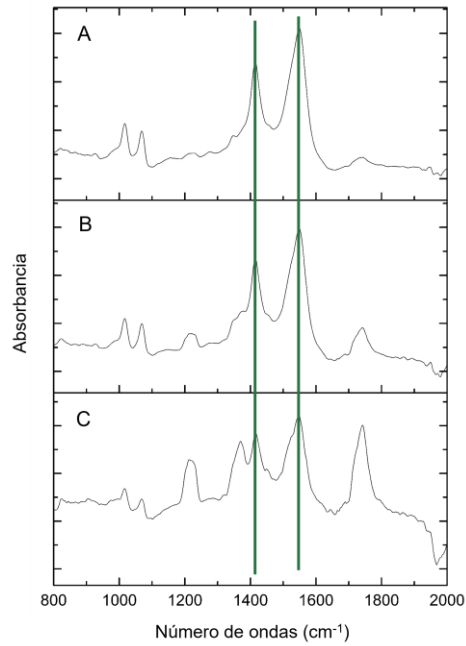


Figura 6. Espectros de soluciones de [EAO][OAc] al 3.91 % p/v (A), 2.5% p/v (B) y 1.08 % p/v (C).

Por otro lado, analizando el medio de cultivo inicial de los puntos centrales (PC) (Figura 7, A) se puede apreciar claramente los picos representativos de los LI, no obstante, en el medio de cultivo al final de la digestión anaerobia (Figura 7, B) la presencia de metabolitos del proceso como los AGV interfieren en el espectro, por lo cual es necesario agregar estos compuestos como parte del fondo para poder evaluar la disminución de intensidad de los picos del LI durante la digestión anaerobia.

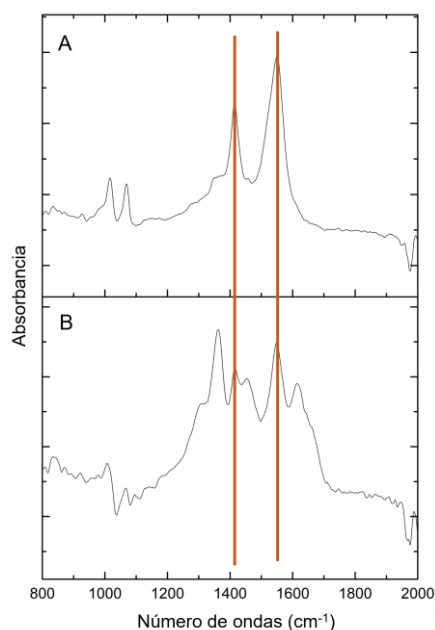


Figura 7. Espectro de medio de cultivo inicial (A) y final (B) de la prueba de potencial bioquímico de metano de los puntos centrales (PC).

Anexo O Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio *Archaea* de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano

Tabla 7. Afiliación filogenética del pariente más cercano a las secuencias de ADN y ARN 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio *Archaea* aisladas de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano. Entre paréntesis se indica el número de acceso de la base de datos NCBI.

Número de OTU	Afiliación filogenética del gen ARNr 16S	Similitud (%)	Origen
1	<i>Methanobacterium beijingense</i> 8-2 (NR028202)	100	Digestor anaerobio
2	<i>Methanotherix soehngeni</i> GP6 (NR104707)	98.41	Colección NBRC:103675
4	<i>Methanolinea tarda</i> NOBI-1 (NR028163)	100	Lodo de digestor anaerobio
6	<i>Methanotherix harundinacea</i> 8Ac (NR043203)	99.48	Lodo de digestor anaerobio
8	<i>Methanobacterium subterraneum</i> A8p (NR028247)	99.46	Colección DSM:11074
15	<i>Methanobrevibacter boviskoreani</i> JH1 (NR118565)	80.87	Líquido ruminal

Anexo P Afiliación filogenética del ADN genómico y ARN ribosomal 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio *Bacteria* de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano

Tabla 8. Afiliación filogenética del pariente más cercano a las secuencias de ADN y ARN 16S clasificadas en OTUs dentro del dominio *Bacteria* aisladas de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano. Entre paréntesis se indica el número de acceso de la base de datos NCBI.

Número de OTU	Afiliación filogenética del gen ARNr 16S	Similitud (%)	Origen
Phylum <i>Bacteroidetes</i>			
16	<i>Prolixibacter bellariivorans</i> F2 (NR043273)	88.43	Sedimentos marinos
20	<i>Petrimonas sulfuriphila</i> BN3 (NR042987)	97.55	Yacimiento de petróleo canadiense biodegradado
24	<i>Maribellus luteus</i> XSD2 (NR165017)	91.77	Agua de mar
28	<i>Apibacter adventoris</i> wkB301 (NR148773)	80.86	Intestino de abejas hospedadoras
33	<i>Bacteroides graminisolvens</i> JCM 15093 (NR113069)	97.82	Colección JCM:15093
40 ^a	<i>Paludibacter propionicipigenes</i> WB4 (NR074577)	93.27	Residuos de plantas de arroz
46	<i>Puteibacter caeruleilacunae</i> JC036 (NR180177)	90.28	Yongle Blue Hole
49 ^a	<i>Paludibacter propionicipigenes</i> WB4 (NR074577)	88.11	Residuos de plantas de arroz
Phylum <i>Candidatus Cloacamonas</i>			
5	No cultivable <i>Candidatus Cloacamonas</i> sp. ALB21 (JQ906964)	97.53	Laguna anaeróbica porcina
Phylum <i>Chloroflexi</i>			
4	<i>Ornatilinea apprima</i> P3M-1 (NR109544)	81.66	Estera microbiana
8	<i>Ornatilinea apprima</i> P3M-1 (NR109544)	78.11	Estera microbiana
21	<i>Longilinea arvoryzae</i> KOMÉ-1 (NR041355)	84.06	Suelo de arrozal
36	<i>Bellilinea caldifistulae</i> GOMI-1 (NR041354)	91.49	Lodo de digester termofílico

41 ^b	<i>Leptolinea tardivitalis</i> YMTK-2 (NR040971)	89.14	Lodo granular UASB
53 ^b	<i>Leptolinea tardivitalis</i> YMTK-2 (NR040971)	93.06	Lodo granular UASB
<hr/>			
Phylum <i>Firmicutes</i>			
1 ^c	<i>Flavonifractor plautii</i> 265 (NR029356)	90.64	Colección DSM:6740
2	<i>Clostridium quinii</i> DSM 6736 (NR026149)	96.73	Colección DSM:6736
15 ^c	<i>Flavonifractor plautii</i> 265 (NR029356)	92.45	Colección DSM:6740
18	<i>Succinispira mobilis</i> 19gly1 (NR028868)	95.61	Colección DSM:622
23	<i>Sedimentibacter hydroxybenzoicus</i> JW/Z-1 (NR029146)	94.68	Colección DSM:7310
30	<i>Planifilum composti</i> P8 (NR135724)	80.89	Compost
47 ^d	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> JW/YJL-S1 (NR115693)	91.59	Sistema de humedales que reciben agua sulfatada ácida
48	<i>Tissierella praeacuta</i> ATCC 25539 (NR119111)	97.82	Colección ATCC:25539
52 ^d	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> JW/YJL-S1 (NR115693)	93.35	Sistema de humedales que reciben agua sulfatada ácida
70	<i>Anaerobacterium chartisolvens</i> T-1-35 (NR125464)	97.85	Suelo de campo de arroz
75 ^c	<i>Flavonifractor plautii</i> 265 (NR029356)	89.73	Colección DSM:6740
95	<i>Peptoclostridium acidaminophilum</i> a1-2 (NR121725)	100	Colección DSM:3953
101	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> JW/YJL-S1 (NR115693)	85.41	Sistema de humedales que reciben agua sulfatada ácida
<hr/>			
Phylum <i>Spirochaetes</i>			
26	<i>Sphaerochaeta globosa</i> Buddy (NR114608)	98.92	Sedimento de agua dulce
37	<i>Rectinema cohabitans</i> HM (NR156915)	92.28	Cultivo de enriquecimiento degradante de naftaleno anaeróbico
<hr/>			
Phylum <i>Synergistetes</i>			
38	<i>Lactivibrio alcoholicus</i> 7WAY-8-7 (NR125451)	89.08	Suelo de campo de arroz
<hr/>			
Phylum <i>Thermodesulfobacteriota</i>			
22	<i>Syntrophobacter wolinii</i> DB (NR028020)	93.91	Colección DSM:2805

34	<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i> UI (NR041306)	97.57	Lodo granular de UASB
63	<i>Solidesulfovibrio alcoholivorans</i> SPSN (NR037130)	96.97	Colección DSM:5433
85	<i>Smithella propionica</i> LYP (NR024989)	95.63	Colección ATCC:700169
<hr/>			
Phylum <i>Thermotogota</i>			
7	<i>Mesotoga infera</i> VNs100 (NR117646)	98.11	Colección DSM:25546

^a Divergencia entre OTUs 40 y 49 de 7.34 %. ^b Divergencia entre OTUs 41 y 53 de 9.94 %. ^c Divergencia entre OTUs 1 y 15 de 2.71 %, por lo cual se les considera la misma especie filogenética. ^d Divergencia entre OTUs 47 y 52 de 5.79 %.

Anexo Q Árbol filogenético del dominio *Archaea* y *Bacteria* de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.

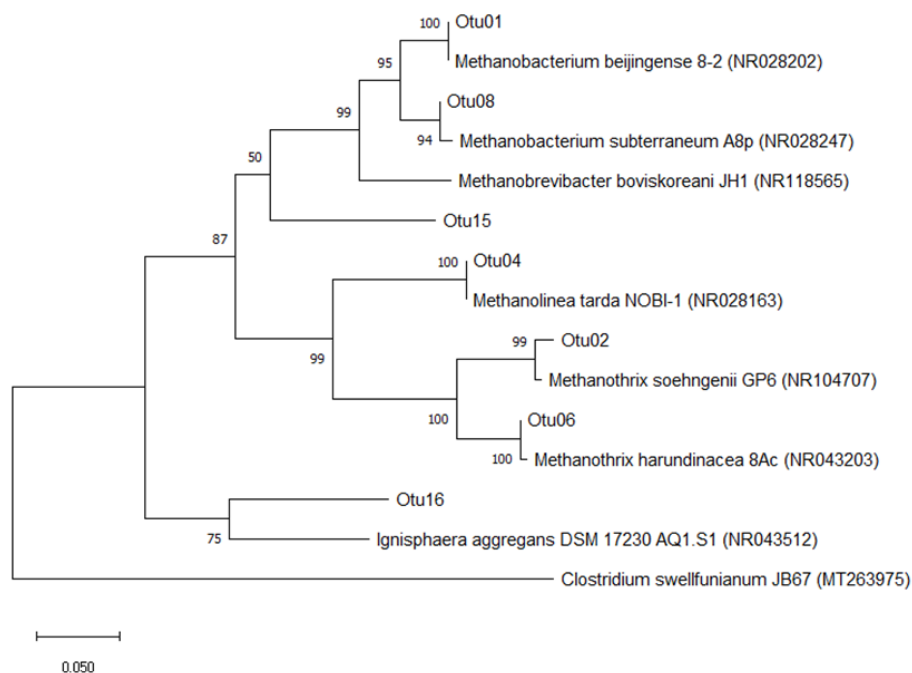


Figura 8. Árbol filogenético *Archaea* generado por el método de Máxima Parsimonia aplicando el algoritmo de Jukes-Cantor con 1000 bootstrap usando el software Mega11.

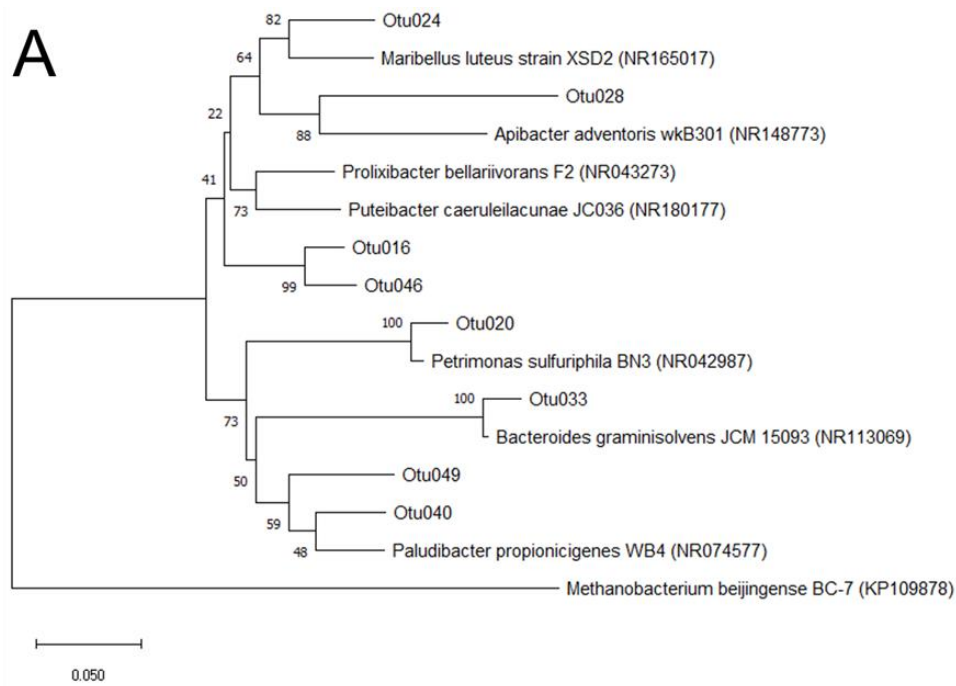
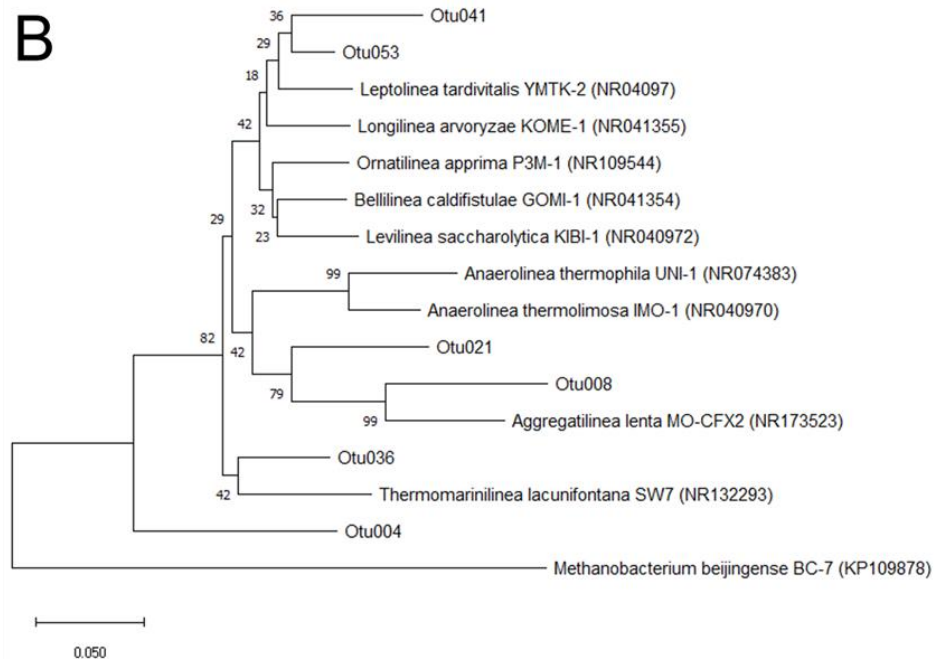
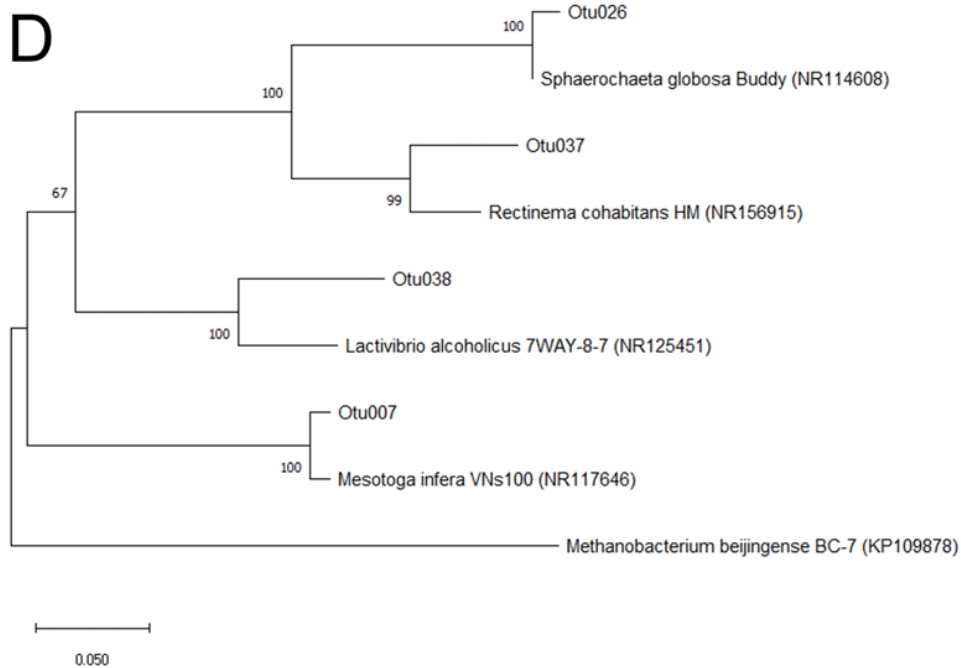
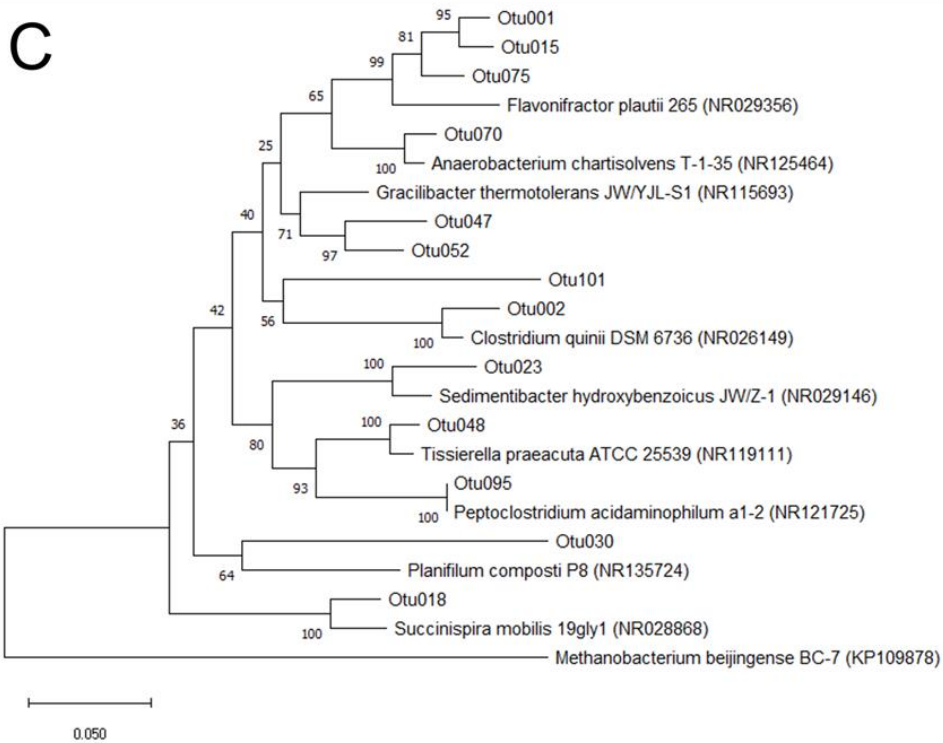
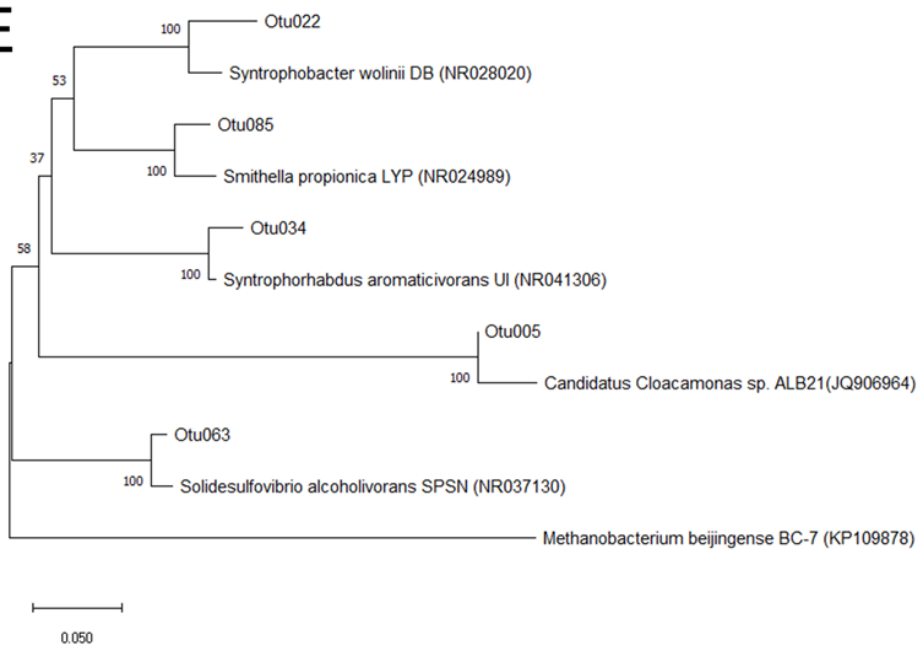


Figura 9. Árbol filogenético del dominio *Bacteria* generado por el método de Máxima Parsimonia aplicando el algoritmo de Jukes-Cantor con 1000 bootstrap usando el software Mega11. (A) Phylum *Bacteroidetes*. (B) Phylum *Chloroflexi*. (C) Phylum *Firmicutes*. (D) Phyla *Spirochaetes*, *Synergistetes* y *Thermotogota*. (E) Phyla *Candidatus Cloacimonadota* y *Thermodesulfobacteria*.





E



Anexo R Abundancia relativa de poblaciones bacterianas y arqueas dominantes y sus características biológicas de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano

Tabla 9. Resultados de la abundancia relativa del gen 16S rRNA (ADN genómico) en porcentaje de poblaciones bacterianas y arqueas dominantes (≥ 1 %), características biológicas como respiración, rango de temperatura para el crecimiento, sustratos fermentados y principales subproductos.

Poblaciones dominantes	Ino-D	Glu-D	HE-D	HES-D	Características biológicas	Referencias
Comunidad <i>Bacteria</i>						
Bacterias fermentativas						
<i>Clostridium quinii</i>	32.02	5.15	4.27	10.46	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 15 - 45 °C. Fermenta glucosa y xilosa a formiato, acetato, lactato, etanol y H ₂ .	Svensson <i>et al.</i> , 1992
<i>Prolixibacter bellariivorans</i>	5.54	1.80	2.83	1.83	Anaerobio facultativo. Rango de temperatura de crecimiento: 4 - 42 °C. Fermenta glucosa y xilosa a acetato, succinato y propionato.	Holmes <i>et al.</i> , 2007
<i>Maribellus luteus</i>	4.12	2.04	0.49	1.09	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 20 - 40 °C. Puede oxidar como fuente de carbono el acetato.	Zhou <i>et al.</i> , 2019
<i>Sphaerochaeta globosa</i>	2.91	0.30	0.85	2.55	Anaerobio facultativo. Rango de temperatura de crecimiento: 17 - 37 °C. Fermenta glucosa y xilosa a acetato y formiato.	Ritalahti <i>et al.</i> , 2011
<i>Paludibacter propioniciigenes</i> (OTU 40)	2.62	1.28	0.06	0.49	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 15 - 40 °C. Fermenta glucosa y xilosa a propionato y acetato.	Ueki <i>et al.</i> , 2006
<i>Puteibacter caeruleilacunae</i>	1.46	0.44	1.08	0.29	Anaerobio facultativo. Rango de temperatura de crecimiento: 4 - 37 °C. Fermenta glucosa.	Sun <i>et al.</i> , 2020

<i>Paludibacter propionicigenes</i> (OTU 49)	1.11	0.18	0.27	1.06	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 15 - 40 °C. Fermenta glucosa y xilosa a propionato y acetato.	Ueki <i>et al.</i> , 2006
<i>Anaerobacterium chartisolvens</i>	1.02	0.02	0.03	0.48	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 15 - 40 °C. Fermenta glucosa y xilosa a acetato, etanol, CO ₂ y H ₂ .	Horino <i>et al.</i> , 2014
<i>Succinispira mobilis</i>	0.83	3.20	0.00	2.70	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 37 °C. Fermenta piruvato a formiato, acetato, propionato, CO ₂ y H ₂ .	Janssen y O'Farrell, 1999
<i>Lactivibrio alcoholicus</i>	0.78	1.06	1.44	0.99	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 40 °C. Fermenta glucosa y xilosa a acetato y H ₂ .	Qiu <i>et al.</i> , 2014
<i>Mesotoga infera</i>	0.72	1.84	2.37	2.16	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 30 - 50 °C. Fermenta glucosa y xilosa a acetato y CO ₂ .	Ben Hania <i>et al.</i> , 2013
<i>Rectinema cohabitans</i>	0.61	1.64	1.31	0.92	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 12 - 50 °C. Fermenta glucosa a etanol, acetato y H ₂ .	Koelschbach <i>et al.</i> , 2017
<i>Bacteroides graminisolvens</i>	0.39	1.37	0.13	2.75	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 5 - 40 °C. Fermenta glucosa y xilosa a acetato y propionato.	Nishiyama <i>et al.</i> , 2009
<i>Planifilum composti</i>	0.36	1.03	1.18	0.50	Anaerobio obligado. Fermenta glucosa y xilosa a ácidos.	Han <i>et al.</i> , 2013
<i>Apibacter adventoris</i>	0.21	3.33	0.85	1.30	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 20 - 40 °C. Fermenta glucosa a ácidos.	Kwong y Moran, 2016
<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	0.04	4.47	2.04	1.90	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 15 - 40 °C. Fermenta glucosa a acetato, CO ₂ y H ₂	Grabowski <i>et al.</i> , 2005
<i>Flavonifractor plautii</i>	0.00	24.00	20.48	21.00	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 35 - 45 °C. Fermenta glucosa a acetato y butirato.	Carlier <i>et al.</i> , 2010

<i>Sedimentibacter hydroxybenzoicus</i>	0.00	0.02	5.83	0.84	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 14 - 40 °C. Fermenta piruvato a acetato y butirato.	Breitenstein <i>et al.</i> , 2002
<i>Gracilibacter thermotolerans</i> (OTU 47)	0.00	0.00	0.00	2.25	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 54 °C. Fermenta glucosa y xilosa acetato y lactato.	Lee <i>et al.</i> , 2006
<i>Gracilibacter thermotolerans</i> (OTU 52)	0.00	0.00	0.00	1.90	Ídem	Lee <i>et al.</i> , 2006
<i>Gracilibacter thermotolerans</i> (OTU 101)	0.00	1.03	0.00	0.00	Ídem	Lee <i>et al.</i> , 2006
<i>Tissierella praeacuta</i>	0.00	1.25	0.38	0.80	Anaerobio obligado. Temperatura óptima de crecimiento 37 °C. Fermenta glucosa a acetato, butirato e isovalerato.	Collins y Shah, 1986
<hr/>						
Fermentadores sintróficos facultativos						
<i>Ornatilinea apprima</i> (OTU 4)	6.92	5.98	8.29	7.30	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 30 - 45 °C. Fermenta glucosa y xilosa a lactato, acetato, CO ₂ y H ₂	Podosokorskaya <i>et al.</i> , 2013
<i>Ornatilinea apprima</i> (OTU 8)	5.26	2.59	3.05	4.66	Ídem	Podosokorskaya <i>et al.</i> , 2013
<i>Longilinea arvoryzae</i>	2.19	2.11	2.52	1.77	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 30 - 40 °C. Fermenta glucosa y xilosa a acetato, lactato y H ₂ .	Yamada <i>et al.</i> , 2007
<i>Bellilinea caldifistulae</i>	0.87	1.26	1.72	0.85	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 30 - 65 °C. Fermenta glucosa a acetato, lactato, formiato y H ₂ .	Yamada <i>et al.</i> , 2007
<i>Leptolinea tardivitalis</i> (OTU 41)	0.56	0.98	1.44	0.67	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 50 °C. Fermenta glucosa y xilosa a acetato, lactato, piruvato y H ₂ .	Yamada <i>et al.</i> , 2006
<i>Leptolinea tardivitalis</i> (OTU 53)	0.27	0.54	1.08	0.42	Ídem	Yamada <i>et al.</i> , 2006

Acetogénicos sintróficos obligados						
No cultivable <i>Candidatus Cloacamonas</i>	3.92	9.45	7.70	1.07	Anaerobio obligado. Metaboliza propionato a acetato y CO ₂ .	Pelletier <i>et al.</i> , 2008
<i>Syntrophobacter wolinii</i>	1.93	1.38	1.91	1.97	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 10 - 40 °C. Metaboliza propionato a acetato, H ₂ y formiato.	Liu <i>et al.</i> , 1999
<i>Syntrophorhabdus aromaticivorans</i>	1.30	1.04	1.13	1.13	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 10 - 40 °C. Metaboliza propionato a acetato, H ₂ y formiato.	Qiu <i>et al.</i> , 2008
<i>Smithella propionica</i>	1.04	0.44	0.05	0.05	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 10 - 40 °C. Metaboliza propionato a acetato, butirato y H ₂ .	Liu <i>et al.</i> , 1999
Bacterias sulfato reductoras						
<i>Solidesulfobivrio alcoholivorans</i>	0.36	1.10	0.04	0.37	Anaerobio obligado. Utiliza el azufre, sulfato, sulfito y tiosulfato como aceptores de electrones y se reducen a sulfuro. La utilización de H ₂ , formiato y metanol requiere acetato como fuente de carbono.	Qatibi <i>et al.</i> , 1991
Comunidad Archaea						
Metanógenos reductores de CO ₂						
<i>Methanobacterium beijingense</i>	64.96	68.66	70.04	71.80	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 50 °C. Metaboliza CO ₂ + H ₂ y formiato a metano.	Ma <i>et al.</i> , 2005
<i>Methanobacterium subterraneum</i>	1.98	1.85	2.79	2.72	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 36 - 45 °C. Metaboliza CO ₂ + H ₂ y formiato a metano.	Kotelnokova <i>et al.</i> , 1998

<i>Methanolinea tarda</i>	1.15	1.22	0.81	0.65	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 35 - 55 °C. Metaboliza CO ₂ + H ₂ y formiato a metano.	Imachi <i>et al.</i> , 2008
<i>Methanobrevibacter boviskorean</i>	1.04	1.42	0.74	0.39	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 37 - 40 °C. Metaboliza CO ₂ + H ₂ y formiato a metano.	Lee <i>et al.</i> , 2013
<hr/>						
Metanógenos acetoclásticos						
<i>Methanothrix soehngeni</i>	26.31	20.95	19.14	19.70	Anaerobio obligado. Temperatura óptima de crecimiento: 37 °C. Metaboliza el acetato a metano y CO ₂ .	Huser <i>et al.</i> , 1982
<i>Methanothrix harundinacea</i>	2.49	2.32	4.86	3.39	Anaerobio obligado. Rango de temperatura de crecimiento: 25 - 45 °C. Metaboliza el acetato a metano y CO ₂ .	Ma <i>et al.</i> , 2006
<hr/>						

Anexo S Peso de los componentes de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano

Tabla 10. Peso de los componentes de la prueba en condiciones óptimas con diferentes sustratos en la producción de metano.

Variable	Componente 1	Componente 2
Volumen de metano (CH ₄ vol)	0.2956	0.0975
Tasa de producción volumétrica de metano (VMPR)	0.2859	0.1467
Rendimiento (CH ₄ Y)	-0.1473	0.3864
Concentración de DQO removida (gDQO)	0.2506	-0.2487
Concentración acetato consumido (ConsAc)	0.3031	0.0068
Concentración final propionato (FinPro)	0.2042	0.3268
Concentración final butirato (FinBut)	-0.1723	0.3637
Metanógenos CO ₂ reductores (CO ₂ met)	-0.3026	-0.0251
Fermentadores (Ferm)	0.2206	0.3032
Metanógenos acetoclásticos (Acemet)	0.3030	0.0139
Fermentadores sintróficos facultativos (FSF)	-0.2384	0.2730
Acetógenos sintróficos obligados (ASO)	0.2215	0.3018
Índice de diversidad Shannon <i>Archaea</i> (HA)	0.2557	0.2373
Índice de diversidad Simpson <i>Archaea</i> (DA)	-0.2897	-0.1299
Índice de diversidad Shannon <i>Bacteria</i> (HB)	-0.1702	0.3659
Índice de diversidad Simpson <i>Bacteria</i> (DB)	-0.2585	-0.2308