

Dinámica de las poblaciones arqueanas metanogénicas en un digestor FBR durante la transición de condiciones mesofílicas a termofílicas aplicando esquemas de control

Carlos Javier Vázquez-Cotero, Raúl Snell-Castro*, Hugo Oscar Méndez-Acosta, Juan Paulo García-Sandoval y Alejandro Isaac Gutiérrez-Gómez

Departamento de Ingeniería Química, CUCEI-Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Guadalajara, Jalisco, México.

* Autor de correspondencia: raul.snell@cucei.udg.mx. Teléfono: 3313785900, ext. 27550.

Recibido: 13 de abril de 2021 Aceptado: 27 de mayo de 2021

Resumen: El propósito de este estudio fue la caracterización molecular de la comunidad arqueana metanogénica en un reactor de biopelícula fija (FBR por sus siglas en inglés) alimentado con vinazas tequileras. Dicha caracterización se realizó durante la transición de condiciones de operación mesofílicas (37 °C) a termofílicas (55 °C) aplicando esquemas de control en cascada. Inicialmente, el FBR se arrancó y operó bajo condiciones mesofílicas aplicando un incremento de 5 a 6.6 g-DQO L⁻¹ d⁻¹ en la carga volumétrica aplicada para evaluar un esquema de control donde se usó la alcalinidad (factor alfa) como factor de referencia para adaptar el flujo de alimentación. Posteriormente, el FBR fue operado bajo condiciones termofílicas incrementando la temperatura de manera directa y después escalonada mediante la aplicación de un esquema de control que usó la alcalinidad (factor alfa) como factor de referencia para regular la temperatura del bioproceso, manteniendo el flujo de alimentación constante. Las poblaciones arqueanas fueron caracterizadas por medio de secuenciación masiva y un análisis filogenético de las regiones variables 4 y 5 del gen de ARN ribosomal 16S. Los resultados sobre la caracterización de la comunidad arqueana indicaron que las poblaciones de arqueas productoras de metano por la ruta acetótrofa (*Methanosaeta harundinaceae*, *M. thermoacetophila*, *Methanosaeta* sp., *Methanosarcina thermophila* y *Methanometylovorans uponensis*) mostraron una reducción de sus abundancias relativas bajo condiciones mesofílicas. Mientras que, las poblaciones de arqueas productoras de metano por la ruta hidrogenótrofa (*Methanobacterium beijingense*, *M. subterraneum*, *Methanofollis liminatans*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanolinea tarda* y *Methanomassiliicoccus* sp.) incrementaron sus abundancias relativas, indicando un fenómeno de adaptación fisiológica a las condiciones mesofílicas y obteniendo una relación de arqueas hidrogenótrofas:acetótrofas de 87:8. Sin embargo, las dinámicas poblacionales durante la etapa termofílica indicaron que las arqueas metanógenas acetótrofas incrementaron al doble sus abundancias relativas hasta alcanzar una relación de arqueas hidrogenótrofas:acetótrofas de 81:16, indicando un fenómeno de adaptación fisiológica a las condiciones termofílicas cuando el esquema de control aplicó incrementos paulatinos de temperatura, ya que el incremento directo a 55 °C desestabilizó a la comunidad arqueana y factor alfa.

Palabras clave: Comunidad arqueana; FBR; vinazas tequileras; esquema de control; termofilia

Dynamics of methanogenic archaean populations in a FBR digester during the transition from mesophilic to thermophilic conditions applying control schemes

Abstract: The purpose of this study was the molecular characterization of the methanogenic *Archaea* community in a fixed biofilm reactor (FBR) fed with tequila vinasses. This characterization was realized during the transition from mesophilic (37 °C) to thermophilic (55 °C) conditions applying cascade control schemes. Initially, the FBR was started-up and operated under mesophilic conditions applying a change from 5 to 6.6 g-COD L⁻¹ d⁻¹ in the organic loading rate to evaluate a control scheme where the reference variable was the alkalinity (alpha factor) and the controlled variable was the tequila vinasses (substrate) flow rates. Subsequently, the FBR was operated under thermophilic conditions increasing the temperature in a direct manner and after, in a stepwise manner by applying a control scheme which used the alkalinity (alpha factor) as a reference factor to regulate the temperature of the bioprocess, keeping the tequila vinasses flow rate constant. The *Archaea* community was characterized by mass sequencing and further phylogenetic analysis of the variable regions 4 and 5 of the 16S ribosomal RNA gene. The results on the characterization of the *Archaea* community indicated that the populations of methane-producing *Archaea* by the acetotrophic pathway (*Methanosaeta harundinaceae*, *M. thermoacetophila*, *Methanosaeta* sp., *Methanosarcina thermophila* and *Methanometylovorans uponensis*) showed a reduction in their relative abundances during the disturbances applied under mesophilic conditions. Whereas, the populations of methane-producing *Archaea* by the hydrogenotrophic pathway (*Methanobacterium beijingense*, *M. subterraneum*, *Methanofollis liminatans*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanolinea tarda*, and *Methanomassiliicoccus* sp.) increased their relative abundances, indicating a phenomenon of physiological adaptation to the environmental disturbances under mesophilic conditions, obtaining a hydrogenotrophic:acetotrophic *Archaea* ratio of 87:8. However, the population dynamics during the thermophilic stage indicated that the methanogenic acetotrophic archaea doubled their relative abundance reaching a hydrogenotrophic:acetotrophic *Archaea* ratio of 81:16, indicating a phenomenon of physiological adaptation to thermophilic conditions when the control scheme applied the increase of the temperature in a stepwise manner, since the direct increase to 55 °C destabilized the *Archaea* community and the alpha factor.

Keywords: Anaerobic Biofilm; Anaerobic Digestion Process; Anaerobic Hybrid Reactor; Alkalinity; Biomass adhering

Introducción

La industria tequilera en México ha tenido un éxito comercial en los últimos años, alcanzando producciones superiores a los 370 millones de litros de tequila y generación de aguas residuales equivalentes a 3.74 millones de m³ de aguas residuales (CRT, 2020; Arreola-Vargas *et al.* 2018). Estas aguas residuales conocidas como vinazas tequileras tienen una alta concentración de materia orgánica (30-50 gDQO/L), lo que permite valorizarlas como sustratos potenciales para la producción de biocombustibles como el metano mediante digestión anaerobia (Méndez-Acosta *et al.*, 2010). La eficiencia sobre la producción de metano en la digestión anaerobia depende del desempeño de las comunidades microbianas, siendo las poblaciones de arqueas metanogénicas muy importantes para tener altos rendimientos en la producción de metano (Snell-Castro *et al.*, 2019). Estas poblaciones son sensibles a perturbaciones ambientales y responden a esquemas de control (Méndez-Acosta *et al.*, 2016).

En este contexto, estudios recientes han demostrado que los bioprocesos anaerobios para la producción de metano tiene mejores rendimientos en la producción de dicho biocombustible bajo condiciones termofílicas en comparación con las condiciones mesofílicas, ya que a mayores temperaturas de operación hay un aumento en las tasas de crecimiento de los microorganismos y tasa de consumo del sustrato, aunque se ha observado una baja estabilidad en la producción de metano (Lee *et al.*, 2018; Espinoza-Escalante *et al.*, 2009). Dicha baja estabilidad se debe a la reducción de la diversidad arqueana causada por un predominio de poblaciones hidrogenotróficas termófilas productoras de metano; mientras que, las poblaciones acetotróficas productoras de metano reducen considerablemente su abundancia, impactando negativamente en el rendimiento en la producción de metano. Figueroa-González *et al.* (2018) llevaron a cabo la adaptación fisiológica de lodo anaerobio mesofílico a condiciones termofílicas, lo que resultó en un mayor rendimiento sobre la producción de metano. Sin embargo, la adaptación de la biomasa a condiciones termofílicas debe mantener una alta diversidad arqueana metanogénica y una relación entre metenógenas hidrogenótroficas y acetótroficas cercana a uno para mantener la estabilidad del reactor a largo plazo.

Por lo anterior, el propósito de este estudio fue la caracterización de la abundancia relativa, diversidad y dinámicas poblaciones de la comunidad arqueana metanogénica en un reactor de biopelícula fija (FBR por sus siglas en inglés) durante la transición de condiciones mesofílicas (37 °C) a termofílicas (55 °C) aplicando esquemas de control en cascada. Esto implicó el seguimiento de la dinámica poblacional de la comunidad arqueana productora de metano durante la adaptación de las poblaciones metenógenas hidrogenótroficas y acetótroficas mesofílicas a condiciones termofílicas, usando como sustrato vinazas tequileras.

Materiales y Métodos

Sustrato e inóculo

El reactor fue inoculado con una mezcla 50%:50% de dos lodos granulares anaerobios colectados de dos reactores anaerobios tipo UASB, uno de Tequila Herradura ubicada en Amatitán y otro de Cervecería Heineken (antes Cuautemoc-Moctezuma) ubicada en Guadalajara, ambas en Jalisco. La caracterización de la mezcla de los lodos anaerobios indicó una concentración de 44 g-SST L⁻¹ y 30 g-SSV L⁻¹, respectivamente. Se utilizó como sustrato para alimentar el FBR vinazas tequileras, que fueron colectadas de una fábrica de Tequila ubicada en Amatitán, Jalisco. Dichas vinazas fueron filtradas para eliminar los sólidos en suspensión y se acidificaron con HCl para lograr un pH de 2.0, evitando la fermentación espontánea durante su almacenamiento.

Estrategia experimental

Se implementó un digestor FBR con un volumen de trabajo de 3 L (Figura 1) que contenía un soporte fijo con perfil de panal fabricado de PVC para permitir el crecimiento de la biopelícula. Adicionalmente, se colocaron en los bordes de soporte diez tiras de PVC removibles de 30 cm de largo y 3 cm de ancho donde también creció la biopelícula, teniendo como propósito removerlas al momento del muestreo de la biomasa sin perturbar a la comunidad microbiana adherida al soporte principal. El FBR fue instrumentado para el monitoreo en línea de los flujos de alimentación y recirculación, pH, temperatura, presión, flujo y composición del biogás durante 464 días de operación divididos en 5 etapas (Tabla 1). Adicionalmente, se analizaron las concentraciones de DQO, azúcares totales, lactato y ácidos grasos volátiles (AGV)

en la entrada y salida del FBR. La composición del biogás se corroboró mediante cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer.

Tabla 1. Duración, temperatura de operación y colecta de biomasa para el análisis de la comunidad microbiana.

Etapa	Duración (d)	Temperatura de operación (°C)	Clave de la muestra de biomasa	Tipo de biomasa
Etapa 1	21	37	U3 (inóculo) / U5	Lodo granular/Biopelícula
Etapa 2	322	37	U99	Biopelícula
Etapa 3	12	37 a 55	U105	Biopelícula
Etapa 4	40	37	U115	Biopelícula
Etapa 5	69	37 a 46	U119	Biopelícula

La etapa 1 consistió en el arranque del FBR bajo condiciones mesofílicas aplicando un TRH de 5 días y una carga volumétrica aplicada (CVA) de 6.63 g-DQO L⁻¹ d⁻¹ con una duración de 21 días. La etapa 2 correspondió al periodo de mesofilia donde se aplicaron cambios de la CVA por medio de un esquema de control que usó la alcalinidad (factor alfa) como factor de referencia para adaptar el flujo de alimentación de las vinazas tequileras; esta etapa duró 322 días y finalizó con un TRH de 3 días y una CVA de 5.08 g-DQO L⁻¹ d⁻¹. La etapa 3 inició con los mismos TRH y CVA de la etapa anterior, pero aplicando la transición de la temperatura de 37 °C a 55 °C en un solo paso para lograr el cambio a condiciones termofílicas mediante un esquema de control, que usó la alcalinidad (factor alfa) como factor de referencia para regular la temperatura del bioproceso, manteniendo el flujo de alimentación de las vinazas tequileras constante. En la etapa 4 el reactor fue operado en mesofilia otra vez sin el esquema de control debido a una baja actividad metanogénica y un elevado factor alfa obtenidos al final de la etapa 3. Finalmente, durante la etapa 5 se operó nuevamente aplicando el esquema de control con aumentos de temperatura de forma escalonada de 37 a 40 °C y 40 a 46 °C. Estos incrementos no continuaron hasta 55 °C debido a la disminución de la actividad metanogénica de forma irre recuperable causada por la alcalinización accidental del FBR, ya que un mal funcionamiento de la bomba de sosa alcalinizó el interior del FBR matando a la comunidad microbiana.

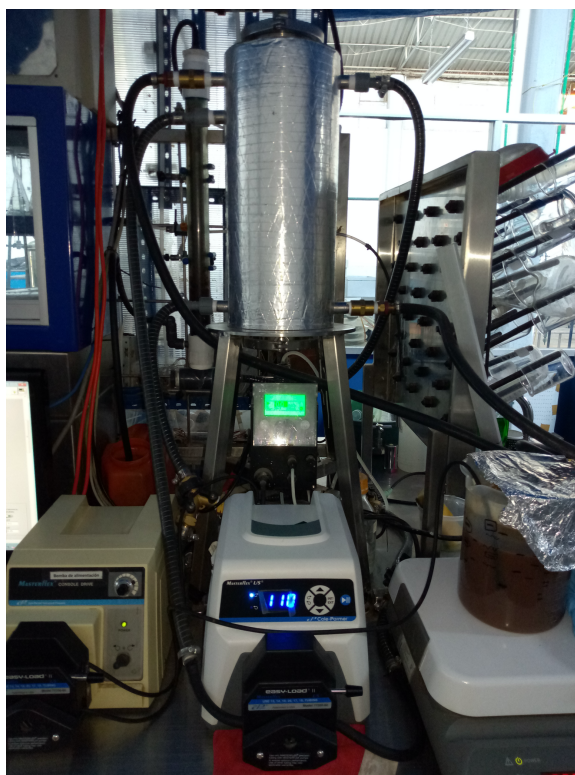


Figura 1. Reactor de biomasa fija metanogénico de 3 L durante su operación.

Caracterización de la comunidad arqueana

En cada etapa se realizaron colectas de biomasa, iniciando con 20 mL de lodo granular anaerobio usado como inóculo y posteriormente, se colectaron muestras de 5 mL de biopelícula (Tabla 1). La biomasa colectada fue sometida a extracción de ADN genómico (ADNg) por el método de Godon *et al.* (1997), la pureza ($A_{260}/A_{280} \approx 1.8$) y concentración de ADN extraído se cuantificaron utilizando el Eppendorf BioPhotometer D30. Estas muestras tuvieron una pureza alrededor de 1.78 y concentraciones de ADNg cercanas a 270 y 150 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ correspondientes a la biomasa del inóculo y las biopelículas, respectivamente. Finalmente, la calidad del ADNg extraído fue verificada por electroforesis para estimar la distribución de tamaño, lo que resultó en fragmentos de 20 Kb para todas las muestras (datos no presentados). El ADNg fue enviado al servicio de secuenciación genética masiva y análisis filogenético de las regiones variables 4 y 5 del gen de ARN ribosomal 16S usando el método illumina MiSeq (10,000 reads) del servicio INRA-Transfert en Narbonne, Francia. Los datos biológicos obtenidos se clasificaron en OTUs y se identificaron hasta el nivel de especie por comparación con otras secuencias genéticas usando como referencia la base de datos de genes de ARNr denominada Silva (Quast *et al.*, 2003). El criterio para considerar que una secuencia pertenecía a una especie conocida durante la comparación de las secuencias fue un 97% o más de similitud en las secuencias. Finalmente, se analizaron la composición y dinámicas de las poblaciones Archaea involucradas en la producción de metano durante la operación en mesofilia y transición a la termofilia aplicando dos esquemas de control, lo que permitió la evaluación de dichos esquemas en base a las dinámicas de las poblaciones arqueanas metanogénicas.

Resultados y Discusión

Desempeño del FBR

La cinética del factor alfa de alcalinidad durante el arranque y operación del reactor mostró dos aumentos cercanos a 1.4 debido a incrementos de la DQO en las vinazas tequileras para evaluar la robustez del sistema biológico en la primera etapa (Figura 2). Durante la segunda etapa, el factor alfa tuvo fluctuaciones debidas a que el controlador cambió los flujos durante el proceso, ya que el algoritmo buscaba encontrar el flujo óptimo. Al final de la tercera etapa el factor alfa volvió a incrementarse hasta 1.6. Esto es explicado por el rápido incremento en la temperatura del reactor hasta 55 °C, que causó la desestabilización de la comunidad microbiana, por lo que se implementó una etapa mesofílica sin el esquema de control para darle oportunidad a la comunidad microbiana de recuperar un valor del factor alfa más bajo (etapa 4). Finalmente, Las fluctuaciones en el factor alfa durante la etapa 5 fueron causadas por el incremento gradual de la temperatura del reactor regida por el controlador hasta el incidente mencionado con anterioridad sobre la alcalinización del FBR.

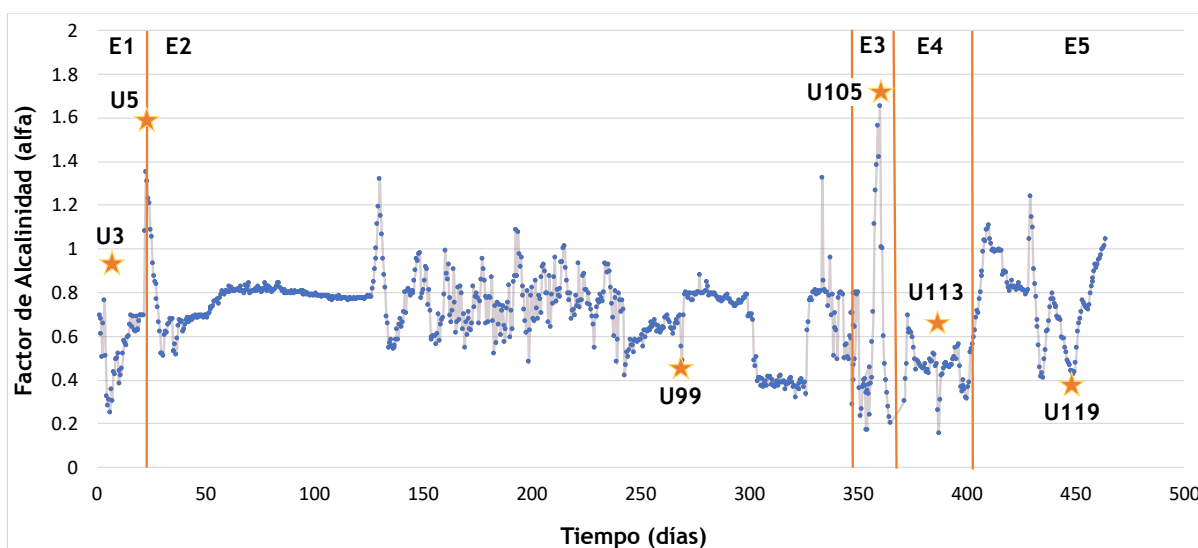


Figura 2. Cinética del factor alfa de alcalinidad durante el proceso. E1, E2, E3, E4 y E5 corresponden a las etapas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Las estrellas y claves U indican la colecta de las muestras de biopelícula para la caracterización de la comunidad arqueana.

Las condiciones de operación, el desempeño del reactor y las concentraciones de AGVs y lactato se indican en la Tabla 2. El reactor mostró una velocidad volumétrica de producción de metano (VVPM) máxima y eficiencia en la remoción de la DQO durante la etapa 2, pero con el menor contenido de metano en el biogás. El valor más alto en metano fue obtenido al final de las etapa 1. En cuanto a los AGVs y el lactato, sólo dos AGVs tuvieron concentraciones potencialmente inhibitorias, uno fue el acetato durante la etapa 3 termofílica, que coincidió con el valor del factor de alcalinidad más alto de 1.6. El otro fue el propionato, que tuvo una concentración muy alta al final del arranque o etapa 1 y durante la etapa 3.

Dinámica poblacional de las poblaciones arqueanas

En los procesos anaerobios metanogénicos se busca un equilibrio poblacional entre arqueas metanogénicas hidrogenótrofas y acetótrofas para producir metano por ambas rutas metabólicas. En este contexto, los resultados indicaron que las poblaciones hidrogenotróficas estuvieron afiliadas a *Methanobacterium beijingense*, *Methanobacterium subterraneum*, *Methanofollis liminatans*, *Methanoculleus marisnigri*, *Methanolinea tarda* y *Methanomassiliicoccus* sp. Mientras que, las poblaciones acetótrofas identificadas fueron *Methanosaeta harundinaceae*, *Methanosaeta thermoacetophila* *Methanosaeta* sp., *Methanosarcina thermophila* y *Methanometylovorans uponensis*.

Tabla 2. Condiciones de operación, desempeño del reactor y concentración de los ácidos grasos volátiles a lo largo de la operación del FBR. Los valores presentados corresponden a las fechas de la toma de muestra de biopelícula. Los valores sobre el desempeño del reactor y las concentraciones de AGVs y lactato corresponden al momento de la colecta de biomasa para el análisis de la comunidad arqueana.

	Etapa 1 (U5)	Etapa 2 (U99)	Etapa 3 (U105)	Etapa 4 (U113)	Etapa 5 (U119)
Condiciones de operación					
DQO (g L ⁻¹)	34.54	34.26	23.50	15.01	15.14
TRH (día)	5.80	6.65	4.42	5.42	2.99
CVA (g-DQO L ⁻¹ d ⁻¹)	4.95	5.15	5.32	2.77	5.06
Desempeño del digestor					
VVPM (L _{CH₄} L ⁻¹ d ⁻¹)	0.62	1.14	0.80	0.69	0.75
Eficiencia remoción DQO (%)	72.49	75.95	55.41	63.48	48.99
Volumen de biogás (L)	1.52	3.29	6.29	11.73	10.48
Porcentaje de metano (%)	67.29	55.27	60.49	56.91	60.48
AGVs y lactato (g L⁻¹)					
Acetato	0.7306	0.7150	1.5670	0.5960	0.6470
Propionato	2.1830	0.0000	0.4573	0.1750	0.1890
Butirato	0.0114	0.0000	0.0513	0.0000	0.0000
Lactato	0.0283	0.0000	0.0267	0.0000	0.0000

La relación porcentual entre hidrogenótrofas y acetótrofas en el inóculo fue 58:31. Cuando no se aplicó ningún esquema de control bajo condiciones mesofílicas (37 °C) durante la etapa 1, esta relación fue de 70:25 al final del arranque, favoreciendo a las poblaciones hidrogenotróficas. Ahora bien, a partir de la etapa 2 se aplicó el esquema de control que usó la alcalinidad como factor de referencia para adaptar el flujo de alimentación de las vinazas tequileras bajo condiciones mesofílicas; observándose la misma dinámica con una relación porcentual de hidrogenótrofas y acetótrofas a 87:8. Sin embargo, durante la etapa 3 cuando inició la termofilia (55 °C) aplicando un esquema de control, que usó la alcalinidad como factor de referencia para regular la temperatura del bioproceso, esta relación fue 87:10, favoreciendo a las poblaciones acetótrofas aun cuando se obtuvo el mayor valor del factor alcalinidad (1.6) y concentración de acetato. Esto se explica considerando el valor alto de la constante de afinidad por el acetato de las poblaciones del género *Methanosarcina*, que requieren de concentraciones altas de acetato para competir contra las poblaciones del género *Methanosaeta*, que tienen una constante de afinidad por el acetato con un valor bajo. En la etapa 4, la CVA se redujo a la mitad y se volvió a la mesofilia (37 °C) para reducir el valor alto de la alcalinidad, que condujo al mismo aumento de las poblaciones acetótrofas con una relación 83:14. Finalmente, durante la etapa 5 se regresó a condiciones termofílicas, pero de manera paulatina iniciando a 41 °C y después a 46 °C, obteniéndose un nuevo incremento de las poblaciones acetótrofas hasta alcanzar una relación a 81:16. En la Figura 3 se puede observar la

dinámica poblacional de la comunidad arquea según su trofismo donde las poblaciones productoras de metano fueron las dominantes, siendo las poblaciones hidrogenotróficas y acetótroficas quienes presentaron una intensa dinámica poblacional a lo largo del bioproceso. Esta operación usando un esquema de control en base a la alcalinidad para aumentar la temperatura de operación resultó en una mayor presencia de las poblaciones de arqueas acetótroficas, cuyas abundancias tienden a disminuir cuando se opera en condiciones termofílicas (Zhang *et al.*, 2020; Kirkegaard *et al.*, 2017).

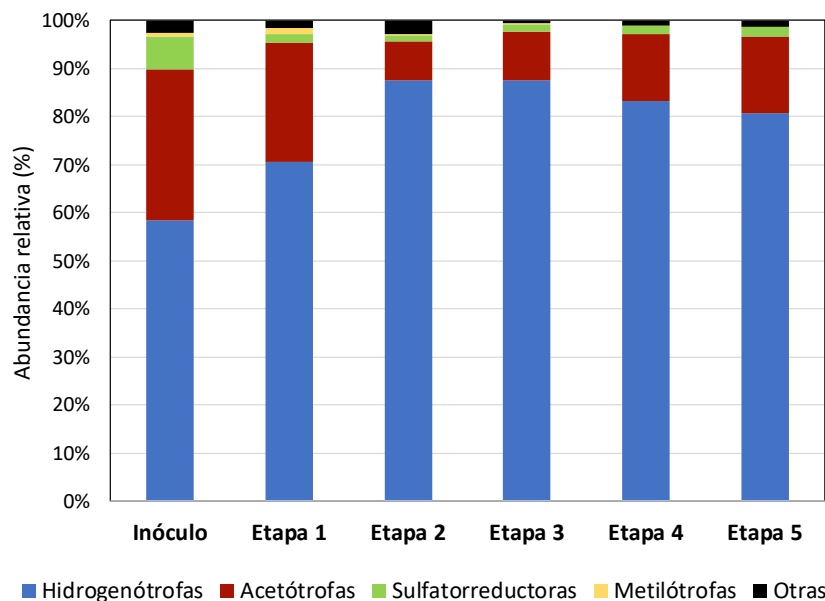


Figura 3. Abundancia relativa obtenida mediante el método Illumina de secuenciación masiva para el dominio *Archaea* (>1%).

Conclusiones

La evaluación de los esquemas de control basado en adaptar el flujo de alimentación en mesofilia a partir de las dinámicas poblacionales de las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas y acetótroficas indicó que hubo una relación porcentual entre poblaciones hidrogenotróficas y acetótroficas inadecuada, favoreciendo el crecimiento de las metanógenas hidrogenotróficas. Sin embargo, cuando se aplicó el esquema de control basado en el ajuste de la temperatura, se incrementó el crecimiento de las poblaciones de metanógenas acetótroficas, mejorando dicha relación y por ende, la robustez del proceso. Este esquema de control puede ser aplicado en la posterior operación de futuros reactores en condiciones termofílicas, cuya comunidad no se haya visto afectada por los cambios en la carga orgánica de la fase inicial del experimento.

Bibliografía

- Arreola-Vargas, J., Snell-Castro, R., Rojo-Liera, N. M., González-Álvarez, V., Méndez-Acosa, H. O. (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*, vol. (93). 591–599.
- CRT, 2019. Consejo Regulador del tequila-Statistical information. Accessed on October 2021. <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>.
- Espinoza-Escalante, F.M., Pelayo-Ortiz, C., Navarro-Corona, J., González-García, Y., Bories, A. & Gutiérrez-Pulido, H., (2009). Anaerobic digestion of the vinasses from the fermentation of *Agave tequilana* Weber to tequila: The effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. *Biomass and Bioenergy*, vol. 33, 14–20.
- Figueroa-González, I., Moreno, G., Carrillo-Reyes, J., Sánchez, A., Quijano, G., Buitrón, G. (2018). From mesophilic to thermophilic conditions: one-step temperature increase improves the methane production of a granular sludge treating agroindustrial effluents. *Biotechnology Letters*, vol. 40(3). 569–575.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R. (1997). Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied Environ. Microbiol.* 63(7), 2802-2813.
- Kirkegaard, R. H., McIlroy, S. J., Kristensen, J. M., Nierychlo, M., Karst, S. M., Dueholm, M. S., Nielsen, P. H. (2017). The impact of immigration on microbial community composition in full-scale anaerobic digesters. *Scientific Reports*, vol. 7(9343). 1–11
- Méndez-Acosta, H. O., Snell-Castro, R., Alcaraz-González, V., González-Álvarez, V., Pelayo-Ortiz, C. (2010). Anaerobic treatment of Tequila vinasses in a CSTR-type digester. *Biodegradation*, vol. 21(3). 357-363.

- Méndez-Acosta, H. O., Campos-Rodríguez, A., González-Álvarez, V., García-Sandoval, J. P., Snell-Castro, R., Latrille, E. (2016). A hybrid cascade control scheme for the VFA and COD regulation in two-stage anaerobic digestion processes. *Bioresource Technology*, vol. 218. 1195-1202.
- Snell-Castro, R., Méndez-Acosta, H. O., Arreola-Vargas, J., González-Álvarez, V., Pintado-González, M., González-Morales, M. T. & Godon, J. J. (2019). Active prokaryotic population dynamics exhibit high correlation to reactor performance during methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* var. *azul* bagasse. *Journal of applied microbiology*, 126(5), 1618-1630.
- Zhang, Q., Zhang, L., Guo, B., Liu, Y. (2020). Mesophiles outperform thermophiles in the anaerobic digestion of blackwater with kitchen residuals: Insights into process limitations. *Waste Management*, vol. 105. 279–288.