



Programa de Doctorado Conjunto UNAM-UH



*Universidad de La Habana  
Facultad de Biología  
Departamento de Microbiología y Virología*

*Adición de paja de arroz y arcillas residuales a la  
digestión anaerobia de estiércol porcino. Efecto sobre la  
comunidad procariota productora de metano*

*Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en  
Ciencias Biológicas*

*Aspirante: Lic. Janet Jiménez Hernández*

*La Habana  
2015*



Programa de Doctorado Conjunto UNAM-UH



*Universidad de La Habana  
Facultad de Biología  
Departamento de Microbiología y Virología*

*Adición de paja de arroz y arcillas residuales a la  
digestión anaerobia de estiércol porcino. Efecto sobre la  
comunidad procariota productora de metano*

*Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en  
Ciencias Biológicas*

*Aspirante: Lic. Janet Jiménez Hernández*

*Tutores: Dr. C. Gilda Guerra Rivera  
Dr. C. Adalberto Noyola Robles*

*La Habana  
2015*

## AGRADECIMIENTOS

De antemano, **gracias a todos** los que estuvieron acompañándome durante esta larga travesía. Gracias a **Dios** por darme esta oportunidad.

A **mi familia**, mi más profundo agradecimiento, siempre incondicionales, siempre apoyando todas mis locuras.

A mi tutora la **Profe Gilda**, gracias por brindarme su conocimiento, su experiencia, su apoyo incondicional y sobretodo su confianza. Sin su ayuda hubiese sido imposible concretar este trabajo, lograr este sueño. **MIL GRACIAS DESDE EL CORAZON.**

A mi tutor el **Dr. Adalberto Noyola**, gracias por aceptar la dirección de esta tesis. Gracias por permitirme estar cerca de usted, tan prestigiosa personalidad y nutrirme de sus valiosos conocimientos. Gracias por apoyar mi estancia en el Instituto de Ingeniería de la UNAM, la cual fue fundamental en mi desarrollo como investigadora. Gracias por sus contribuciones académicas, su exigencia y su dedicación.

A **Osvaldo Romero**, motor impulsor de este trabajo y del proyecto al que tributa. Gracias por ser, simplemente, la vela de este barco, gracias por tu amistad, por tu confianza y por creer en mí.

A mis asesores el **Dr. Juan M. Morgan Sagastume** y la **MSc. Margarita Cisneros**, gracias por su apoyo en mi estancias en la UNAM. Gracias por sus conocimientos, por su exigencia en lo académico y en lo experimental. Gracias Maggy, también por tu amistad y por estar siempre ahí cuando yo te necesito.

Gracias a los colegas y amigos del grupo de Digestión Anaerobia del Instituto de Ingeniería de la UNAM: **Alexa, Tanita, Carol, Dany, Mauricio, Yansito**, gracias por hacer mi estancia más provechosa y agradable.

Agradezco especialmente al **Dr. Michael Klocke**, a la **Dr. Susanne Theurel** y a la Dr. y amiga **Teresa Suarez**, del Instituto de Ingeniería Agrícola de Bornim-Potsdam, Alemania, por permitir y apoyar mi estancia allí. Gracias por sus conocimientos, por el apoyo en el laboratorio y en la publicación de los resultados y especialmente por hacer mi estancia muy agradable.

A mis incansables compañeros de batalla: los CEEPIANOS... **el Chino, Zule, Lucy, Lisbet, Ernestol, Bis, Mary, Reinier, Yenima, Obregon, Azaret, Edelvy**... a todos **GRACIAS** por su valiosa ayuda para realizar este sueño; por cuidar mi retaguardia; por hacerme el camino más agradable y placentero.

Agradezco especialmente a mis **Profes de la Facultad de Biología** tanto de la carrera como del posgrado. Ustedes son mi ejemplo a seguir y son parte del orgullo que siento de ser lo que soy.

Finalmente agradezco a todos **Mis amigos del alma**... ustedes saben quiénes son... donde quiera que estén... **GRACIAS** por su voto de confianza, por quererme aunque nunca les escriba ni una letra, ni los visite... **GRACIAS** por estar ahí cuando yo los necesito. Gracias por existir.

**El camino apenas comienza, la senda apenas se vislumbra, el terreno es escabroso, pero con ustedes, sé que puedo caminar tranquila. ¡GRACIAS A TODOS!**

## DEDICATORIA

*A mi hijo Yohan Manuel, la razón de mi vida, mi amor más grande, mi milagro.*

*A mis padres por regalarme el milagro de la vida, por demostrarme tanto amor, por confiar en mí, por apoyarme en todas mis aventuras.*

*A mi hermana por ser mi ejemplo y mi apoyo siempre.*

*A mis niñas, mis sobrinas Laura y Betica, mis amores del alma.*

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
AGVs	Ácidos grasos volátiles
<i>Alfa</i> ( $\alpha$ )	Relación entre la alcalinidad parcial y la alcalinidad total
AME	Actividad Metanogénica Específica
AP	Alcalinidad parcial
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
<i>ARNr 16S</i>	Gen codificante del fragmento de Ácido ribonucleico ribosómico de 16S
AT	Alcalinidad Total
ATP	Adenosina Trifosfato (por sus siglas en inglés)
<i>BLASTn</i>	Herramientas de búsqueda para alineamiento básico local nucleótido-nucleótido (por sus siglas en inglés)
DQO	Demanda química de oxígeno
GC	Guanina citosina
kb	Kilobases, equivalencia a 1000 pares de bases
OTUs	Unidades Taxonómicas Operacionales
p	Probabilidad asociada a cualquier análisis estadístico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés)
q-PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real
SV	Sólidos volátiles
STT	Sólidos totales totales
STV	Sólidos totales volátiles
STF	Sólidos totales fijos
T-RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales (por sus siglas en inglés)
VCO	Velocidad de carga orgánica
°C	Grados Celsius

## SÍNTESIS

La digestión anaerobia se ha convertido en una estrategia sustentable para el tratamiento de estiércoles porcinos, dado por la obtención de metano y un lodo con propiedades biofertilizantes. Este proceso es el resultado del metabolismo coordinado de bacterias y archaeas (Riviere *et al.*, 2009; Madigan *et al.*, 2010), cuya eficiencia depende de la estabilidad de la población ante cambios nutricionales y ambientales. En Cuba, la calidad del estiércol porcino y la presencia de inhibidores como el nitrógeno amoniacal, han limitado la eficiencia de su degradación anaerobia. En este trabajo se propuso como objetivo general: Analizar el efecto de la adición de paja de arroz y de arcillas residuales sobre la digestión anaerobia de estiércol porcino y la comunidad procariota responsable de la producción de metano.

Para ello, se evaluó la adición del cosustrato paja de arroz y la adición de arcillas residuales, a la digestión anaerobia de estiércol porcino, bajo régimen discontinuo, a temperaturas mesofílica (35 °C) y termofílica (55 °C) y bajo régimen semicontinuo en reactor de tipo tanque agitado, a temperatura mesofílica. Se optimizó la actividad metanogénica específica mediante el diseño del medio para la codigestión de los tres sustratos, utilizando la metodología de superficie de respuesta y un diseño compuesto central (factorial completo 2<sup>3</sup>). Además, se caracterizó la comunidad procariota desarrollada con la adición de la paja y las arcillas mediante técnicas microbiológicas y moleculares basadas en el gen *ARNr 16S* de bacterias y archaeas.

El diseño del medio de codigestión anaerobia permitió optimizar la actividad metanogénica a valores de 1,31 gCH<sub>4</sub>-DQO·gSV<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup>, superiores a los informados para la digestión de estiércol mezclado con sustratos similares, lo que propicia un mejor aprovechamiento de las mezclas de residuos para la producción de metano. Las arcillas residuales estimularon la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz, dado por sus propiedades adsorbentes que reducen el efecto inhibitorio del nitrógeno amoniacal presente en el estiércol. En régimen semicontinuo, la adición de arcillas mantuvo una producción de metano alta y estable por más de 20 días.

La temperatura tuvo un efecto determinante sobre la composición de la comunidad procariota. Las archaeas metanógenas acetotróficas del orden Methanosarcinales prevalecen en condiciones mesofílicas y son responsables del incremento de metano, lo que facilita la implementación de los sistemas de digestión anaerobia en las condiciones ambientales de Cuba. La adición de paja de arroz y arcillas residuales a la digestión de estiércol porcino provocó cambios en la diversidad y dinámica de la comunidad procariota, donde las poblaciones favorecidas fueron bacterias celulolíticas, especies del filo Bacteroidetes y especies de archaeas de la familia Methanosaetaceae. Se informaron siete secuencias del gen *ARN 16S* de bacterias que difieren de las previamente descritas en los órdenes conocidos y dos secuencias del gen *ARN 16S* de archaeas perteneciente al orden Methanomicrobiales, no relacionada con las familias antes descritas. Estos hallazgos cambian el estado actual del conocimiento sobre la estructura de estas comunidades procariotas y su dependencia de las interacciones tróficas.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1. La digestión anaerobia para la obtención de metano.....	6
1.1.1 Microbiología y bioquímica de la digestión anaerobia.....	6
1.1.2 Factores ambientales y nutricionales que afectan el procesos.....	9
1.1.3 Tecnologías de digestión anaerobia para obtener metano.....	15
1.1.4 Introducción de la tecnología de digestión anaerobia en Cuba.....	16
1.2. Tratamiento de residuos agropecuarios e industriales. El estiércol porcino.....	17
1.2.1 Tratamiento integrado de residuos mediante codigestión anaerobia.....	18
1.2.2 La paja de arroz como cosustrato.....	18
1.2.3 La adición de micronutrientes.....	19
1.3. Optimización de la digestión anaerobia para la obtención de metano.....	22
1.3.1 La Metodología de Superficie de Respuesta.....	23
1.3.2 La Actividad Metanogénica Específica.....	24
1.4. Comunidades microbianas en reactores de digestión anaerobia.....	24
1.4.1 Caracterización por métodos microbiológicos dependientes de cultivo y moleculares independientes de cultivo	
1.4.1.1 Filogenia y taxonomía de bacterias y archaeas anaerobias.....	27
1.4.1.2 Métodos moleculares para el análisis taxonómico y filogenético.....	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. Procedencia de los residuos agropecuarios e industriales. Caracterización físico- química.....	32
2.2. Experimentos en discontinuo de codigestión anaerobia de estos residuos para la obtención de metano, en condiciones mesofílica y termofílicas.....	32
2.2.1 Selección y caracterización de los inóculos.....	32
2.2.2 Experimentos de codigestión anaerobia en discontinuo.....	33
2.3. Análisis de las fermentaciones en discontinuo	
2.3.1 Parámetros físico-químicos.....	33
2.3.2 Determinación de ácidos grasos volátiles.....	34
2.3.3 Determinación de metano y dióxido de carbono.....	34
2.3.4 Determinación de la actividad metanogénica específica.....	34
2.4. Optimización de la actividad metanogénica específica en la codigestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales.....	34
2.4.1 Ensayos de validación del modelo de optimización.....	36
2.5. Determinación de la capacidad de adsorción de las arcillas.....	37
2.6. Co-digestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas residuales, en semicontinuo en reactor de tipo tanque agitado.....	38
2.6.1 Análisis de parámetros fisicoquímico del reactor semicontinuo.....	39
2.7. Análisis de la comunidad microbiana	
2.7.1 Métodos microbiológicos dependientes del cultivo.....	40
2.7.2 Métodos microbiológicos independientes del cultivo. Métodos moleculares.....	40

2.7.3	Análisis de la diversidad y organización de la comunidad procariota.....	44
2.8	Análisis estadístico.....	45

### 3. RESULTADOS

3.1.	Co-digestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz, con adición de arcillas residuales industriales. Ensayos en discontinuo.....	46
3.1.1	Caracterización de los sustratos.....	46
3.1.2	Co-digestión anaerobia de estiércol porcino utilizando el cosustrato paja de arroz en condiciones mesofílicas y termofílicas.....	47
3.1.3	Adición de arcillas a la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz.....	49
3.1.4	Capacidad de adsorción de las arcillas.....	50
3.2.	Optimización de la actividad metanogénica específica en la codigestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales	
3.2.1	Diseño de los experimentos.....	51
3.2.2	Obtención de metano durante la codigestión anaerobia de estiércol, paja y arcillas en mesofilia y termofilia.....	52
3.2.3	Modelo de regresión y evaluación estadística.....	54
3.2.4	Efectos de los componentes del modelo y sus interacciones sobre la actividad metanogénica específica.....	56
3.2.5	Superficie de respuesta tridimensional (3D) y sus contornos en dos dimensiones.....	57
3.2.6	Condiciones óptimas para maximizar la Actividad Metanogénica Específica .....	59
3.2.7	Validación de los modelos de optimización.....	59
3.3.	Estructura de la comunidad microbiana desarrollada con la codigestión de los tres sustratos en ensayos discontinuos	
3.3.1	Métodos microbiológicos dependiente de cultivo.....	60
3.3.2	Métodos moleculares independientes de cultivo.....	61
3.4.	Co-digestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas en reactor de tanque agitado bajo régimen semicontinuo, en condiciones mesofílicas.....	63
3.5.	Análisis de la comunidad microbiana desarrollada en el reactor de tanque agitado con la adición del cosustrato paja de arroz y durante la adición de arcillas.....	67
3.5.1	Diversidad y dinámica de la comunidad microbiana basado en la técnica de T-RFLP.....	67
3.5.2	Diversidad e identificación de bacterias y archaeas basado en el análisis filogenético a partir de la construcción de librerías de clones del gen <i>ARNr 16S</i> .....	70
3.5.3	Cuantificación de bacterias y archaeas basado en la PCR en tiempo real (q-PCR) .....	74

### 4. DISCUSIÓN

4.1.	Co-digestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz, con adición de arcillas residuales industriales. Ensayos en discontinuo.....	76
4.2.	Optimización de la actividad metanogénica específica en la codigestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales.....	81



4.3. Estructura de la comunidad procariota responsable de la codigestión de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales en régimen discontinuo.....	83
4.4. Co-digestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas en reactor de tipo tanque agitado en régimen semicontinuo .....	87
4.5. Comunidad procariota desarrollada con la adición de paja de arroz y de arcillas en el reactor de tipo tanque agitado en régimen semicontinuo.....	92
CONCLUSIONES.....	98
RECOMENDACIONES.....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

## INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia se ha convertido en una estrategia sustentable para el manejo adecuado de residuos, dado por su biodegradación hasta metano ( $\text{CH}_4$ ) y la obtención de un lodo con propiedades biofertilizantes (Verstraete *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2008). Este proceso es el resultado del metabolismo coordinado y combinado de diferentes grupos de bacterias y archaeas, cuya eficiencia depende de la estabilidad de esta población mixta ante cambios ambientales y nutricionales (Riviere *et al.*, 2009; Nettmann *et al.*, 2010).

La creciente producción porcina en Cuba, de forma descentralizada, ha favorecido la generación desmedida de estiércoles por lo que la digestión anaerobia ha jugado un importante papel como tecnología de tratamiento, con el consiguiente aprovechamiento energético del  $\text{CH}_4$  (Sosa *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2011). El estiércol porcino constituye un buen sustrato base para la digestión anaerobia, pues contiene capacidad tampón y una amplia variedad de nutrientes (González-Fernández y García-Encina, 2009; Rodríguez *et al.*, 2011). Sin embargo este proceso se ha visto limitado por varios factores, entre ellos las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal del estiércol (Sung y Liu, 2003; Chen *et al.*, 2008), el bajo balance de carbono/nitrógeno (20:1) y la falta de algunos micronutrientes, que ha ocasionado bajos rendimientos de  $\text{CH}_4$  y baja remoción de la demanda química de oxígeno (DQO). En Cuba, según algunos informes el contenido de nitrógeno amoniacal en el estiércol porcino supera los límites máximos permitidos ( $> 2,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el balance de carbono/nitrógeno está muchas veces por debajo de 20:1.

Para mejorar la digestión anaerobia de estiércol porcino se han utilizado con éxito cosustratos orgánicos de origen agrícola (Ward *et al.*, 2008; Kacprzak *et al.*, 2010), cuyo alto contenido de carbono mejora el balance carbono/nitrógeno. La codigestión de residuos ganaderos y agrícolas se ha difundido en Europa (Campos, 2001) y América (Xia *et al.*, 2012); donde se informan altas producciones de  $\text{CH}_4$  con reducción de costos del proceso (Lehtomaki *et al.*, 2007; Molinuevo-Salces *et al.*, 2012). Los residuales agroindustriales del arroz, (paja, cascarilla y residuos del secadero) pueden utilizarse como cosustrato en la digestión de estiércol porcino. La degradación anaerobia de estos residuos ha sido evaluada por varios autores (Yu *et al.*, 2004; Mussatto *et al.*, 2008; Yanfeng *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2012), cuyos resultados muestran los mayores potenciales de  $\text{CH}_4$  a partir del residuo paja (Butchaiah *et al.*, 2009; Chandra *et al.*, 2012).

La paja de arroz resulta un cosustrato atractivo debido a su bajo costo de producción y alto contenido de carbono y nutrientes (Wang *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2012). A nivel mundial se producen más de 730 millones de toneladas de paja de arroz por año (Zhao *et al.*, 2010). En Cuba, existe una elevada generación de este residuo en la Empresa Agroindustrial “Sur del Jíbaro” de Sancti Spíritus (más de 4,72 toneladas de paja por hectárea), donde la mayoría es incinerada (Contreras, 2013) o se deja en el campo como cobertura vegetal, causando serios daños ambientales y afectaciones en el rendimiento del propio cultivo (Abril *et al.*, 2009). La utilización racional de la paja de arroz como cosustrato en la digestión de estiércol porcino puede aumentar la producción de CH<sub>4</sub> y ayudar a su gestión ecológica.

Por otro lado, se ha informado sobre la mejora en la digestión anaerobia de estiércoles con la utilización de zeolitas (clinoptilolita y mordenita), y otras arcillas (montmorillonita y glauconita), dado principalmente por su capacidad de adsorber iones amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), lo que regula el equilibrio amonio ↔ amoníaco (Milan *et al.*, 2003; Montalvo *et al.*, 2006; Kotsopoulos *et al.*, 2008; Duran-Barrantes *et al.*, 2009). Las zeolitas y arcillas, además, constituyen una fuente de minerales para las bacterias y archaeas (Demirel y Scherer, 2011; Pobeheim *et al.*, 2011), muchos de los cuales actúan como cofactores enzimáticos (Blaut, 1994) y otros intervienen en la remoción de tóxicos, como es el caso del Ca<sup>2+</sup> que promueve la remoción de propionato (Kim *et al.*, 2002) o el Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> que pueden intercambiarse con el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Las arcillas residuales del proceso de purificación de aceites básicos industriales que se generan en la Industria Petroquímica Cubana son básicamente bentonitas (Arcillas TONSIL®, México, Información técnica) que poseen una composición catiónica similar al de las zeolitas (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) y otras arcillas (Yeritsyan *et al.*, 2008), las cuales pueden utilizarse como aditivo inorgánico en la digestión anaerobia de estiércol porcino.

La generación del estiércol porcino, la paja de arroz y las arcillas residuales en una misma área geográfica, los hace disponibles para su uso en la codigestión anaerobia con un menor costo. Sin embargo, es necesario determinar la viabilidad de la mezcla y considerar los factores ambientales que influyen en la digestión. La temperatura constituye un factor clave (Van Lier *et al.*, 1993), así como la concentración de sustrato y su naturaleza, pues influyen directamente sobre la actividad enzimática en todas las etapas del proceso (Campos, 2001; Blume *et al.*, 2010), entre ellas la actividad metanogénica específica (AME) responsable de la obtención de metano.

En los últimos 20 años, se han introducido varias mejoras tecnológicas para optimizar la digestión anaerobia, tales como: el desarrollo de sistemas técnicos, la introducción de cosustratos, o la digestión a altas temperaturas para asegurar una buena sanitización (Ahring, 2002; Ahring y Westermann, 2004). No obstante estos esfuerzos, la optimización de las actividades enzimáticas y el estudio acerca de la influencia de la interacción de los sustratos sobre el metabolismo de la microbiota anaerobia ha sido limitado (Nettmann *et al.*, 2008).

La eficiencia de la metanogénesis depende en gran medida de la estructura y dinámica de la comunidad procariota (Verstraete *et al.*, 2005; Nettmann *et al.*, 2010). En este sentido, se ha estudiado la diversidad procariota en reactores que producen CH<sub>4</sub> a partir de diferentes sustratos orgánicos, por ejemplo: ensilaje de cultivos energéticos, residuos de frutas, vegetales y residuos ganaderos (Klocke *et al.*, 2008; Krause *et al.*, 2008; Nettmann *et al.*, 2008; Nettmann *et al.*, 2010; Supaphol *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011), cuyos resultados muestran la correspondencia entre algunos parámetros operacionales y la diversidad microbiana existente (Wittebolle *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Carballa *et al.*, 2011; Pycke *et al.*, 2011). Sin embargo, el impacto de los cosustratos orgánicos sobre la microbiota formadora de CH<sub>4</sub> (Hori *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2008) y sobre todo el impacto de los minerales sobre estas comunidades ha sido poco estudiado.

La aplicación de técnicas novedosas para el análisis del metagenoma de los ecosistemas anaerobios, como la técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos terminales de restricción (T-RFLP), la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-PCR) y la librería de clones, basados en el análisis del gen *ARNr 16S* como marcador evolutivo, ha permitido un mayor entendimiento de la fisiología y bioquímica de los llamados “microorganismos anaerobios no cultivables”. Sin embargo, no se ha informado la diversidad procariota responsable de la producción de metano en reactores que degradan, simultáneamente, estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales. De hecho, en Cuba no se ha informado el empleo de estas técnicas moleculares para caracterizar la microbiota en sistemas de digestión anaerobia.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se propone la siguiente **hipótesis**:

“La digestión anaerobia de estiércol porcino y la comunidad procariota relacionada con la obtención de metano, se pueden favorecer con la adición de paja de arroz como cosustrato y de arcillas residuales como aditivo inorgánico”.

## **Objetivo General**

Analizar el efecto de la adición de paja de arroz y de arcillas residuales sobre la digestión anaerobia de estiércol porcino y la comunidad procariota responsable de la producción de metano.

## **Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de la adición de paja de arroz y de arcillas residuales sobre la digestión anaerobia del estiércol porcino, en régimen discontinuo a temperatura mesofílica y termofílica.
2. Optimizar la actividad metanogénica específica mediante el diseño del medio de codigestión anaerobia del estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas residuales, a temperatura mesofílica y termofílica.
3. Evaluar el efecto de la adición de paja de arroz y de arcillas residuales sobre la digestión anaerobia del estiércol porcino en un reactor de tipo tanque agitado en régimen semicontinuo a temperatura mesofílica.
4. Caracterizar la comunidad procariota durante la digestión anaerobia del estiércol porcino con la adición de paja de arroz y arcillas residuales, atendiendo a su diversidad, dinámica, cuantificación y distribución taxonómica.

## **Novedades científicas**

1. Se demostró el efecto estimulante de las arcillas residuales (con base bentonita) sobre la producción de  $\text{CH}_4$  durante la codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz, dado por su capacidad para adsorber iones amonio en solución. La reducción de la concentración de nitrógeno amoniacal del estiércol porcino favorece el desarrollo de archaeas metanógenas sensibles al amoníaco, como las especies de *Methanosaetas*, consideradas las más eficientes en la producción de metano.
2. Se diseñó un medio para la codigestión de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales, que permitió optimizar la actividad metanogénica específica a valores de  $1,3 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , superiores a los valores informados en la literatura para otras mezclas de sustratos similares.

3. Se informa por primera vez para la ciencia, el impacto de la adición de arcillas residuales con base bentonita sobre la diversidad y dinámica de bacterias y archaeas de sistemas anaerobios bajo régimen semicontinuo. La adición de arcillas aumentó la razón Bacteroidetes/Firmicutes y disminuyó el número total de archaeas donde prevalecen las especies de *Methanosaetas*, hallazgo que modifica el conocimiento actual sobre la estructura de estas comunidades procariotas y su dependencia de las interacciones tróficas.
4. Se informan por primera vez para la ciencia, siete secuencias del gen *ARN 16S* de bacterias que participan en la digestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales, las cuales difieren de las previamente descritas en los órdenes bacterianos conocidos. Se obtuvieron además, dos secuencias del gen *ARN 16S* de archaeas, pertenecientes al orden Methanomicrobiales, no relacionadas con las familias descritas. Estos resultados contribuyen al conocimiento de la diversidad de genes y/o especies procariotas presentes en sistemas anaerobios bajo condiciones nutricionales determinadas.

El presente trabajo **contribuye al conocimiento** de la diversidad y dinámica de la comunidad procariota y su correlación con parámetros físico-químicos, en sistemas anaerobios. Las nuevas secuencias del gen *ARNr 16S* de bacterias y archaeas obtenidas, fueron depositadas en la base de datos del Laboratorio de Biología Molecular Europeo (EMBL) con los números de acceso: HG007881-HG007957 (Bacteria) y HG007868-HG007880 (Archaea). **En el orden práctico**, los resultados contribuyen al desarrollo de las tecnologías anaerobias, pues con el uso del cosustrato paja de arroz y la aplicación de arcillas residuales, se logra incrementar la producción de CH<sub>4</sub> a partir de estiércol porcino, sustentado en el efecto positivo de estos sustratos para promover el predominio de determinadas bacterias y archaeas que favorecen el proceso. La aplicación de los resultados trae además **beneficios económicos, ambientales y sociales**, ya que contribuye a mejorar la eficiencia de la transformación de biomasa en CH<sub>4</sub> para fines energéticos. Esto implica mayor reducción de la carga contaminante de los estiércoles porcinos y el reúso y gestión ecológica de los residuos (paja de arroz y arcillas residuales). La codigestión anaerobia en una misma área geográfica, constituye un ejemplo en la búsqueda de nuevas prácticas agroecológicas en granjas del sector privado y estatal.

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 La digestión anaerobia para la obtención de metano

La digestión anaerobia ocurre espontáneamente en la naturaleza para degradar la materia orgánica hasta la forma más reducida del carbono: el metano ( $\text{CH}_4$ ), además se produce  $\text{CO}_2$  y trazas de otros gases ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , etc). Esta mezcla conocida como biogás, fue llamada gas de pantanos, gas natural de yacimientos subterráneos o gas metabólico de rumiantes (Madigan *et al.*, 2010).

El  $\text{CH}_4$  es un hidrocarburo gaseoso saturado, incoloro e inodoro, con propiedades combustibles y puede formar mezclas explosivas con el aire, siendo también constituyente del gas natural (Stams *et al.*, 2003). A pesar de que la actividad humana genera  $\text{CH}_4$  por sí misma, este no siempre puede ser capturado para ser utilizado como combustible, es por ello que son necesarias tecnologías para su producción en forma controlada.

Como proceso de tratamiento, la digestión anaerobia tiene algunas ventajas sobre la aerobia. En la digestión anaerobia el 90 % de la energía disponible por oxidación directa se transforma en  $\text{CH}_4$  y sólo un 10 % de la energía se consume en el crecimiento microbiano, frente al 50 % consumido en un sistema de tratamiento aerobio. Además, se obtiene un efluente estabilizado con propiedades biofertilizantes, dado por su mayor mineralización, menor contenido de patógenos, menor fitotoxicidad y menor volumen de lodo (Campos, 2001). No obstante, la disminución de la emisión de gases de efecto invernadero y su uso como fuente de energía renovable, son las ventajas más aprovechadas de la digestión anaerobia (Stams *et al.*, 2003).

#### 1.1.1 Microbiología y bioquímica de la digestión anaerobia

Los modelos tradicionales de digestión anaerobia la dividen en varias etapas: hidrolítica, acidogénica, acetogénica y metanogénica. Muchas de estas reacciones ocurren simultáneamente sin una separación clara de fases (Campos, 2001), lo cual respalda las asociaciones simbióticas microbianas encontradas en estos ecosistemas (Stams *et al.*, 2003).

**La etapa hidrolítica** es llevada a cabo por enzimas extracelulares, excretadas por bacterias fermentativas. Esta etapa puede ser la limitante de la velocidad del proceso global, cuando se trata de materia orgánica con alto contenido de sólidos. Incluso, en casos donde las fases acidogénicas o metanogénicas son consideradas como pasos limitantes, la hidrólisis puede afectar el conjunto del proceso (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991).

Uno de los principales componentes de la materia orgánica y de los residuos ganaderos y agrícolas, son los materiales lignocelulósicos, compuestos por lignina, celulosa y hemicelulosa. La lignina es un polímero (complejo aromático, no carbohidrato) altamente resistente a la digestión anaerobia, que limita la hidrólisis de la celulosa y de otros sustratos (Myint *et al.*, 2007; Vavilin *et al.*, 2008). La celulosa se hidroliza principalmente a celobiosa y glucosa, mientras que la hemicelulosa produce pentosas, hexosas y ácidos urónicos.

Las proteínas son hidrolizadas por proteasas en peptonas, péptidos y aminoácidos. Hay proteasas extracelulares (proteinasas) que atacan a la proteína entera y las peptidasas intracelulares cortan aminoácidos del extremo de proteínas y péptidos. Generalmente, la tasa de hidrólisis de proteínas es menor que la de carbohidratos (Gavala *et al.*, 2003). La degradación de lípidos consiste en una ruptura inicial de las grasas por lipasas, donde se forman ácidos grasos de cadena larga y moléculas de glicerol. Una molécula de fosfolípidos produce un equivalente de ácido fosfórico, uno de glicerol y dos de ácidos grasos (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991).

**La etapa fermentativa o acidogénica** consiste en la fermentación de productos solubles de la hidrólisis, donde se obtiene ácido láctico, etanol, ácido propiónico y ácido butírico, entre otros (Stams *et al.*, 2003), cuyas concentraciones varían en función del consumo de  $H_2$ . Cuando el  $H_2$  es eliminado de forma eficiente, las bacterias fermentativas no producen compuestos reducidos como el etanol, que favorece la producción de  $H_2$  y ATP. La actividad de algunas bacterias fermentativas y acetogénicas se favorece a valores bajos de presión parcial de  $H_2$  (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991).

La *fermentación de azúcares* la realizan diferentes grupos bacterianos, principalmente las que pertenecen al género *Clostridium*. La principal ruta que utilizan estos grupos es la de Embden-Meyerhof-Parnas. El acetyl-CoA se reduce empleando, como transportador de electrones, el NADH derivado de las reacciones de la ruta. Las proporciones de los productos dependen de la duración y las condiciones de reacción, donde el butírico y el acético son los productos mayoritarios, si el pH se mantiene alcalino (Madigan *et al.*, 2010). Sin embargo, otros estudios muestran que el propiónico puede ser mayoritario en ciertas condiciones (Hashimoto, 1986).

Otras bacterias del género *Propionibacterium*, llevan a cabo un proceso distinto, conocido como fermentación ácido-propiónica, en la que se produce ácido propiónico, succínico, acético y  $CO_2$ . Sus requerimientos nutricionales son complejos y crecen con lentitud. Las bacterias ácido-



propiónicas difieren de las del género *Clostridium*, en que su fermentación se basa en la conversión del piruvato a oxalacetato por carboxilación, y la conversión a través de succinato y succinil-CoA a metilmalonil-CoA y propionil-CoA, donde dos tercios de la glucosa se transforman en propionato y un tercio en acetato (Madigan *et al.*, 2010).

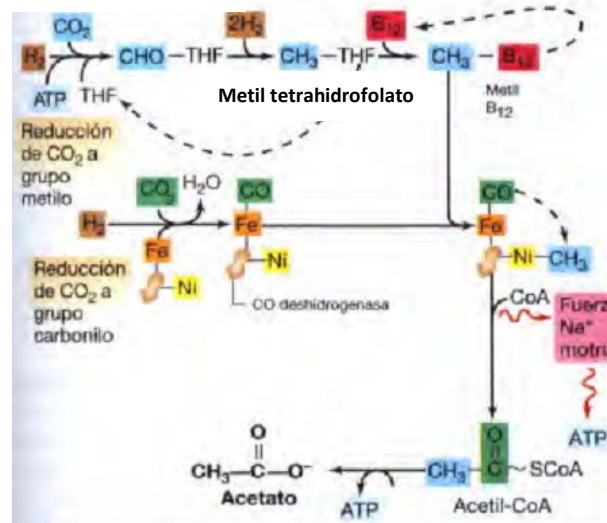
Por su parte, *la fermentación de aminoácidos* y de otras moléculas nitrogenadas es realizada por varios grupos de bacterias cuyos productos son: ácidos orgánicos volátiles, ácido succínico, amonio, sulfuro reducido, ácido aminovalérico, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Esta fermentación es un proceso rápido y no limita la velocidad de la degradación de compuestos proteicos (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991). Algunas bacterias del género *Clostridium* fermentan aminoácidos, cuyos productos finales de la oxidación son NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> y un ácido carboxílico con un átomo de carbono menos que el aminoácido oxidado. Según el aminoácido fermentado se producen los ácidos n-butírico, isobutírico, isovalérico, caproico, además de metilmercaptano, cadaverina, putrescina y H<sub>2</sub>S, fundamentalmente (Madigan *et al.*, 2010).

*La degradación de ácidos grasos de cadena larga (AGCL)* ocurre mediante la  $\beta$ -oxidación. El AGCL entra a la célula y es activado por la Coenzima A (formando el tio-éster-CoA), lo que disminuye su efecto tóxico. Si es un ácido con un número  $n$  impar de átomos de carbono, se obtendrían  $n-1$  acetil-CoA y un propionil-CoA (Madigan *et al.*, 2010). Además, ocurre la deshidrogenación del ácido graso, liberándose H<sub>2</sub> a través del NADH. La  $\beta$ -oxidación de AGCL es una ruta muy dependiente de la acción simbiótica de los organismos consumidores de H<sub>2</sub>.

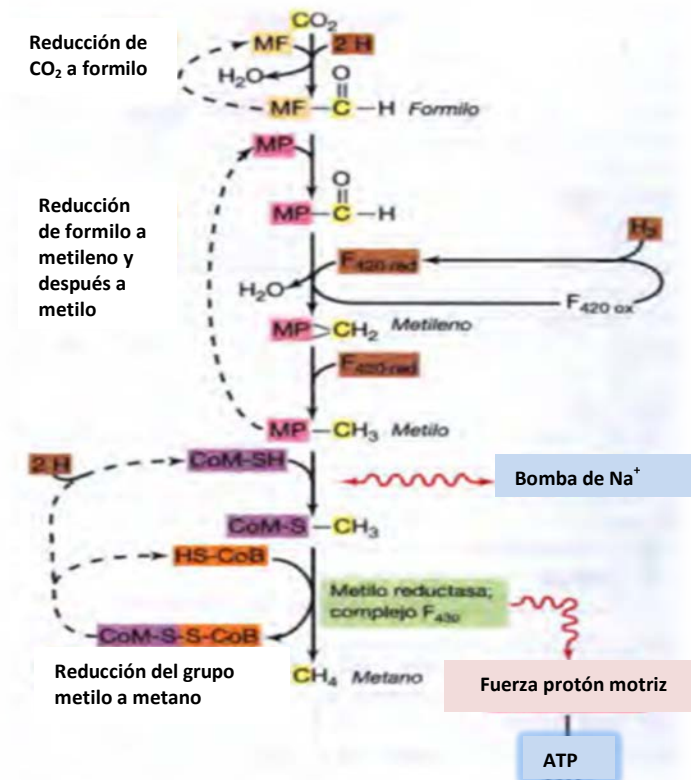
**La etapa acetogénica** es la transformación de ácidos y aminoácidos en compuestos que puedan metabolizar las archaeas metanógenas. Este proceso involucra reacciones energéticamente desfavorables, donde las bacterias acetogénicas necesitan ser estimuladas por las metanógenas u otros consumidores de H<sub>2</sub> y la  $\Delta G$  de la reacción depende de la presión parcial de H<sub>2</sub> (Stams, 1994; Campos, 2001). Algunos representantes de las especies acetogénicas son: *Syntrophomonas wolfei* y *Syntrophobacter wolini*. Un tipo especial de acetogénicas, son las *homoacetogénicas*, que consumen H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> y producen acetato (Fig. 1.1). Estas bacterias son capaces de crecer heterotróficamente a partir de polisacáridos, al contrario de las metanógenas (Madigan *et al.*, 2010). Los principales exponentes son *Acetobacterium woodii* y *Clostridium aceticum*.

**La etapa metanogénica** es llevada a cabo por archaeas metanógenas que forman el CH<sub>4</sub>, de ahí el nombre: *biometanización* (Stams *et al.*, 2003). Las metanógenas son anaerobias obligadas y

Formil tetrahydrofolato



**Fig. 1.1** Obtención de acetato por las *homoacetogénicas* vía acetil-CoA. THF: tetrahydrofolato; B<sub>12</sub>: vitamina B<sub>12</sub> en intermediario ligado a la enzima. El CO está unido a Fe y el grupo CH<sub>3</sub> está unido al Ni de un compuesto orgánico en la CO deshidrogenasa (fuente: Madigan *et al.*, 2004).



**Fig. 1.2** Obtención de metano a partir de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. MF: metanofurano; MP: metanopterina; CoM: Coenzima M; F420<sub>red</sub>: Coenzima F420 reducida; F430: Coenzima F430; CoB: Coenzima B. El átomo de C que se reduce hasta metano se muestra en amarillo y la fuente de electrones en color marrón (fuente: Madigan *et al.*, 2004).

utilizan sustratos con uno o dos átomos de C unidos por enlace covalente (acetato, formato, metanol, algunas metilaminas y CO<sub>2</sub>). Habitan asociadas a bacterias (como las acetoclásticas) que mantienen un bajo potencial redox (-300 mV) (Madigan *et al.*, 2010). Se pueden establecer dos grandes grupos de metanógenas en función del sustrato principal: las *hidrogenotróficas*, que consumen H<sub>2</sub> y ácido fórmico y las *metilotróficas* o *acetoclásticas*, que consumen grupos metilos del acetato, metanol y algunas aminas. En teoría, solo el 33 % del CH<sub>4</sub> se produce a partir de reducir CO<sub>2</sub>, utilizando el H<sub>2</sub> generado durante la degradación de los sustratos iniciales al nivel del acetato (Fig. 1.2). Estas reacciones redox están involucradas en los procesos de fijación de C y ambos procesos son acoplados a la formación de acetil-CoA, principal precursor del C para la biosíntesis celular (Madigan *et al.*, 2010).

Otros estudios han mostrado que el 70 % del CH<sub>4</sub> es producido a partir de acetato. Por lo tanto, el acetato es un intermediario clave en todo el proceso (Fig. 1.3). Las reacciones llevadas a cabo por estos grupos microbianos han sido muy estudiadas, con énfasis en la conservación de la energía durante la metanogénesis, que es el paso final donde interviene la enzima metilreductasa (Madigan *et al.*, 2004). La interacción de la CoB con la CH<sub>3</sub>-CoM forma CH<sub>4</sub> y un heterodisulfuro (CoM-S-S-CoB). Este complejo es reducido por los electrones que se translocan a través de la membrana a partir del H<sub>2</sub>, los cuales reducen la F<sub>420</sub> y después la metanofenazina (Fig. 1.4). Esta última, a través de un citocromo tipo *b*, transfiere electrones a la heterodisulfuro reductasa, enzima que reduce el complejo a sus formas oxidadas HS-CoM y HS-CoB, en una reacción exergónica asociada a la extrusión de protones hacia el exterior de la membrana, lo cual crea una fuerza motriz de protones. Este gradiente de protones es disipado por una ATPasa translocadora de protones que sintetiza ATP en el interior celular (Madigan *et al.*, 2010).

### **1.1.2 Factores ambientales y nutricionales que afectan el proceso**

**Temperatura.** La digestión anaerobia tiene lugar en un amplio intervalo de temperaturas, pero los más utilizados son psicrófilico (< 20 °C), mesófilico (20 - 45 °C) y termófilico (45 - 65 °C). A altas temperaturas las velocidades de las reacciones bioquímicas y las velocidades específicas de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) aumentan (Van Lier *et al.*, 1993), pero dentro de cada intervalo de temperatura  $\mu$  se hace máxima, por ejemplo 35-37 °C para la digestión anaerobia mesófilica y 54-56 °C para la termófilica. La digestión anaerobia en condiciones termófilicas es más sensible a cambios ambientales que la digestión en condiciones mesófilicas, sin embargo, en esta primera

1.3

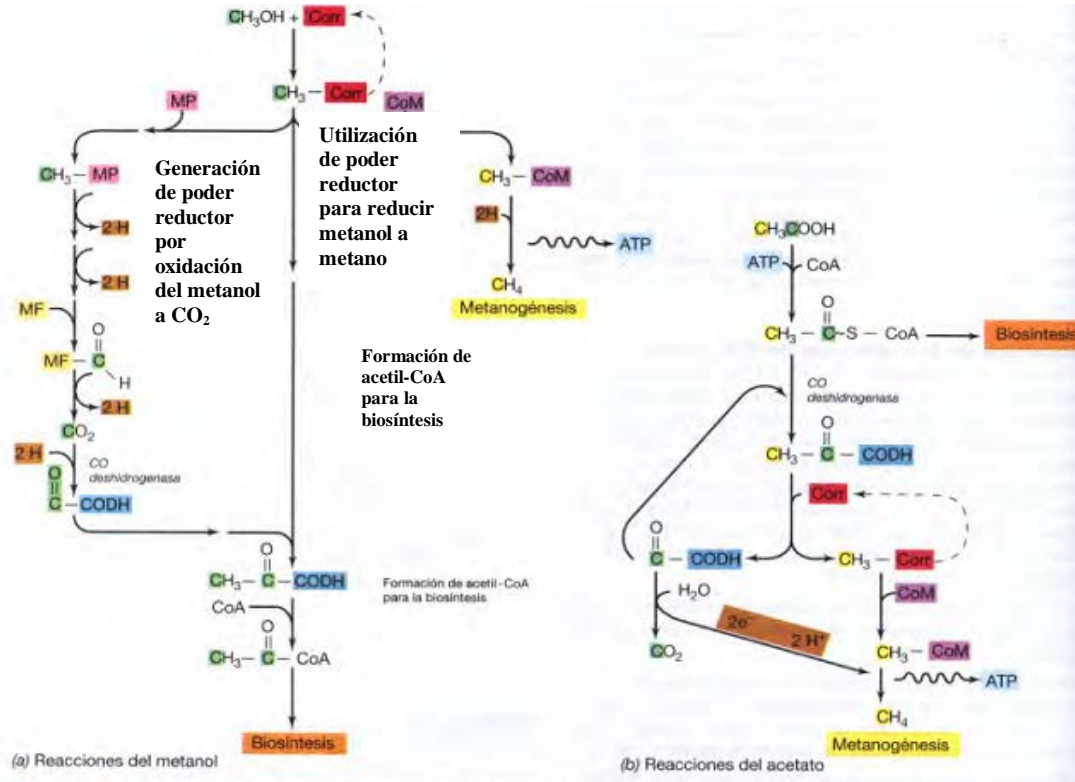
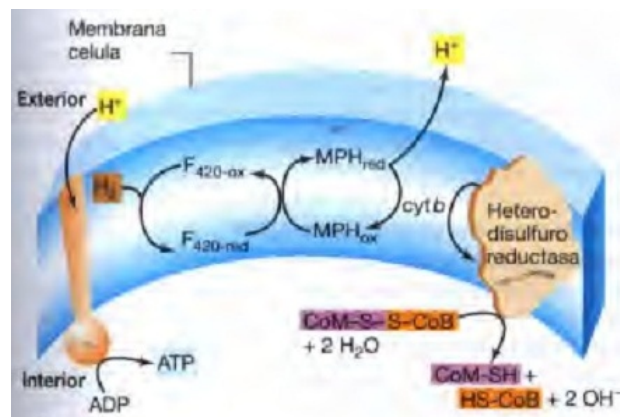


Fig.

Obtención de  $\text{CH}_4$  a partir de metanol (a) y acetato (b) utilizando la vía del acetyl-CoA. MF: metanofurano; MP: metanopterina; CoM: Coenzima M; Corr: proteína que contiene corrinoide. El átomo de C que se reduce se muestra en amarillo y la fuente de electrones (fuente: Madigan *et al.*, 2004).



**Fig. 1.4** Cadena de transporte de electrones durante la conservación de la energía en la metanogénesis.  $\text{F}_{420\text{ox}}$ : Coenzima  $\text{F}_{420}$  oxidada;  $\text{F}_{420\text{red}}$ : Coenzima  $\text{F}_{420}$  reducida; MPH: metanofenazina (portador de electrones exclusivo integrado en la membrana); *cytb*: citocromo del tipo *b*; CoA: Coenzima M y CoB: Coenzima B (fuente: Madigan *et al.*, 2004).

hay mayor velocidad de degradación, mayor rendimiento de CH<sub>4</sub>, mejor separación sólido-líquido y mejor calidad microbiológica del lodo. La calidad de los lodos en condiciones termofílicas está dada por el menor contenido de patógenos, su fácil deshidratación y la reducción de los malos olores (Kim *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010).

Las ventajas de la digestión anaerobia termofílica indicadas anteriormente se fundamentan en la acelerada transferencia de H<sub>2</sub> interespecífica que incrementa la velocidad de reacción y en general del metabolismo, por lo que aumenta la metanogénesis y disminuye el tiempo de retención hidráulico en los reactores (Gavala *et al.*, 2003). Esto no significa que los microorganismos termófilos deban crecer más rápido que los mesófilos, pues el crecimiento puede estar limitado por el catabolismo de sus sustratos y no por la velocidad de síntesis de las macromoléculas.

La temperatura influye directamente en los equilibrios, como en el de amonio ↔ amoníaco y ácidos grasos volátiles ionizados ↔ no ionizados (Campos, 2001). El efecto inhibitorio del amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) puede ser mayor en el rango termofílico, donde también se ha detectado mayor tasa de hidrólisis de las proteínas (Gallert *et al.*, 1998). La solubilidad de los gases NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S y H<sub>2</sub> disminuye al aumentar la temperatura, lo que favorece la transferencia líquido-gas. Esto supone un efecto positivo dado por la toxicidad de los citados compuestos (Angelidaki y Ahring, 1994; Hansen *et al.*, 1998). La principal desventaja radica en que la baja solubilidad del CO<sub>2</sub> implicará un aumento del pH en los reactores termofílicos, lo que en condiciones de alta concentración de amonio puede causar un efecto negativo (Mähnert, 2007). Las sales orgánicas son más solubles a altas temperaturas, por lo que la materia orgánica es más accesible para los microorganismos. Sin embargo, también aumenta la solubilidad de compuestos tóxicos y por tanto serán potencialmente más tóxicos, lo que explica la mayor inhibición de determinados compuestos en el rango termofílico, como los AGCL.

En general, la velocidad del proceso de digestión anaerobia aumenta con la temperatura pero trae consigo gastos energéticos, por lo que la decisión final dependerá del balance energético en el sistema. Las temperaturas más utilizadas en la digestión de residuos están en el rango mesofílico.

**pH y Alcalinidad.** Los microorganismos anaerobios necesitan para su desarrollo un pH en torno a la neutralidad, con un valor óptimo que oscila en la mayoría de los casos entre 6 y 8,3 (Lay *et al.*, 1997). En los sistemas anaerobios las sobrecargas orgánicas o la presencia de un inhibidor de la etapa metanogénica provoca desequilibrios en la producción y consumo de ácidos grasos

volátiles, cuya acumulación declina el pH y provoca la acidificación del reactor (Campos, 2001). El pH también influye en los equilibrios químicos (Campos y Flotats, 2003), por ejemplo, un pH bajo influye en la conversión de propionato a acetato, debido a que el componente tóxico es la forma no ionizada del ácido acético, que aumenta con la acidez del medio (Fukuzaki *et al.*, 1990). Además el pH influye en la distribución de la forma ionizada y no ionizada del amonio, lo cual también influye en la inhibición del proceso de metanogénesis.

La **alcalinidad** o capacidad tampón es importante para asegurar la estabilidad de la digestión anaerobia. La alcalinidad en un reactor es generada por los bicarbonatos y los ácidos grasos volátiles. En un reactor estable la alcalinidad total (AT), medida por titulación de una muestra a pH entre 4,0 y 4,3, deber estar por encima de  $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fannin *et al.*, 1987). La alcalinidad del bicarbonato o alcalinidad parcial (AP) está presente en forma de  $\text{HCO}_3^-$ . La AP, medida por titulación de una muestra a pH 5,75; tiene una correlación empírica con la acumulación de ácidos grasos volátiles (Hawkes *et al.*, 1994). Sin embargo, esta relación no se observa durante la acumulación de estos ácidos en respuesta a sobrecargas de amonio, debido a que el amonio incrementa la alcalinidad del sistema. Los ácidos grasos volátiles (AGVs) reaccionan con el bicarbonato, produciendo la alcalinidad debida a estos ácidos, en la relación:  $\text{AP} = \text{AT} - 0,71 [\text{AGVs}]$ , lo que resulta en una caída del pH. La relación entre la concentración de AGVs y la AT (AGVs/AT) indica el funcionamiento del reactor y debe fluctuar entre 0,1 y 0,35 (Ahring *et al.*, 1995; Boursier *et al.*, 2005). Otro indicador es la relación entre la alcalinidad parcial y total, *alfa* ( $\alpha$ ), que debe oscilar entre 0,5 y 0,9.

En función de la alcalinidad del medio, la disminución de pH será más o menos rápida (Angelidaki y Ellegaard, 2003; Mähnert, 2007). En residuos ganaderos, que presentan altas concentraciones de amonio y por tanto altas alcalinidades, la disminución de pH será poco importante incluso aunque se produzcan altas acumulaciones de ácidos (Campos, 2001). Por ello, el pH no se considera una buena variable de control. Se consideran indicadores de control del proceso: la relación de alcalinidades, la concentración de ácidos grasos volátiles, la producción de biogás y  $\text{CH}_4$ , la relación ácido propiónico/ácido acético y la presión parcial de  $\text{H}_2$ .

**Contenido de nutrientes.** El proceso anaerobio se caracteriza, a diferencia de los procesos aerobios, por los bajos requerimientos de nutrientes debido fundamentalmente a los bajos índices de producción de biomasa. A pesar de ello, la biomasa necesita para su desarrollo el suministro

de una serie de nutrientes minerales, además de una fuente de carbono y de energía. Las necesidades de nitrógeno y fósforo están en función de la concentración de carbono inicial. La relación C:N debe oscilar entre 15-30:1, y la de C:P entre 75-113:1 (Demirel y Scherer, 2011; Rodríguez *et al.*, 2011; Takashima *et al.*, 2011). Los principales micronutrientes son  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{4+}$ , Se y las vitaminas  $\text{B}_2$  y  $\text{B}_{12}$  utilizadas como factores de crecimiento.

**Tiempo de retención hidráulico.** En los reactores de tipo tanque agitado el tiempo de retención hidráulico coincide con el tiempo de retención celular, por lo que éste deberá ser suficiente como para permitir el desarrollo de la comunidad microbiana. Al aumentar el tiempo de retención aumenta la materia orgánica degradada y una vez superado el óptimo disminuye la producción de  $\text{CH}_4$ , por lo que es necesario su determinación para cada tipo de residuo y de reactor (Campos, 2001). En la digestión anaerobia de residuos ganaderos el tiempo de retención puede oscilar entre 10 y 45 días.

**Velocidad de carga orgánica (VCO).** La VCO es la relación entre la cantidad de materia orgánica alimentada, expresada en unidades de DQO o sólidos volátiles, por unidad de volumen efectivo de reactor y tiempo, la cual es directamente dependiente de la concentración del sustrato y del tiempo de retención hidráulico. Altas cargas orgánicas, en ausencia de inhibidores, proporcionan altas producciones de  $\text{CH}_4$  y en el caso de sobrecargas puntuales, que acumulan ácidos grasos volátiles (Ahring *et al.*, 1995) se puede desestabilizar el proceso. El tiempo de retención hidráulico y la VCO están determinados por el tipo de sustrato y son los principales parámetros de diseño que definen el volumen de un reactor (Campos, 2001).

**Agitación.** La agitación en la digestión anaerobia persigue poner en contacto el sustrato fresco con la población microbiana, favorecer la salida de los gases producidos, proporcionar una densidad uniforme de población microbiana, prevenir la formación de capa superficial, espumas y sedimentos, prevenir la formación de espacios muertos que reducen el volumen efectivo y eliminar la estratificación térmica, manteniendo una temperatura uniforme (Campos, 2001). La velocidad de agitación es un parámetro que influye en el equilibrio entre la buena homogeneización y la correcta formación de agregados bacterianos (Fannin *et al.*, 1987).

**Tóxicos, inhibidores y reguladores del proceso.** Son muchas las sustancias que pueden inhibir la digestión anaerobia tales como el nitrógeno amoniacal (Hansen *et al.*, 1998; Schnurer y Nordberg, 2008), algunos cationes y metales pesados (Kugelman y Chin, 1971) y ciertos

compuestos orgánicos como los AGCL (Luostarinen *et al.*, 2009), mientras que ciertos intermediarios metabólicos constituyen reguladores del proceso, este es el caso del H<sub>2</sub> y del ácido acético (Angelidaki *et al.*, 1993; Hyun *et al.*, 1998).

Nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). El nitrógeno amoniacal es un importante nutriente para los microorganismos, cuya carencia puede provocar el fracaso de la digestión anaerobia, sin embargo una concentración excesivamente alta del mismo puede limitarla (Schnurer y Nordberg, 2008). No existe un consenso en la bibliografía consultada sobre la concentración exacta de amonio que inhibe el proceso de digestión anaerobia (Chen *et al.*, 2008). Varios autores han informado concentraciones de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> inhibitoria desde 1,7 a 7 g·L<sup>-1</sup> para la digestión de estiércol de ganado vacuno, porcino y gallinaza, como se muestra en la Tabla 1.1.

El amoníaco libre (NH<sub>3</sub>). Es la forma que parece causar mayor inhibición ya que el efecto inhibitorio aumenta a pH alcalinos y a altas temperaturas, donde el equilibrio de formación de NH<sub>3</sub> es favorecido. La variabilidad respecto a la concentración inhibitoria de NH<sub>3</sub>, responde tanto al tipo de sustrato que se degrada, como a la “adaptación” de la microbiota presente (Tabla 1.1). En la digestión de estiércol porcino se demostró mayor inhibición en la fracción líquida del estiércol, cuyas concentraciones de NH<sub>3</sub> por encima de 0,04 g·L<sup>-1</sup> inhibieron a las archaeas metanógenas entre un 84 y 94 % (Belmonte *et al.*, 2011). La función de inhibición que relaciona la  $\mu_{max}$  con la concentración de NH<sub>3</sub> libre depende del grupo de metanógenas que predominan, siguiendo para las metanógenas acetoclásticas un modelo sigmoideal, y para las hidrogenotróficas un modelo lineal (Angelidaki y Ahring, 1993; 1994; Borja *et al.*, 1996).

En general, la carga orgánica del reactor y el número de microorganismos activos, determinan la magnitud de la inhibición por amonio y amoníaco (Ahring, 1995), lo que puede explicar en parte, la variabilidad en las concentraciones inhibitorias encontradas. Gallert *et al.*, (1998), en trabajos con residuos vegetales de mercado, observaron que al aumentar la concentración de 0,5 a 6,5 g·L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el régimen mesofílico, aumentó la inhibición de la proteólisis (desaminación de peptonas) y la metanogénesis. En las experiencias de Gallert *et al.*, (1998) no se detectó acumulación de H<sub>2</sub> por lo que la metanogénesis hidrogenotrófica no fue inhibida a esta concentración. A pesar de esto, las bacterias y archaeas metanógenas se “adaptaron” a nuevas concentraciones de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, pero la  $\mu_{max}$  desciende al aumentar la concentración de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Este



comportamiento ha sido constatado por diversos autores (Hashimoto, 1986; Angelidaki y Ahring, 1994; Gallert *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1998).

**Tabla 1.1** Resumen de las concentraciones inhibitorias de nitrógeno amoniacal y de amoníaco libre, informadas por varios autores en sistemas de digestión anaerobia con estiércol como sustrato.

Concentración de $\text{NH}_4^+$ inhibitoria ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Concentración de $\text{NH}_3$ inhibitoria ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Tipo de reactor y condiciones	Sustrato que se degrada	Referencia
2,5	0,02 0,20	Reactores mesofílicos y termofílicos (inóculo sin adaptar)	Estiércol de ganado vacuno	(Hashimoto, 1986)
4,0	0,39	Reactores mesofílicos y termofílicos (inóculo adaptado)	Estiércol de ganado vacuno	(Hashimoto, 1986)
6,0	0,60-0,80	Reactor termofílico (3 L) alimentado continuamente (inóculo muy adaptado)	Estiércol de ganado vacuno	(Angelidaki y Ahring, 1994)
5,0-7,0	0,69-0,99	Reactor UASB termofílico	Estiércol de ganado vacuno	(Borja <i>et al.</i> , 1996)
2,8	-	Ensayos en discontinuo (mesofílico y termofílico)	Gallinaza	(Krylova <i>et al.</i> , 1997)
6,0	1,10	Ensayos en discontinuo y en tanque agitado (mesofílico y termofílico)	Estiércol porcino	(Hansen <i>et al.</i> , 1998)
2,1	-	Codigestión en discontinuo (termofílica)	Estiércol porcino y lodos residuales	(Flotats <i>et al.</i> , 1999)
1,4-1,7	-	Digestión por contraflujo de fluido (mesofílica)	Gallinaza	(Jian Guang <i>et al.</i> , 2012)

Cationes y metales pesados. Se han declarado diferentes concentraciones inhibitorias para varios cationes, por ejemplo para el  $\text{Ca}^{2+}$  4600  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , para el  $\text{K}^+$  4800  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y para  $\text{Na}^+$  7400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Kugelman y Chin, 1971). En este último se han referido valores superiores en dependencia de la “adaptación” de la microbiota y su composición (Vallero *et al.*, 2003). La concentración inhibitoria de los cationes depende de su acción como contraión. El  $\text{K}^+$  es contraión del  $\text{Na}^+$ , del  $\text{Mg}^{2+}$  y del  $\text{Ca}^{2+}$ ; el  $\text{Na}^+$  lo es del  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ; el  $\text{Ca}^{2+}$  es contraión del  $\text{K}^+$ ; el  $\text{Mg}^{2+}$  lo es del  $\text{K}^+$  y el  $\text{NH}_4^+$  lo es del  $\text{K}^+$  (Kugelman y Chin, 1971). La toxicidad de los cationes aumenta con el peso molecular, por ende los metales pesados causan efectos tóxicos a menor concentración. La toxicidad de los metales está dada por la unión de éstos a los grupos prostéticos de enzimas involucradas en la digestión anaerobia (Ulmanu *et al.*, 2003).

Otros compuestos orgánicos: Los alquilbencenos, nitrobencenos, bencenos halogenados, alcoholes y fenoles, alcanos, éteres, aminas, amidas, y ácidos grasos de cadena larga, se han informado como tóxicos en procesos anaerobios (Hwu y Lettinga, 1997; Ungerfeld *et al.*, 2004).

Ácidos grasos volátiles (AGVs). Los AGVs son los intermediarios más importantes de la digestión anaerobia y muestran una rápida respuesta a las variaciones en el sistema (Fujishima *et al.*, 2000), dado por sobrecargas orgánicas o por la introducción de tóxicos (Ahring *et al.*, 1995). La acumulación de la forma no ionizada de ácido acético y/o propiónico en un reactor, puede inhibir la acetogénesis a partir del ácido propiónico (Fukuzaki *et al.*, 1990), la acetogénesis a partir del ácido butírico y/o la metanogénesis acetoclástica. Sin embargo, son necesarias concentraciones de los ácidos acético y butírico por encima de  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para afectar la producción de  $\text{CH}_4$ . Los ácidos propiónico y valérico son los primeros que afectan el proceso.

Hidrógeno. La oxidación de la materia orgánica está estrictamente regulada por las presiones parciales de  $\text{H}_2$ , por tanto es un importante intermediario de la digestión anaerobia y su acumulación puede provocar la acumulación de ácidos grasos volátiles, especialmente la de propiónico (Fukuzaki *et al.*, 1990). La degradación de acetato, propionato y butirato depende de que las presiones parciales de  $\text{H}_2$  sean muy bajas. Al respecto, las metanógenas hidrogenotróficas juegan un rol crucial en la constante eliminación de  $\text{H}_2$  (Luo *et al.*, 2002). Altos valores de la presión parcial de  $\text{H}_2$  están relacionados con el aumento de la fracción *iso* sobre la fracción *n* de los ácidos butírico y valérico (Hill y Cobb, 1993). Las presiones parciales de  $\text{H}_2$  en equilibrio no deben superar los 10 Pa para permitir la degradación del propionato (Pauss *et al.*, 1990). La energía de reacción en la formación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  a partir de acetato, es mucho más pequeña que la reacción contraria (acetogénesis) (Pauss *et al.*, 1990).

### **1.1.3 Tecnologías de digestión anaerobia para obtener metano**

Las tecnologías de digestión anaerobia se han clasificado según la forma de adicionar el sustrato, el modelo de flujo y la separación de fases. Otros criterios se basan en el diseño del reactor anaerobio atendiendo a parámetros operacionales como: el contenido de sólidos en el sustrato (húmeda y en seco), las etapas del proceso (una etapa o multi-etapas), el régimen de alimentación (discontinuo o continuo) y la temperatura de operación (mesofílico y/o termofílico) (Angelidaki y Ellegaard, 2003; Braun *et al.*, 2010; Weiland, 2010; Li *et al.*, 2011). Otras clasificaciones se basan en el tamaño de la planta y la aplicación de la tecnología (Heiermann *et al.*, 2011).

En general, el desarrollo de las tecnologías ha estado encaminado al diseño de reactores capaces de cumplir con requerimientos básicos como: altas tasas de carga orgánica, tiempos de retención hidráulicos cortos para minimizar el volumen de reactor y una máxima producción de CH<sub>4</sub> (Ward *et al.*, 2008).

Muchas de las tecnologías comerciales existentes aplicadas para residuos con alto contenido de sólidos suspendidos, responden al modelo de tanque agitado y su diferencia fundamental está en la forma de agitar. La agitación por recirculación de biogás, la agitación mecánica y la recirculación de masa en digestión, son las más utilizadas. Por ello, el tiempo de residencia típico de reactores comerciales es superior a 20 días (Ward *et al.*, 2008).

El reactor tipo tanque agitado bajo régimen de alimentación continua o semicontinua, con agitación continua o intermitente durante los ciclos de adición – extracción es uno de los más utilizados para el tratamiento de residuos semisólidos, como los residuos ganaderos (de 0,01 a 0,20 g·L<sup>-1</sup> de sólido totales) y por sus características es uno de los más utilizados en los estudios microbiológicos de la digestión anaerobia (Campos, 2001).

Para la digestión anaerobia de compuestos lignocelulósicos, se han utilizado tecnologías basadas en sistemas de dos etapas (un reactor hidrolítico y uno metanogénico) (Zhang y Zhang, 1999); y en sistemas de una etapa, utilizando un reactor anaerobio de flujo ascendente en fase sólida con recirculación de líquido (Mumme *et al.*, 2010) o un reactor tipo tanque agitado (Contreras, 2013).

#### **1.1.4 Introducción de la tecnología de digestión anaerobia en Cuba**

La tecnología de digestión anaerobia se introdujo en Cuba a principios de los años 80, con el objetivo netamente ambiental del tratamiento de residuos ganaderos (Barreto-Torrela, 2006) y el tratamiento de residuales en fábricas de azúcar y sus derivados (González *et al.*, 1995). Actualmente existen varias plantas de digestión anaerobia cuyo fin es la producción de biogás para uso comunitario. Los digestores más difundidos son del tipo chino e hindú, a pequeña y mediana escala, los cuales presentan como desventajas comunes, largos tiempos de retención hidráulicos y baja eficiencia de conversión del sustrato, que trae como consecuencia una baja velocidad de producción volumétrica de biogás.

A mayor escala, existen pocos ejemplos de plantas en el país. Una de ellas es utilizada para el tratamiento de las vinazas de la destilería Heriberto Duquesne en Villa Clara, la cual trabaja con un reactor de flujo ascendente de lecho de lodos con capacidad para tratar 3 000 m<sup>3</sup> de vinazas

con una producción de 16 000 m<sup>3</sup> de biogás destinado a las calderas de la destilería y la cocción de alimentos (Obaya-Abreu *et al.*, 2004). Otra planta a gran escala está ubicada en el Vertedero de calle 100 en La Habana, la cual emplea reactores de tipo tanque agitado para el tratamiento de residuos sólidos provenientes de agro mercados y podas de árboles, con posibilidades de entregar 60 kWh de energía eléctrica. Sin embargo, en ambos casos, se ha constatado el manejo ineficiente del proceso anaerobio lo cual ha impedido explotar las plantas a toda su capacidad.

Con el desarrollo de la producción porcina de forma descentralizada, la tecnología de digestión anaerobia ha jugado un papel crucial en el tratamiento del estiércol para la obtención de biogás (Chao *et al.*, 2007; Guardado-Chacón, 2007; Chao *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de las experiencias en la temática, a juicio de la autora, varios criterios han contribuido a la baja eficiencia de estas tecnologías en la obtención de CH<sub>4</sub>, lo que ha limitado su uso para fines energéticos, entre ellos: a) Uso de tecnologías de tipo chino e hindú, cuyos diseños no tienen en cuenta la agitación (intermitente, mecánica o con biogás), b) No empleo de inóculos (Li *et al.*, 2010), c) Limitado control físico-químico y microbiológico del proceso. En este sentido, el tema constituye un reto para los científicos cubanos, que precisa de estudios de optimización de la digestión anaerobia, para mejorar la metanogénesis a partir de las diferentes fuentes de residuos disponibles, sobre todo agropecuarios e industriales.

## **1.2 Tratamiento de residuos agropecuarios e industriales. El estiércol porcino**

La gestión de los residuos orgánicos en Cuba, se ha visto seriamente afectada por la separación progresiva de la explotación ganadera y la agrícola, de forma tal que la mayoría de ellas no poseen una base territorial suficiente para garantizar la reutilización de los residuos. También han influido negativamente el aumento del censo ganadero, sobre todo el porcino y el aumento de las explotaciones ganaderas y agrícolas. La creciente producción porcina en Cuba ha conllevado a la generación desmedida de residuos porcinos en determinadas áreas, que supera la capacidad de aceptación del medio. El uso de la digestión anaerobia como tecnología de tratamiento de residuos porcinos se ha incrementado en los últimos años (Cruz *et al.*, 2004; Sosa *et al.*, 2005; Guardado-Chacón, 2007; Chao *et al.*, 2011).

El estiércol porcino constituye un buen sustrato para la digestión anaerobia (Nges *et al.*, 2012), pues presenta buena capacidad tampón y contiene gran variedad de nutrientes que hacen viable el proceso (Vanotti *et al.*, 2007; González-Fernández *et al.*, 2008; González-Fernández y García-

Encina, 2009; Rodríguez *et al.*, 2011). Sin embargo, varios autores han informado sobre el fracaso de la digestión anaerobia del estiércol porcino y la disminución de su potencial de CH<sub>4</sub> (Moller *et al.*, 2004) debido fundamentalmente a las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal contenidas en el sustrato (Hansen *et al.*, 1998; Sung y Liu, 2003; Chen *et al.*, 2008), al bajo balance carbono/nitrógeno (20:1) y a la carencia de algunos micronutrientes.

Para mejorar la eficiencia de la digestión anaerobia de estiércol porcino y con ello la producción de CH<sub>4</sub>, se ha recurrido a la adición de cosustratos orgánicos de naturaleza agrícola (Alatrisme-Mondragon *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2008; Cavinato *et al.*, 2010; Kacprzak *et al.*, 2010), cuyo contenido de carbono puede aumentar el balance de carbono/nitrógeno y suministrar nutrientes.

### **1.2.1 Tratamiento integrado de residuos mediante codigestión anaerobia**

El término codigestión anaerobia se emplea para expresar el tratamiento integrado de dos o más sustratos de diferentes tipologías. La principal ventaja de la codigestión anaerobia radica en el aprovechamiento de la sinergia de las mezclas, que compensa las carencias de cada uno de los sustratos por separado (Campos, 2001). Además, aumenta la producción de CH<sub>4</sub> y disminuye el costo del proceso (Lehtomaki *et al.*, 2007; Molinuevo-Salces *et al.*, 2012). La codigestión de residuos ganaderos y agrícolas constituye una tendencia en Europa (Mata-Alvarez *et al.*, 2014) y América (Xia *et al.*, 2012), donde la mayoría de las tecnologías se basan en el reactor de tipo tanque agitado, bajo condiciones mesofílicas o termofílicas (Alatrisme-Mondragon *et al.*, 2006; Lindorfer *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2008; Kacprzak *et al.*, 2010).

### **1.2.2 La paja de arroz como cosustrato**

El arroz constituye el alimento básico para la mayoría de la población mundial. Los principales países productores son los asiáticos, donde se cultivan más de 160 000 millones de hectáreas (ha) cada año (Chandra *et al.*, 2012). En Cuba, donde también constituye un alimento básico, la producción de arroz se ha incrementado vertiginosamente en aras de sustituir importaciones del grano, y se vaticina para el 2015 una producción de 1 086 000 toneladas (t). Durante el proceso productivo se generan varios residuos: los restos de la cosecha (paja de arroz), la cascarilla del arroz y las impurezas o residuos del secado, los cuales no tienen una disposición final ambientalmente adecuada (García-Rivero, 2010; Contreras, 2013). Existen algunos métodos para el uso de la paja de arroz como alimento animal y para obtener pulpa de papel, entre otros (Yanfeng *et al.*, 2008). Sin embargo, la gran mayoría de la paja generada por cosecha es

incinerada a campo abierto o queda abandonada en los campos, causando serios daños ambientales (Abril *et al.*, 2009; García-Rivero, 2010; Lei *et al.*, 2010).

En la región central de Cuba existe una elevada producción de arroz, concentrada en la Empresa Agroindustrial “Sur del Jíbaro”, en Sancti Spíritus, donde en el 2011 se produjeron 112 592 t y se generaron  $4,72 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$  de paja de arroz. Si se tiene en cuenta el bajo peso específico de la paja, se puede afirmar que la utilización de esta como cosustrato de la digestión de estiércol porcino, no solo aumentaría la eficiencia del proceso, sino que ayudaría a su gestión ecológica convirtiéndola en una fuente de energía renovable y limpia. En este sentido, varios autores han informado potenciales de metano (aprox.  $167 \text{ kgCH}_4\cdot\text{t}^{-1}$ ) y potenciales energéticos (aprox. 8 352 MJ) similares para las pajas de arroz procedentes de diferentes países productores como India, Tailandia y Filipinas (Butchaiah *et al.*, 2009; Chandra *et al.*, 2012).

La paja de arroz contiene de 32 a 47 % de celulosa, de 19 a 27 % de hemicelulosa y de 5 a 24 % de lignina entre otros macro y micronutrientes (Karimi *et al.*, 2006; Contreras, 2013). Esto hace que sea una biomasa prometedora como cosustrato de la digestión de estiércoles, dado por su bajo costo de producción y su alto contenido de carbono y nutrientes (Wang *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2012). Su biodegradación anaerobia ha sido ensayada por varios autores, utilizándola como monosustrato o como cosustrato de estiércoles, sobre todo de vacuno (Yu *et al.*, 2004; Mussatto *et al.*, 2008; Yanfeng *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2012).

Mussatto *et al.*, (2008) y Yanfeng *et al.*, (2008) obtuvieron un efecto positivo en la producción de  $\text{CH}_4$  a partir de la digestión de estiércol y paja de arroz con rendimientos de  $200\text{-}250 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ . No obstante, estos autores destacan la necesidad del tratamiento previo de la paja para mejorar la disponibilidad de la celulosa y la hemicelulosa, pues la lignina ha demostrado ser altamente resistente a la digestión anaerobia.

### **1.2.3 La adición de micronutrientes**

Los micronutrientes juegan un papel importante en la digestión anaerobia para obtener  $\text{CH}_4$  (Hinken *et al.*, 2008; Pobeheim *et al.*, 2010). El estiércol porcino contiene una gran variedad de estos, que incluyen al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  entre otros, sin embargo las concentraciones y disponibilidad de estos depende de muchos factores.

El requerimiento de micronutrientes de las bacterias y archaeas relacionadas con la obtención de  $\text{CH}_4$  ha sido informado en detalle. Estas requieren determinadas concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,

Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mo, W y Se (Kumar *et al.*, 2006; Pereda *et al.*, 2006; Demirel y Scherer, 2011; Pobeheim *et al.*, 2011), en dependencia de los sustratos a degradar (Chen *et al.*, 2008). Desde el punto de vista fisiológico, muchos de estos metales constituyen cofactores enzimáticos de algunas etapas de las rutas biosintéticas y de degradación de los sustratos, como las involucradas en la formación de metano (Madigan *et al.*, 2010).

**Adición de minerales arcillosos y zeolitas.** El empleo de minerales complejos como zeolitas y arcillas como fuente de micronutrientes y como intercambiador de cationes en solución ha mostrado un efecto positivo sobre la digestión anaerobia. Se ha constatado su influencia en la biodisponibilidad de iones amonio durante la digestión anaerobia de algunos estiércoles (Angelidaki y Ahring, 1993; Milan *et al.*, 2003; Montalvo *et al.*, 2005; Montalvo *et al.*, 2006; Kotsopoulos *et al.*, 2008; Milan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

La aplicación de arcillas (glauconita y montmorillonita) y zeolitas naturales (clinoptilolita y mordenita), ha aumentado la eficiencia de la metanogénesis en la digestión de estiércol porcino (Hansen *et al.*, 1999; Milan *et al.*, 2003; Duran-Barrantes *et al.*, 2008; Kotsopoulos *et al.*, 2008) porque disminuyen las concentraciones de amonio en solución que de otro modo resultarían inhibitorias para las archaeas metanógenas (Karakashev *et al.*, 2005; Nettmann *et al.*, 2010).

Las arcillas residuales procedentes del proceso de refinado de aceites comestibles, se han utilizado con éxito como aditivos inorgánicos en la digestión de estiércol bovino (Ahring *et al.*, 1992) o de estiércol porcino (Campos, 2001). Aunque este último autor informó un efecto inhibitorio cuando se utilizan altas concentraciones de arcillas debido a su contenido en AGCL.

El efecto positivo de arcillas y zeolitas, se basa en su estructura cristalina, formada por tetraedros de aluminio-silicatos hidratados y cationes alcalinos y alcalino-térreos, unidos a través de átomos de oxígeno (Yeritsyan *et al.*, 2008). Esta le permite ganar y perder agua reversiblemente, adsorber y/o absorber moléculas (propiedad de adsorción o de actuar como una criba molecular) e intercambiar cationes (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, etc.) sin sufrir cambios apreciables en la estructura (Andrade *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Por ello, su uso en procesos de tratamiento se ha incrementado en los últimos años (Fernandez *et al.*, 2008).

Milan *et al.*, (2001) encontró que el aumento de la concentración de zeolitas en un digestor anaerobio de residuos líquidos porcinos que operaba a temperaturas entre 27 y 30 °C provocó una disminución del rendimientos de metano. Esto indica que la adición de zeolitas debe ser

controlada, pues un incremento de la concentración de sólidos en el reactor provoca una reducción del agua disponible e incrementa la viscosidad aparente del medio, lo que obstaculiza la transferencia de masa entre el sustrato y la microbiota.

Por otro lado, la cinética de la digestión de residuos vacunos, estudiada en reactores discontinuos con biomasa inmovilizada sobre zeolitas naturales, mostró que, en los reactores sin zeolitas había una mayor inhibición debido a la concentración de  $\text{NH}_4^+$  generada durante la anaerobiosis (Borja *et al.*, 1993), donde el rendimiento de metano fue 5 veces mayor en los reactores con zeolitas. Este mismo comportamiento se observó en procesos en discontinuos (a 25 °C), con la utilización de residuos porcinos (Duran-Barrantes *et al.*, 2008), donde los reactores con zeolitas mantuvieron valores mucho más bajos de  $\text{NH}_4^+$  y de ácidos grasos volátiles que los reactores sin zeolitas.

Al estudiar el efecto de diferentes tipos de zeolitas naturales y sintéticas (mordenita, clinoptilolita, zeolita 3A y zeolita 4A) en reactores discontinuos, con la utilización de lodos orgánicos ricos en  $\text{NH}_4^+$ , se observó que en los reactores con zeolitas había una remoción significativa de  $\text{NH}_4^+$  con producciones de  $\text{CH}_4$  1,7 veces mayores que en los reactores sin el mineral (Tada *et al.*, 2005). Kotsopoulos *et al.*, (2008) evaluaron la digestión anaerobia de residuos porcinos en reactores discontinuos termofílicos (55 °C), que operaban con dosis de zeolitas entre 0 y 12 gramos por litro de residuo. En este caso, la producción de metano fue significativamente elevada en los reactores con zeolitas naturales a las dosis más altas, en comparación con las producciones obtenidas en los reactores sin este mineral.

En general, existen múltiples evidencias de que la aplicación de zeolitas naturales en los procesos anaerobios puede aumentar entre un 10 y 30 % la producción de biogás, lo cual es muy útil cuando se aplica la digestión anaerobia para obtener  $\text{CH}_4$  con fines energéticos (Montalvo, 2012). No obstante, la dosis de zeolita más adecuada va a depender de cada situación en específico y sobre todo de las características de los residuos a tratar.

En Cuba, el desarrollo de la Industria Petroquímica ha propiciado la generación de residuales arcillosos, durante la purificación de los aceites básicos industriales. Estos residuos son básicamente bentonita que contienen minerales ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) en su composición, en concentraciones similares a las informadas para algunas zeolitas y bentonitas (Información técnica del fabricante: Arcillas TONSIL®, México). Las estrategias de tratamiento de estos residuos sólidos, resultan costosas y difíciles de aplicar. Actualmente, dichos residuos se



depositan en lagunas para el tratamiento de residuales del petróleo, lo que ha causado serios daños ambientales.

La utilización de estas arcillas residuales (con base betonita), como aditivos inorgánicos, en la digestión anaerobia de estiércol porcino resulta atractiva porque puede contribuir a elevar la eficiencia del proceso, al ser empleada como fuente de micronutrientes y como adsorbente de iones amonio. Sin embargo, es necesario analizar las concentraciones óptimas para lograr el aumento de CH<sub>4</sub> sin introducir efectos indeseables.

En la digestión anaerobia, en régimen discontinuo, de una mezcla de los ácidos acético, propiónico y butírico (en relación 70:20:10), donde se caracterizó la biopelícula formada, se demostró que la inclusión de Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> o Mg<sup>2+</sup> a la zeolita natural en dosis de 0,05 g·gSSV<sup>-1</sup>, tuvo gran influencia en el predominio de ciertas especies procariotas (Milan *et al.*, 2010). Por ello, es preciso conocer, además de la dosis de arcilla a aplicar, su efecto sobre la comunidad microbiana relacionada con la obtención de metano.

### **1.3 Optimización de la digestión anaerobia para la obtención de metano**

En busca de optimizar la digestión anaerobia, se han hecho algunas mejoras tecnológicas en los últimos 20 años, las cuales se han enfocado hacia el desarrollo de sistemas técnicos, a la introducción de cosustratos y al aumento de la temperatura para asegurar una buena sanitización (Ahring, 2002; Ahring y Westermann, 2004). Sin embargo, el estudio de las actividades enzimáticas y la influencia de la interacción de los sustratos sobre éstas, así como de la fisiología de la microbiota anaerobia, ha sido limitado (Nettmann *et al.*, 2008).

A pesar de los buenos resultados de la codigestión, al mezclar diferentes tipos de residuos se corre el riesgo de introducir sustancias tóxicas o inhibitoras para el proceso anaerobio, por lo que es preciso determinar la viabilidad de la mezcla, la proporción adecuada de cada sustrato y la optimización de factores como la temperatura, la carga orgánica, etc. (Campos, 2001).

Cuando se considera el control de factores ambientales, se debe tener en cuenta que la digestión anaerobia implica la interacción de poblaciones microbianas complejas y cada una de ellas requiere de diferentes condiciones para su crecimiento (Madigan *et al.*, 2010) y de la regulación de los parámetros de operación según el tipo de reactor. En este marco, la estadística se vuelve una herramienta imprescindible para analizar de forma holística las variables dependientes e independientes. El diseño de mezclas permite el análisis del efecto simple y combinado de

diferentes factores dentro de una mezcla sobre un producto final (variable dependiente) (Campos, 2001). Por ejemplo, este tipo de diseño permite analizar el efecto de diversas cargas orgánicas y concentración del inóculo, así como el efecto de variables de proceso, a la vez que se analizan los efectos de los diferentes sustratos de una mezcla.

En este sentido, se aplicó con éxito la técnica de Optimización de Respuesta Múltiple para optimizar la obtención de  $\text{CH}_4$  y  $\text{H}_2$  durante la digestión anaerobia de vinazas tequileras (Espinoza-Escalante *et al.*, 2009). Estos autores encontraron que la temperatura, el pH y el tiempo de retención hidráulico, tienen un marcado impacto sobre el comportamiento de la microbiota anaerobia, donde la temperatura termofílica (55 °C) resultó óptima para la obtención de  $\text{H}_2$ , y la temperatura mesofílica (35 °C) resultó óptima para la obtención de  $\text{CH}_4$ . El aporte de los resultados tiene dos vertientes; la primera explica la capacidad de la microbiota mixta para crecer en un sustrato de alta carga orgánica (vinazas tequileras) y explica la capacidad experimental del reactor discontinuo para tratar este tipo de aguas industriales; la segunda, en la línea estadística, que muestra la utilidad del diseño de mezclas, el diseño mixto y la optimización de respuestas múltiples, en estudios de digestión anaerobia.

En estudios referidos a la optimización de la producción de  $\text{CH}_4$  a partir de residuos alimenticios, el método convencional “Cambio de un factor a la vez”, ha sido el más utilizado en el diseño de experimentos multifactorial (Wang *et al.*, 2008). Este es un método experimental en el cual se varía un factor mientras se mantienen los demás a niveles fijos en ciertas condiciones específicas. Por lo tanto son experimentos muy laboriosos, consumen mucho tiempo y pueden no encontrar el verdadero óptimo pues se ignora el efecto de la interacción entre las variables.

### **1.3.1 La Metodología de Superficie de Respuesta**

La metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influida por varias variables, y el objetivo es optimizar esta respuesta (Montgomery, 2005). Esto se logra cuando se determinan las condiciones de operación óptima para un sistema, o se determina una región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación. Existen varios diseños experimentales para ajustar superficies de respuesta, entre ellos el **diseño compuesto central** ha sido muy utilizado ya que permite analizar diferentes tipologías de sustratos con sus concentraciones respectivas y el análisis del efecto de sus interacciones

(Montgomery, 2005; Khalili y Bonakdarpour, 2010). Este diseño tiene la ventaja de predecir la respuesta basada en un set de experimentación, donde cada factor (sustrato) se varía en el rango de concentraciones elegidas. Por tanto, se ahorra tiempo y se obtiene una superficie de respuesta, cuyo óptimo estará determinado por la altura máxima de la curvatura de dicha superficie, lo cual facilita el entendimiento del rango óptimo y lo acota a valores más cercanos al punto máximo.

La actividad metanogénica específica puede ser utilizada como variable respuesta (variable dependiente), teniendo en cuenta su amplio uso para evaluar la digestión y codigestión anaerobia de residuos, la eficiencia en la metanogénesis, el efecto de factores ambientales, así como el efecto tóxico de algunos sustratos (Campos, 2001; Chellapandi *et al.*, 2010; Souto *et al.*, 2010).

### **1.3.2 La Actividad Metanogénica Específica**

La actividad metanogénica específica (AME) se define como la capacidad transformadora que tiene una unidad de masa de microorganismos para convertir el sustrato en CH<sub>4</sub>, en una unidad de tiempo. El objetivo de este ensayo es determinar el potencial de metano máximo de una biomasa frente a sustratos específicos que permiten diferenciar los grupos tróficos de metanógenas (Soto *et al.*, 1993). La ventaja de esta determinación es que no se distorsiona el sistema biológico que se pretende estudiar, por tanto, se conservan las interacciones entre los diferentes grupos tróficos, donde el objetivo es elucidar bajo qué condiciones experimentales puede lograrse un alto valor de la AME que implique mayor rendimiento de CH<sub>4</sub> (por gramo de biomasa).

Hoy día, se aborda con gran aceptación el “test de AME”, no solo para caracterizar la microbiota metanogénica de un lodo, sino también para el control del proceso y la detección de problemas en el mismo, ya que el rendimiento de CH<sub>4</sub> es un excelente indicador de las metanógenas (Michaud *et al.*, 2005). Desde el punto de vista fisiológico, esto se basa en que las archaeas metanógenas son las únicas que contienen los genes de la Coenzima-M, que forma parte de la Metil-reductasa, considerada la enzima clave de la metanogénesis (Madigan *et al.*, 2010).

### **1.4 Comunidades microbianas en reactores de digestión anaerobia**

En la digestión anaerobia participa una compleja y variada comunidad microbiana, cuya diversidad depende de la naturaleza del sustrato, las concentraciones de este y de las condiciones ambientales operantes (Narihiro y Sekiguchi, 2007; Riviere *et al.*, 2009). En ecosistemas como el rumen se pueden encontrar alrededor de 1000 unidades taxonómicas operacionales (Hess *et al.*,

2011) que son considerados altamente dinámicos y con una regulación de redes metabólicas muy compleja (Freitag y Prosser, 2009; Almeida *et al.*, 2011).

Por ello, el conocimiento acerca de la estructura y dinámica de esta microbiota es fundamental para mejorar la eficiencia del proceso (Fernández *et al.*, 2000; Hori *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2008). Además, la detección temprana de problemas de inhibición, pueden solucionarse, si se conoce la correlación entre la dinámica de la microbiota y los parámetros operacionales del proceso (McHugh *et al.*, 2004; Verstraete *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Malin y Illmer, 2008; Rincon *et al.*, 2008; Talbot *et al.*, 2008; Nettmann *et al.*, 2010).

En dependencia del sustrato inicial, se desarrollaran las especies bacterianas capaces de hidrolizarlos. En el caso de reactores que tratan estiércol bovino, se han identificado bacterias provenientes del tracto gastrointestinal del animal, por ejemplo, bacterias degradadoras de polisacáridos del filo Bacteroidetes (Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, en el caso de reactores que tratan estiércol porcino, varios autores han demostrado el predominio de bacterias del filo Firmicutes, principalmente, de las clases Clostridia y Bacillis (Li *et al.*, 2010; Wirth *et al.*, 2012), ya sea utilizando el estiércol porcino como monosustrato o en codigestión con residuos agrícolas. También predominaron en el tratamiento de aguas residuales porcinas con la utilización de biofiltros (Snell-Castro *et al.*, 2005) o en reservorios de estiércol porcino previo a la entrada de un reactor anaerobio (Tang *et al.*, 2005).

A partir del estiércol porcino y de reservorios de este, fueron aisladas bacterias anaerobias obligadas de bajo % de GC, Gram positivas pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* del filo Firmicutes (Cotta *et al.*, 2003). Resultados similares se obtuvieron en aislamientos, a partir de muestras del tracto gastrointestinal de los cerdos y sus heces fecales (Pryde *et al.*, 1999)

En la mayoría de los reactores de digestión anaerobia se han identificado bacterias claves como las fermentadoras secundarias, estas son las bacterias oxidadoras de ácidos grasos productoras de H<sub>2</sub>, en su mayoría bacterias sintrofas, por ejemplo: *Syntrophomonas wolfei* (que oxida ácidos grasos entre C<sub>4</sub> y C<sub>8</sub> y produce acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, y *Syntrophobacter wolinii* (que oxida propionato y produce acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> (Madigan *et al.*, 2010) y en general otras bacterias de los géneros *Syntrophomonas*, *Syntrophospora* y *Thermosyntropha*, que se han identificado en reactores mesofílicos tipo tanque agitado, durante la digestión de estiércol porcino y vacuno

(Hofman-Bang *et al.*, 2003). Estas bacterias viven en simbiosis con las consumidoras de H<sub>2</sub> (metanógenas hidrogenotróficas) (Madigan *et al.*, 2010). No obstante, bacterias perteneciente a otros filo (Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria y Chloroflexi) también se han identificado en estas microbiotas anaerobias que fermentan estiércol porcino (Snell-Castro *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Wirth *et al.*, 2012).

Respecto a la comunidad de archaeas en reactores que tratan estiércol porcino como monosustrato, en codigestión o utilizado como inóculo, se han encontrado indistintamente metanógenas hidrogenotróficas o acetoclásticas. De acuerdo con la estimación de que el 70 % del metano es producido por metanógenas acetoclásticas, se ha informado el predominio de metanógenas del orden Methanosarcinales que incluye a las familias de Methanosaetaceae y Methanosarcinaceae (Ahring, 2003; Karakashev *et al.*, 2005; Supaphol *et al.*, 2011). De acuerdo con los autores que aseveran que la digestión anaerobia de estiércol porcino es dominada por metanógenas hidrogenotróficas, los órdenes Methanomicrobiales y Methanobacteriales son los que predominan (Whitehead y Cotta, 1999; 2001; Snell-Castro *et al.*, 2005; Peu *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011).

Las familias de Methanosaetaceae y Methanosarcinaceae termófilas y de especies de *Methanothermobacter* y *Methanobacterium*, así como, especies del orden Methanobacteriales y especies de *Methanosarcinas*, fueron las predominantes durante la biodegradación de residuales porcinos, ya que forman parte de la flora intestinal de los cerdos (Boopathy, 1996).

Durante la caracterización microbiológica mediante métodos moleculares de un reactor anaerobio de membrana que trataba aguas residuales porcina en condiciones mesofílicas, se encontró que las familias Methanosaetaceae y Methanosarcinaceae, predominaron durante la operación del reactor cuya abundancia se pudo correlacionar con la concentración de ácidos grasos volátiles (Padmasiri *et al.*, 2007). En este estudio también se encontraron metanógenas hidrogenotróficas de los órdenes Methanobacteriales y Methanomicrobiales. Las metanógenas perteneciente al orden Methanobacteriales estaban en abundancia durante la arrancada del reactor, sin embargo esta abundancia disminuyó durante una caída del rendimiento a la vez que aumentaban la metanógenas del orden Methanomicrobiales, lo que mostró que la relaciones simbióticas de estas podían permanecer intactas en condiciones de estrés.

En reactores tipo tanque agitado, en condiciones mesofílicas, donde uno de los cosustratos fue

estiércol porcino o vacuno se observó disminución de las especies *Methanosaetas* cuando aumentaban las concentraciones de acetato y viceversa. Cuando aumentan las concentraciones de acetato se favorecen las especies *Methanosarcinas* (Hofman-Bang *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de la presencia de *Methanosarcinas*, en estos reactores se encontró que predominaban las metanógenas hidrogenotróficas del orden Methanomicrobiales.

En reactores en discontinuo que fermentaban residual porcino en condiciones mesofílicas, se constató el predominio de los órdenes Methanobacteriales y Methanomicrobiales (Kim *et al.*, 2010). En este estudio también se encontró una fuerte correlación entre poblaciones de metanógenas pertenecientes al orden Methanobacteriales y poblaciones de metanógenas del orden Methanosarcinales. En un reactor tipo tanque agitado, en condiciones mesofílicas, durante la digestión anaerobia de silage de maíz, y con la utilización de lodo anaerobio de estiércol porcino como inóculo, se encontró también un alto número de copias de los genes *ARNr 16S* que representaban a especies del orden Methanobacteriales (Blume *et al.*, 2010). En reactores (escala industrial) que degradaban estiércol porcino como monosustrato a 39 °C, se detectó que el 58 % de las metanógenas pertenecía al orden Methanobacteriales, el 34 % pertenecía al orden Methanomicrobiales y solo el 2,4 % pertenecía al orden Methanosarcinales (Zhu *et al.*, 2011).

#### **1.4.1 Caracterización por métodos microbiológicos dependientes de cultivo y métodos moleculares independientes de cultivo**

##### ***1.4.1.1 Filogenia y taxonomía de bacterias y archaeas anaerobias***

Algunos elementos de la filogenia y taxonomía de bacterias y archaeas anaerobias han permitido el desarrollo de diferentes métodos microbiológicos y moleculares para lograr un mayor acercamiento a la fisiología de los microorganismos que participan en el proceso de digestión anaerobia (Kim *et al.*, 2010; Nettmann *et al.*, 2010).

Como se discutió anteriormente, se han informado diferentes bacterias anaerobias habitando los sistemas de **biometanización**. Dentro de estas, las bacterias Gram positivas de bajo contenido de GC y esporuladas, pertenecientes al filo Firmicutes y miembros de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. Estas se han caracterizado por secretar hidrolasas (*Bacillus*) y fermentar azúcares. También algunas especies de *Clostridium* pueden fermentar aminoácidos y purinas (Madigan *et al.*, 2010). Además se han encontrado bacterias pertenecientes al filo Bacteroidetes de amplia distribución en el medio ambiente. Este filo incluye tres clases, donde la clase Bacteroidetes es la

más estudiada e incluye al género *Bacteroides*, cuyas bacterias se encuentran abundantes en las heces de animales de sangre caliente, por tanto son las bacterias que pueden encontrarse en estiércoles y residuos animales. Las especies de *Bacteroides* son anaerobias, Gram-negativas, no forman endosporas, tiene un contenido GC del 40 - 48 % y contienen ácido mesodiaminopimélico en su capa de peptidoglicano. Pueden fermentar azúcares simples, pero su principal fuente de carbono son los polisacáridos de origen vegetal (Madigan *et al.*, 2010).

Otro importante filo de bacteria encontrado en sistemas de digestión anaerobia es el Proteobacterias, que incluyen una gran variedad de patógenos como: *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Neisseria gonorrhoeae*. Otras son de vida libre, e incluyen muchas de las bacterias responsables de la fijación del nitrógeno. También, se pueden encontrar algunas bacterias del filo Actinobacterias como *Actinomyces israelii*, que pueden crecer bajo condiciones anaerobias. Son bacterias Gram positivas pero, al contrario de Firmicutes, tienen alto contenido de GC y algunos *Actinomycetes* producen esporas externas (Madigan *et al.*, 2010).

Respecto al Dominio Archaea, existen cuatro filos diferentes, pero el filo Euryarchaeota es donde se encuentran las metanógenas (Madigan *et al.*, 2010). Actualmente, se conocen cerca de 60 especies de metanógenas y a pesar de constituir un grupo filogenético coherente, no es homogéneo pues existen grandes diferencias fisiológicas y morfológicas entre ellas. Por este motivo se han dispuesto cuatro subdivisiones: las clases Methanobacteria, Methanococci, Methanomicrobia y Methanopyri (Boone, 2001).

Morfológicamente las archaeas metanógenas pueden ser bacilos cortos y largos, cocos de varias ordenaciones celulares, células en forma de placas y filamentosos. En cada familia y hasta en cada género, existen morfologías diferentes. En la familia Methanomicrobiaceae hay metanógenas en forma de cocos, de espiral y de bastón. Se encuentran en diferentes ambientes, y por ende, tienen metabolismos diferentes, al reducir disímiles sustratos hasta CH<sub>4</sub> (Boone, 2001).

Todas las metanógenas poseen varias coenzimas especiales, donde la Coenzima M, única de estas, es necesaria para la actividad de la enzima Metil Co-M reductasa, que participa en el paso final de la formación de CH<sub>4</sub> (Solera *et al.*, 2002), la cual se considera también única de estas metanógenas, por tanto sus genes codificadores (*mcrA*) constituyen marcadores moleculares (Zhu *et al.*, 2011; Shima *et al.*, 2012). No obstante, la similitud en las secuencias de los genes de ARN ribosómico (*ARNr 16S*), ha permitido definir la relación filogenética de bacterias y archaeas.

Los genes *ARNr 16S* constituyen un marcador evolutivo dado por su distribución universal, su función constante y su cambio con suficiente lentitud como para permitir detectar relaciones muy antiguas. Es de un tamaño relativamente pequeño (1,5 kb) y tiene una estructura de mosaico que alterna regiones hipervariables altamente conservadas en el reino Procariota. En bacterias, los genes que codifican para los ARNr están organizados en operones. Cada operón ribosómico incluye genes para los ARNr 23S (*rrl*), 16S (*rrs*) y 5S (*rrf*), separados por regiones espaciadoras o intergénicas, y contiene además genes para uno o más ARN de transferencia (ARNt). El gen *rrs* conocido comúnmente como gen *ARNr 16S*, ha sido el más utilizado como marcador molecular (Madigan *et al.*, 2010).

La taxonomía moderna tiende a agrupar los microorganismos en función de la similitud entre sus genes, que a la vez es un reflejo de su proximidad evolutiva. Así, se han diseñado múltiples métodos agrupados en diferentes categorías que difieren en su fundamento, poder de discriminación, rango taxonómico al que son aplicables, reproducibilidad, interpretación y estandarización (Sanz y Kochling, 2007).

Las técnicas microbiológicas basadas en la microscopía y el cultivo han sido insuficientes para la identificación de todas las bacterias y archaeas en la digestión anaerobia (Sanz y Kochling, 2007). Por ello, se han utilizado técnicas moleculares, que proporcionen el complemento necesario a los métodos microbiológicos, siguiendo el enfoque de taxonomía polifásica (Molina-Muñoz, 2007; Zhao *et al.*, 2010). Esto permite obtener mayor información de una microbiota, así como de su dinámica espacio-temporal (O'Flaherty *et al.*, 2006).

La taxonomía polifásica no es más que el consenso de utilizar varios métodos para distinguir especies en base a su genética y fenética. Esta incluye la taxonomía numérica, la clasificación de los organismos basado en su similitud, morfología o en cualidades observables, además incluye el análisis de los genes codificantes del ARN ribosómico (ribotipado), la hibridación ADN-ADN, el análisis de ácidos grasos de la membrana externa y la pared celular, la filogenia o relación evolutiva, etc.(Madigan *et al.*, 2010).

#### ***1.4.1.2 Métodos moleculares para el análisis taxonómico y filogenético***

El avance de la metagenómica en la última década ha sido crucial para dilucidar las relaciones metabólicas en comunidades complejas como los reactores anaerobios (Talbot *et al.*, 2008; Tabatabaei *et al.*, 2010; St-Pierre y Wright, 2014). Para el monitoreo de las comunidades



microbianas anaerobias, las herramientas moleculares más usadas pueden agruparse en dos categorías: *sondas moleculares*, usadas con mayor eficiencia cuando se tiene un conocimiento previo de la población microbiana, y *análisis de fragmentos de ADN*, usada cuando no se conoce la estructura de la comunidad microbiana (Anneli *et al.*, 2007). Las técnicas basadas en *sondas moleculares* más usadas en digestión anaerobia, incluye a la Hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) y la FISH combinada con la amplificación enzimática de la señal de fluorescencia (deposición de reportero catalizado) (CARD-FISH, por sus siglas en inglés) (Sanz y Kochling, 2007; Amann y Fuchs, 2008). Estas técnicas permiten la visualización directa de microorganismos no cultivados, su cuantificación y el conocimiento de si son activos en su propio hábitat natural (Sanz y Kochling, 2007; Amann y Fuchs, 2008).

Las técnicas basadas en el *análisis de fragmentos de ADN*, se trata del aislamiento, clonación y/o secuenciación de genes “marcadores” o fragmentos de ADN, conservados a nivel de especie, género, familia, etc. Estas técnicas parten de la necesidad de extraer el ADN y amplificar las secuencias por PCR. La separación de los fragmentos amplificados y su visualización puede basarse en varios aspectos (Anneli *et al.*, 2007):

- ✓ Diferencias conformacionales, observables tras la migración a través de un gradiente de desnaturalización químico (DGGE, *Denaturing gradient gel electrophoresis*) o térmico (TGGE, *Temperature gradient gel electrophoresis*);
- ✓ Polimorfismo de la conformación de la hebra sencilla de ADN de estas moléculas (SSCP, *Single strand conformation polymorphism*);
- ✓ Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, *Random amplified polymorphic DNA*);
- ✓ Polimorfismo de longitud de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción (RFLP, *Restriction fragment length polymorphism*; ARDRA, *Amplified ribosomal DNA restriction analysis*; T-RFLP, *Terminal-restriction fragment length polymorphism*);
- ✓ Polimorfismo en longitud de genes o espacios intergénicos de distintas especies bacterianas (RISA, *rDNA internal spacer analysis*).

La T-RFLP ha sido utilizada para examinar la composición y dinámica de comunidades microbianas, así como la abundancia relativa de las poblaciones (Schütte *et al.*, 2008). Esta herramienta ha sido aplicada para caracterizar ecosistemas de digestión anaerobia, según la

diversidad y dinámica, sobre todo de archaeas metanógenas en diferentes condiciones ambientales y nutricionales (Padmasiri *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Rademacher *et al.*, 2012).

Además, a partir de la amplificación de los genes *ARNr 16S*, se pueden construir librerías de clones para aislar, clonar y secuenciar estos fragmentos, lo que se traduce en la identificación de unidades taxonómicas operacionales (OTUs), que permiten obtener su filiación filogenética (Talbot *et al.*, 2008). Las librerías de clones del gen *ARNr 16S* han permitido caracterizar la digestión anaerobia de diferentes sustratos (Klocke *et al.*, 2007; Sanz y Kochling, 2007; Nettmann *et al.*, 2008; Talbot *et al.*, 2008), o identificar ciertas especies que prevalecen en determinadas condiciones operacionales (Nettmann *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011), incluso en condiciones de estrés (Rademacher *et al.*, 2012). De hecho, recientemente fueron caracterizadas microbiotas en reactores anaerobios con la utilización de técnicas avanzadas de secuenciación de fragmentos cortos de estos genes (pirosecuenciación) (Rademacher *et al.*, 2012; Wirth *et al.*, 2012), encaminadas a correlacionar parámetros operacionales del proceso con determinadas especies o géneros.

Por otro lado, también se puede realizar la amplificación de estos genes (*ARNr 16S*) en tiempo real (q-PCR), a fin de cuantificar grupos específicos de la comunidad. La q-PCR ha sido muy utilizada en la cuantificación de metanógenas en condiciones específicas o extremas (Blume *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010), por ejemplo, para cuantificar la razón bacteria/archaea y para cuantificar los órdenes y familias representativos de archaeas metanógenas: Methanobacteriales (MBT), Methanomicrobiales (MMT), Methanococcales (MCC), Methanosarcinaceae (Msc), Methanosaetaceae (Mst) en reactores anaerobios (Yu *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006; Blume *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010).

Para este trabajo se seleccionaron las técnicas de T-RFLP, la construcción de librería de clones del gen *ARNr 16S* de bacterias y archaeas y la q-PCR, teniendo en cuenta su amplio uso en la caracterización de comunidades anaerobias relacionadas con la obtención de metano (Nettmann *et al.*, 2010). El uso de estas técnicas moleculares diferentes, permitirá conocer la diversidad, dinámica y filiación taxonómica de las bacterias y archaeas que participan en el proceso, y su correlación con las condiciones nutricionales y ambientales, durante la obtención de metano.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Procedencia de los residuos agropecuarios e industriales. Caracterización físico-química

El estiércol porcino. Para los ensayos en semicontinuo el estiércol fue colectado de corrales de cerdos en la granja “El Colorado”, Sancti Spíritus, Cuba. Para los ensayos en discontinuo el estiércol fue colectado de corrales de cerdos de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La paja de arroz (residuo de cosecha de la planta de arroz) fue colectada al azar en los arrozales de la Empresa Arrocería “Sur del Jíbaro” de Sancti Spíritus, Cuba. Para los ensayos en discontinuo esta fue triturada y posteriormente tamizada hasta diámetro de partícula  $\leq 3$  mm. Para los ensayos en semicontinuo, después de la trituración (triturador Severin, Gmb, Alemania) se obtuvieron pajas de hasta 5 cm, la cual fue utilizada directamente sin tamizar. Las arcillas residuales, obtenidas a partir de los procesos de purificación de aceites básicos industriales extraídos del petróleo, fueron gentilmente donadas por los responsables ambientales de la Industria Petroquímica, Refinería de Petróleo “Sergio Soto” de Sancti Spíritus, Cuba.

Los sustratos se caracterizaron según los *parámetros físico-químicos* siguientes: sólidos totales (ST), volátiles (SV) y fijos (SF), el pH (pH-conductivity meter, OAKTON, EUTECH Instrument, Singapur), la alcalinidad, el nitrógeno total (N-total) y amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), según los métodos estándar (APHA-AWWA-WEF, 2012). Se determinó la relación de alcalinidades como el cociente de la alcalinidad parcial y total. También se determinó el carbono orgánico total en base húmeda mediante el Analizador Multi N/C (Analytik Jena). Se determinó el contenido de nitrógeno orgánico por diferencia entre el nitrógeno total e inorgánico y por ende, se estimó el contenido proteico total según el factor (N<sub>org</sub>·6,25). Se determinaron los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y el anión PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> por cromatografía de iones (ICS- 1000 e ICS- 2000), además de los metales AL<sup>3+</sup> y Fe<sup>2+</sup> por espectrometría de absorción atómica (ThermoScientific).

### 2.2 Experimentos en discontinuo de codigestión anaerobia de estos residuos para la obtención de metano, en condiciones mesofílicas y termofílicas

#### 2.2.1 Selección y caracterización de los inóculos

El inóculo inicial fue extraído de una planta anaerobia de tratamiento de estiércol porcino de la Empresa Porcina del Estado de Yucatán, México. Este inóculo fue utilizado para el arranque y

posterior estabilización de 2 reactores de acrílicos (Volumen 4 L), que fueron adaptados por más de 4 meses, uno a condiciones mesofílicas ( $35 \pm 2$  °C), y otro a condiciones termofílicas ( $55 \pm 2$  °C), alimentados con estiércol porcino (diluido con agua 1:3). La adaptación del inóculo a condiciones termofílicas se realizó según la metodología propuesta por (Cabirol *et al.*, 2003). Cada uno de estos reactores fue analizado semanalmente según los parámetros físico-químicos indicados en el epígrafe 2.3.1 de este capítulo. Los microorganismos propagados en los reactores de 4 L, adaptados a cada condición de temperatura por más de 6 meses, fueron utilizados como inóculo de los ensayos en discontinuo en condiciones mesofílicas y termofílicas.

### ***2.2.2 Experimentos de codigestión anaerobia en discontinuo***

Los experimentos se realizaron en cámara anaerobia, en botellas de 60 y 120 mL. Se utilizaron  $3,8 \text{ gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$  de inóculo y medio mínimo de crecimiento, reducido en atmósfera de nitrógeno, que contenía:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $0,50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $0,20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0,10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $0,15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{NaCl}$   $0,10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$   $0,02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{NaHCO}_3$   $3,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; disolución de vitaminas  $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ; disolución de micronutrientes  $10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Resazurina  $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Cisteína  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $\text{Na}_2\text{S}$  como disolución reductora. Se incubó a  $35$  ó  $55 \pm 2$  °C durante 65 días. Con la paja pretratada físicamente, se evaluó la adición de 0,95; 3,22; 10,86 y  $17,6 \text{ gSTV} \cdot \text{L}^{-1}$  de paja de arroz a la digestión de estiércol porcino ( $36,6 \text{ gSTV} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Se evaluó la digestión anaerobia de arcillas como monosustrato a concentraciones de 2,1 y  $4,1 \text{ gSTT} \cdot \text{L}^{-1}$ , y posteriormente se evaluó la adición de 0,8; 2,1; 4,1 y  $8,3 \text{ gSTT} \cdot \text{L}^{-1}$  de arcillas a la codigestión de estiércol y paja de arroz. Los controles utilizados fueron: inóculo sin sustrato, digestión de estiércol como monosustrato y codigestión de estiércol y paja de arroz.

## **2.3 Análisis de las fermentaciones en discontinuo**

### ***2.3.1 Parámetros físico-químicos***

Se determinaron los sólidos totales (STT), totales volátiles (STV) y totales fijos (STF) y el pH, según los métodos estándar (APHA-AWWA-WEF, 2012) al inicio y al final de los experimentos. Se determinó la alcalinidad a dos puntos de pH (5,75 y 4,30). La relación de alcalinidades ( $\alpha$ ) se calculó como el cociente de la alcalinidad parcial (a pH = 5,75) entre la alcalinidad total (a pH = 4,30). Se determinó el nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) y el N-Kjeldahl o nitrógeno total según los métodos estándares (APHA-AWWA-WEF, 2012).

### ***2.3.2 Determinación de ácidos grasos volátiles***

La concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs) en cada botella al final de los experimentos, fue determinada por cromatografía de gases (Cromatógrafo SRI modelo 8610, con detector de flama, columna Zebron y con gas acarreador Helio a 30 psi).

### ***2.3.3 Determinación de metano y dióxido de carbono***

Se midió la producción de metano ( $\text{CH}_4$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) cada 24 o 48 h, por cromatografía de gases (Cromatógrafo: Fisher Gas Partitioner Modelo 1200, con detector de conductividad térmica, de doble columna Porapak Q, malla molecular 5A y gas acarreador Helio a  $25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Se utilizó  $\text{CH}_4$  puro y mezcla de  $\text{CH}_4/\text{CO}_2$  para construir las curvas de calibración. Se calculó la cantidad de metano en moles, según la presión y temperatura ambiental en el laboratorio del Instituto de Ingeniería, UNAM (Ciudad de México) (0,771 atm y 293,15 K, respectivamente) y luego se determinaron los mili moles totales en la fase gaseosa de la botella, cuyos valores se dividieron por los g de SV de sustrato añadido en cada caso. Además, se determinó el rendimiento de metano en mL por gSV a condiciones normales de presión y temperatura (1 atm y 273,15 K, respectivamente).

### ***2.3.4 Determinación de la actividad metanogénica específica***

La actividad metanogénica específica (AME), definida como la cantidad de sustrato convertido a metano por unidad de biomasa celular por unidad de tiempo, se calculó teniendo en cuenta la pendiente de la curva de formación de metano en la etapa exponencial, de cada sistema (velocidad máxima de formación de metano), dividido entre el valor de los gSSV de microorganismos (inóculo) puesto en cada sistema. La AME se expresó en  $\text{gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ .

## **2.4 Optimización de la actividad metanogénica específica en la codigestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales**

La optimización de la actividad metanogénica específica (AME) se llevó a cabo mediante la metodología de superficie de respuesta (Montgomery, 2005). Se empleó un diseño compuesto central basado en el método de Box y Hunter (López Planes, 1988), donde la AME fue seleccionada como variable respuesta (variable dependiente). El diseño consistió en un factorial completo  $2^k$  (para  $k = 3$ ) con la variante de ser centrado en las caras, es decir, con seis puntos

axiales (puntos estrellas) localizados en el centro de las caras y además, dos repeticiones del punto central (Montgomery, 2005). Las 16 variantes de mezcla se analizaron con tres repeticiones por variante e incluyeron dos corridas centrales para determinar el error experimental y el ajuste de los modelos. Se realizaron los ensayos en régimen discontinuo, utilizando la metodología y el medio de cultivo descrito en el epígrafe 2.2.2, donde cada factor (concentración de sustrato) fue evaluado a niveles bajo, medio y alto como se muestra en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Niveles de concentración de los sustratos (factores) para las variantes de mezcla según el diseño factorial  $2^3$  compuesto central (centrado en las caras).

Factores	Símbolos	Nivel de los factores		
		Bajo	Medio	Alto
Estiércol porcino (gSTV·L <sup>-1</sup> )	A	9,10	22,85	36,60
Paja de arroz (gSTV·L <sup>-1</sup> )	B	7,00	12,30	17,60
Arcillas residuales (gSTT·L <sup>-1</sup> )	C	0,80	4,55	8,30

La variable dependiente (AME) fue ajustada mediante una ecuación polinomial cuadrática para correlacionarla con las variables independientes. La ecuación cuadrática utilizada fue:

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^k A_i x_i + \sum_{i=1}^k A_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k A_{ij} x_i x_j \quad \text{Ec. 2.1}$$

Donde  $Y$  es la variable respuesta (AME) que depende de las variables de entrada  $X_i$ ;  $X_j$  (concentración de cada sustrato),  $A_0$  es el coeficiente lineal para  $X_i$ ;  $A_{ii}$  es el coeficiente cuadrático, y  $A_{ij}$  es el coeficiente de interacción.

Se utilizó el software *STATISTICA versión 8,0* (StatSoft Inc., USA) para el diseño de los experimentos y el procesamiento de los resultados obtenidos. La calidad del ajuste del modelo fue expresada por el coeficiente de determinación  $R^2$  y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{\text{adj}}$ ). La significación estadística fue determinada mediante los valores de Fisher (F-valor), basado en los valores de probabilidad (p-valor) con un 95% de nivel de confianza. Se utilizaron los estadígrafos coeficiente de correlación (R), suma de cuadrados (SS), media de la suma de cuadrados, chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) y Durbin-Watson para analizar la significación del modelo cuadrático. El estadígrafo Durbin-Watson se utilizó además, para determinar si existía autocorrelación de primer orden. La significación del coeficiente de regresión fue analizada por la

prueba t-Student. La normalidad de los datos fue analizada construyendo la gráfica de probabilidad normal de los residuos. Además se determinó el porcentaje de contribución de cada factor con la utilización de las ecuaciones siguientes:

$$PC_i = \frac{\sum_{i=1}^n SS_i}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n SS_i + SS_j + SS_{ij}} * 100 \quad \text{Ec. 2.2}$$

$$PC_{ii} = \frac{\sum_{i=1}^n SS_{ii}}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n SS_i + SS_j + SS_{ij}} * 100 \quad \text{Ec. 2.3}$$

$$PC_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^n SS_{ij}}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n SS_i + SS_j + SS_{ij}} * 100 \quad \text{Ec. 2.4}$$

Donde  $PC_i$ ,  $PC_{ii}$ , y  $PC_{ij}$  representan la contribución total (PC) de primer orden, del término cuadrático y de la interacción, respectivamente.  $SS_i$ ,  $SS_{ii}$  y  $SS_{ij}$  representan la suma de cuadrados computada de primer orden, del término cuadrático y de la interacción.

Finalmente, el software permitió visualizar las superficies de respuestas en 3D y 2D, para mostrar el efecto de la interacción de dos factores (manteniendo el tercero a nivel fijo) sobre la AME.

#### ***2.4.1 Ensayos de validación del modelo de optimización***

Se realizaron experimentos en discontinuo en similares condiciones, pero con la utilización de las concentraciones de sustrato que según el modelo maximizan los valores de AME. De esta manera, para condiciones mesofílicas se utilizaron 28,35 gSTV·L<sup>-1</sup> de estiércol, 17,60 gSTV·L<sup>-1</sup> de paja y 8,30 gSTT·L<sup>-1</sup> de arcilla.

Para condiciones termofílicas se utilizaron 20,10 gSTV·L<sup>-1</sup> de estiércol, 10,18 gSTV·L<sup>-1</sup> de paja y 3,05 gSTT·L<sup>-1</sup> de arcilla. Las botellas se incubaron a 35 ± 2 °C o 55 ± 2 °C, respectivamente, durante 21 días. En ambos casos, el inóculo utilizado provenía de los reactores de laboratorio antes mencionados, que se mantenían a 35 ± 2 °C o 55 ± 2 °C, respectivamente. De igual manera, se realizó el análisis inicial y final de los parámetros fisicoquímicos (epígrafe 2.3.1) y se

determinó la producción diaria de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> por cromatografía de gases (epígrafe 2.3.3). Se calculó la AME a partir de la mejor pendiente de la curva de formación de metano como se explica en el epígrafe 2.3.4 y teniendo en cuenta que se utilizaron 3,9 y 3,2 gSSV·L<sup>-1</sup> de inóculo mesofílico y termofílico, respectivamente. Se aplicó la prueba t de Student para evaluar la relación entre los valores de AME observados por las nuevas condiciones experimentales y la respuesta predicha por el modelo de optimización.

## 2.5 Determinación de la capacidad de adsorción de las arcillas

Para determinar las propiedades adsorbentes de las arcillas residuales, se determinó el coeficiente de adsorción, con la utilización de la isoterma de Freundlich según la metodología propuesta por Wang *et al.*, (2011), con la modificación de utilizar diferentes concentraciones de las arcillas. Se adicionaron 20, 50, 93 y 172 g·L<sup>-1</sup> de arcillas a tubos de vidrio y se añadieron 0,04 L de cloruro de amonio en cada tubo en un rango de concentración entre 3 y 7 g·L<sup>-1</sup>.

Los tubos se mantuvieron en baño María, a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se analizó la concentración de iones amonio remanentes en la solución de cada tubo, mediante el método de determinación de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) por destilación (Vapodest, Gerhardt, Germany). Se utilizaron blancos de cada concentración de amonio sin la adición de arcillas. La cantidad de iones amonio adsorbida fue calculada según la ecuación propuesta por Wang *et al.*, (2011):

$$G = (C_0 - C_{eq}) V / m \quad \text{Ec. 2.5}$$

donde  $G$ : es la cantidad de amonio adsorbido por unidad de masa de la arcilla (mg·g<sup>-1</sup>).  $C_0$ : es la concentración de amonio del blanco (inicial) para cada concentración evaluada (mg·L<sup>-1</sup>),  $C_{eq}$ : es la concentración de equilibrio al momento de la medición (concentración final obtenida, mg·L<sup>-1</sup>).  $V$ : es el volumen total de la solución y  $m$ : la masa de arcilla (materia fresca) añadida en cada caso.

Posteriormente, se empleó el modelo de Freundlich para determinar los coeficientes de adsorción del material. Estos coeficientes se determinaron por la función matemática:

$$G = K_f C_{eq}^{1/n} \quad \text{Ec. 2.6}$$

donde  $K_f$ : constituye la capacidad de adsorción o coeficientes de adsorción de Freundlich y  $n$ : la



intensidad isotérmica de esta adsorción.

La ecuación lineal resultante se obtiene aplicando la función logarítmica, donde se pueden extrapolar los datos experimentales.

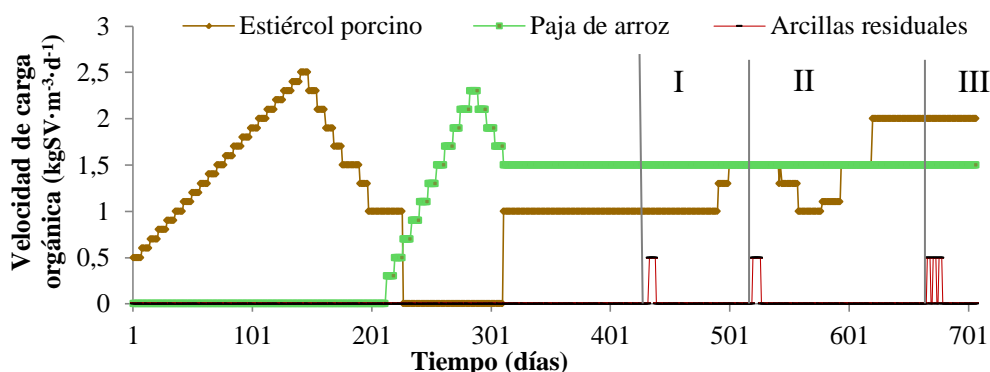
$$\text{Log } G = \text{Log } K_f + 1/n \text{ Log } C_{eq} \quad \text{Ec. 2.7}$$

## **2.6 Codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas residuales, en semicontinuo utilizando un reactor de tipo tanque agitado**

La codigestión de los sustratos fue evaluada en régimen semicontinuo (en ciclos de adición-extracción), con la utilización de un reactor de tipo tanque agitado de 10 L de capacidad, el cual fue inicialmente inoculado con una mezcla de lodos anaerobios provenientes de 3 plantas de mediana escala (de 24, 45 y 60 m<sup>3</sup> de reactor tipo chino, que tratan estiércol porcino). Estas plantas fueron previamente caracterizadas y los lodos anaerobios evaluado según su AME. Posteriormente, se adicionaron al reactor tres partes iguales de cada lodo, hasta 6 litros, y se rellenó hasta 9 L (Volumen efectivo del reactor) con estiércol porcino diluido (1 % de SV), proveniente de la granja porcina “El Colorado” y se incubó a temperatura de 35 ± 2 °C, durante los 3 meses posteriores. En este período el reactor fue alimentado semanalmente con estiércol porcino diluido con agua del grifo (hasta 1-1,5 % de SV).

A partir de este tiempo, se comenzó a aumentar paulatinamente la carga orgánica de estiércol porcino a partir de 0,5 kgSV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>, esta carga fue aumentada cada 7 días hasta 2,5 kgSV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> (Fig. 2.1). A partir de este momento, la carga orgánica se disminuyó hasta 1,5 kgSV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>, donde se estabilizó el sistema por 15 días y luego, la carga se disminuyó hasta 1 kgSV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>, donde se estabilizó otros 15 días. En este momento, se comenzó a aplicar paja de arroz, con carga orgánica de 0,3 la cual se aumentó hasta 2,3 kgSV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> según la metodología propuesta por Klocke *et al.*, (2007), donde se deja de adicionar estiércol después de la segunda semana y se continúa con la adición de paja de arroz como monosustrato. A continuación, se disminuyó la carga orgánica de paja hasta 1,5, momento en la cual comienza su codigestión con estiércol porcino a velocidad de carga orgánica de este de 1 kgSV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>. A los 122 días de la codigestión anaerobia de estiércol y paja de arroz (1 kgSV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> de estiércol y 1,5 kgSV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> de paja de arroz), fueron añadidas 0,5 kgSV·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> de arcillas durante 5 días.

En una segunda fase, se aumentó la carga orgánica de estiércol a  $1,5 \text{ kgSV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ , pero a la misma la carga de paja de  $1,5 \text{ kgSV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ . En esta fase, una vez estabilizado el reactor se agregaron nuevamente,  $0,5 \text{ kgSV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  de arcillas. Posteriormente, y durante un período de más de 100 días, se varió la carga orgánica de estiércol con el objetivo de lograr una adaptación de la microbiota a mayores cargas de este sustrato. De esta manera, se evaluaron tiempos de retención hidráulica de 30, 35 y 25 días. A este último, (velocidad de carga orgánica de estiércol de  $2 \text{ kgSV}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ ) se realiza la última aplicación de arcillas (9 dosis), en este caso, a intervalos de 3 días, dejando 2 días sin aplicar.



**Fig. 2.1** Operación del reactor durante la digestión y codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz, con adición de arcillas residuales en tres fases (indicada por líneas verticales), bajo régimen semicontinuo.

El reactor de tanque agitado fue mantenido a temperatura constante de  $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , mediante un intercambiador de calor (doble cubierta con recirculación de agua) y con agitación intermitente (de 2 a 4 h diarias) a 50-80 rpm. El metano producido fue medido por desplazamiento de un émbolo en un recipiente que contenía solución de NaOH al 2,5 %. A la salida del reactor, se colectó el biogás producido durante 2 h por día, para analizar la composición de este ( $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ), con la utilización de un analizador de gases modelo SR2-DO (Herman Sewerin GmbH, Germany).

### ***2.6.1 Análisis de parámetros fisicoquímico del reactor en semicontinuo***

El comportamiento del reactor fue analizado a través de la producción diaria de  $\text{CH}_4$ , con la consideración de la temperatura ambiental y presión atmosférica, para normalizar los litros de  $\text{CH}_4$  ( $L_N$ ) según métodos estándar (VDI-4630, 2006). Se determinaron parámetros físico-

químicos como se describe en el epígrafe 2.3.1. Se determinó la concentración de AGVs por titración y por cromatografía de gases (Cromatógrafo Focus Thermo Scientific). Se determinó la relación AGVs/AT y la concentración de nitrógeno amoniacal según los métodos estándar (VDI-4630, 2006). La concentración de amoníaco libre fue calculada según la temperatura y el pH dentro del reactor. La concentración de ácidos grasos volátiles fue determinada por titración y corroborada por cromatografía de gases (Focus Thermo Scientific).

## **2.7 Análisis de la comunidad procariota**

### ***2.7.1 Métodos microbiológicos dependientes del cultivo***

El cultivo se desarrolló en botellas de 60 mL de capacidad con el medio mínimo de crecimiento descrito en el epígrafe 2.2.2, e inoculado en cámara anaerobia con  $1 \text{ gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$  de lodo procedente de la digestión anaerobia de los tres sustratos en régimen discontinuo, al cabo de 21 días de incubación. Para distinguir los grupos tróficos presentes se emplearon los sustratos específicos: celulosa ( $2,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), sacarosa ( $2,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), glucosa ( $2,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), acetato de sodio ( $2,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), metanol (2 %), mezcla de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (2:1:1), y una mezcla de formiato de sodio (2 %) y  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  (80:20 %). Todas las soluciones de sustrato fueron ajustadas previamente a pH entre 6 y 7.

Se determinó la concentración de azúcares reductores según el método Dubois (Fenol-Sulfúrico) (Jarrell y Kalmok, 1988). Para los grupos metanogénicos se cuantificó la producción de metano por cromatografía de gases y se determinó la AME como se describe en epígrafe 2.3.4. Para la determinación de los valores de actividades enzimáticas, se tuvo en cuenta la concentración de sustrato y la concentración de biomasa microbiana, utilizada en cada botella.

### ***2.7.2 Métodos microbiológicos independientes del cultivo. Métodos moleculares***

***Extracción de ADN y amplificación del gen ARNr 16S de bacterias y archaeas:*** De los ensayos en discontinuo, para validar la optimización de la AME, se tomaron muestra de la biomasa microbiana al inicio y al final (después de 21 d) de los experimentos. De los ensayos en semicontinuo, se tomó muestra de biomasa microbiana del reactor después de la arrancada (fermentación de estiércol porcino como monosustrato), después de varias semanas de codigestión de estiércol y paja de arroz y durante la tercera aplicación de arcillas al reactor. La

extracción del ADN metagenómico se realizó con la utilización del kit de extracción PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc., USA), según las instrucciones del fabricante.

Cada muestra fue tomada por duplicado y de cada una, se realizaron dos extracciones del ADN. La amplificación del gen *ARNr 16S*, se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la utilización de la metodología propuesta por: Rademacher *et al.*, (2012) con algunas modificaciones. Para los genes de bacterias, se utilizó el cebador 27f (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3', (Lane, 1991; Sipos *et al.*, 2007)) marcado en el extremo terminal 5' con Indodicarbocianina (Cy5) y el cebador 926r (5' CCGTCAATTCMTTTRAGTTT 3', (Weisburg *et al.*, 1991; Després *et al.*, 2007)). Cada reacción contenía tampón de la enzima Recombinante Taq polimerasa (1X), MgCl<sub>2</sub> (2 mmol·L<sup>-1</sup>), los deoxinucleótido trifosfato (dNTP, 0,2 mmol·L<sup>-1</sup>), cada cebador (0,4 μmol·L<sup>-1</sup>), 1 U de la enzima polimerasa y 1 μl del ADN molde (aprox. 10 ng). El programa fue el siguiente: desnaturalización a 95 °C, 3 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C, 30 s, alineamiento a 51 °C, 30 s, y elongación a 72 °C, 90 s, posteriormente se programó una etapa de extensión final a 72 °C, 8 min.

Se utilizaron como controles positivos, ADN genómico de cultivos puros de *Clostridium tyrobutyricum* (DSM 2637), *Escherichia coli* (DSM 1116), *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50090), y *Desulfosarcina variabilis* (DSM 2060) (Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany (DSMZ)). Se utilizaron tres repeticiones de la PCR por cada ADN molde analizado.

Para los genes de archaeas se utilizaron los cebadores Ar109f (5' ACKGCTCAGTAACACGT 3', (Großkopf *et al.*, 1998)) marcado en el extremo terminal 5' con Cy5 y el cebador Ar912r (5' CTCCCCGCCAATTCCTTTA 3', (Lueders y Friedrich, 2000)). Las condiciones de reacción fueron similares a las descritas para bacterias, con la diferencia de que en este caso se utilizó 2,5 mmol·L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> y la temperatura de alineamiento fue 52 °C, en 28 ciclos.

Se utilizaron como controles positivos ADN genómico de cultivos puros de *Methanoculleus bourgensis* (DSM 3045), *Methanoculleus marisnigri* (DSM 1498), *Methanofollis liminatans* (DSM4140), *Methanomicrobium mobile* (DSM 1539) y *Methanospirillum hungatei* (DSM 864) (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany (DSMZ)). Todos los reactivos para las PCR fueron suministrados por Fermentas (St. Leon-Rot, Germany) y los cebadores fueron suministrados por Biomers (Ulm,

Germany). Los fragmentos del gen *ARNr 16S* amplificados, fueron purificados con la utilización del kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), según las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración de los fragmentos del gen *ARNr 16S* amplificados, por fotometría, con la utilización de un Nanofotómetro (Implen, München, Germany).

**Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos terminales de restricción:** En general, el análisis de T-RFLP fue llevado a cabo según la metodología propuesta por: Rademacher *et al.*, (2012). Aproximadamente, 250 ng de cada producto de PCR (fragmentos del gen *ARNr 16S*), fue digerido con 10 U de cada una de las enzimas de restricción *MspI* y *Hin6I* (para fragmentos de bacterias) y *AluI* (para los fragmentos de archaeas), en un volumen total de 20 µL a 37 °C, por 4 h (todas las enzimas fueron suministradas por Thermo Scientific Fermentas, Germany).

Por cada producto de PCR procesado, se trabajó con tres repeticiones en la digestión. Posteriormente, 0,5 µl de cada muestra de fragmentos obtenidos de la digestión, marcado en el extremo terminal 5' con Cy5 (fragmentos de restricción terminales, FTs), fueron aplicados a una solución Tampón SLS (Beckman Coulter, Krefeld, Germany), que contenía 0,5 µL de estándares de ADN de diferentes tamaños (ADN-600), marcados con el cromóforo D1 (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Los FTs fueron separados por electroforesis capilar y detectados por fluorescencia (GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) a 4,8 kV, durante 70 min.

Los datos obtenidos de los electrofenogramas, fueron analizados mediante el software GeXP analysis (*version 10.2*), donde se consideró la talla de los FTs, calculada según el tiempo de migración de los estándares de ADN de diferentes tamaños aplicados. Todos los fragmentos, con una longitud entre 60 y 650 pares de base (pb) fueron utilizados para el análisis subsiguiente con la herramienta de software libre T-REX, disponible en línea: <http://trex.biohpc.org/> (Culman *et al.*, 2009).

La identificación de los máximos de fluorescencia “verdaderos” se pudo discernir por el ruido de la línea base de las señales de los FTs marcados (Abdo *et al.*, 2006), así como por la posición de estos por debajo del umbral de frecuencia de 0,5 (Smith *et al.*, 2005), todo ello basado en su altura. Para el subsecuente análisis se visualizó la abundancia relativa (en base a la altura de los máximos de fluorescencia) de cada FTs. Los FTs, que representaban menos de 1 ó 2 % de esta abundancia relativa en cada muestra, no se consideraron.

**Construcción de la librería de clones del gen *ARNr 16S* de bacteria y archaeas:** La librería de clones se realizó solo para las muestras seleccionadas de los ensayos en semicontinuo. Se analizó la muestra de biomasa microbiana del reactor de tanque agitado cuando fermentaba estiércol como monosustrato, (denominada: Digestión de estiércol) y durante la aplicación de arcillas a la codigestión de estiércol y paja, es decir, al día 4 y al día 10, después de adicionar la primera dosis de arcilla en la fase III. A partir del ADN extraído de estas muestras se amplificaron por PCR los genes *ARNr 16S*, como se describió anteriormente, pero en este caso con los cebadores no marcados. Los fragmentos amplificados de tres repeticiones de reacción fueron mezclados y purificados con la utilización del kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector pGem<sup>®</sup>-T, y transformados en células competentes de *E. coli* cepa JM 109, según las recomendaciones de los proveedores (Promega, Mannheim, Germany).

A partir de las colonias crecidas en placa, se seleccionaron al azar, colonias de color blanquecino, y se inocularon en medio líquido (Promega, Mannheim, Germany), luego se incubaron a 37 °C, 16 h y 150 rpm. Posteriormente, los plásmidos fueron extraídos mediante el kit NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Germany). La inserción correcta y orientación adecuada del gen *ARNr 16S* fue examinada por medio de una doble digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *Sall* (Thermo Scientific Fermentas, Germany), de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

A continuación, se llevó a cabo la secuenciación del ADN plasmídico de cada clon en la empresa *GATC Biotech AG* (Konstanz, Alemania). Las secuencias obtenidas fueron procesadas en el software *BioNumerics 7.0* (Applied Maths, Belgium). Después de analizar la calidad de las secuencias, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias, donde se utilizó el algoritmo Needleman-Wunsch con la herramienta de cálculo de similitud CLUSTAL-W en combinación con la herramienta de asociación de secuencias UPGMA, con la utilización de la herramienta de corrección Kimura-2-parameter, y los parámetros por defecto, todas disponibles en el servidor web del Instituto de Bioinformática Europeo, EBI: [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk).

Apoyado en este análisis las secuencias fueron agrupadas en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU, del inglés) en base a un 97 % de similitud. A continuación, las secuencias de cada OTU definido, se compararon con las disponibles en las bases de datos del *European*

*Molecular Biology Laboratory (EMBL)*, con la utilización de la herramienta *BioNumerics BLASTn*, basada en la comparación nucleótido-nucleótido de muestras ambientales (env\_nt databases).

Los árboles filogenéticos se construyeron tomando como criterio la no inclusión de los huecos (gaps) del alineamiento, y sobre la base de la agrupación de secuencias, teniendo en cuenta las medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), con la corrección de parámetros por defecto *Kimura-2-parameter*, y los valores de confianza se calcularon mediante el método de muestreo con reemplazamiento con 1000 repeticiones (método Bootstrap).

***La PCR cuantitativa en tiempo real:*** Los ensayos de la PCR en tiempo real (q-PCR) fueron realizados a las mismas muestras utilizadas para construir la librería de clones (muestra de la digestión de estiércol, y muestras tomadas al día 4 y al día 10 después de la adición de la primera dosis de arcillas en la fase III). De manera general, se siguió una metodología propuesta anteriormente para sistemas anaerobios similares (Bergmann *et al.*, 2010), donde se cuantifica el número de copias del gen *ARNr 16S* de bacterias en general, y el número de copias del gen *ARNr 16S* de archaeas metanogénicas de los ordenes Methanobacteriales y Methanomicrobiales, así como de las familias Methanosarcinaceae y Methanosaetaceae. De igual manera, se ensayaron tres repeticiones por muestra de ADN analizado.

### ***2.7.3 Análisis de la diversidad y organización de la comunidad procariota***

La riqueza de especies de bacterias y archaeas se determinó por la metodología propuesta por (Marzorati *et al.*, 2008) basado en el número de FTs o el número de OTUs obtenidos en cada muestra. Se utilizó el Índice de Shannon (*H*) (Shannon y Weaver, 1963) para evaluar y comparar esta diversidad, y se calculó el índice de Equidad (índice de Pielou,  $H/H_{max}$ ) de la comunidad procariota en cada muestra tomada del reactor, como el cociente del índice de Shannon y el número potencial de especies en la muestra. Este índice describe la uniformidad de la distribución de los individuos en la comunidad (Pielou, 1966). Se determinó, además, el coeficiente de Jaccard (*J*) para evaluar la similitud de especies en las muestras evaluadas lo que refleja la dinámica del reactor durante la codigestión anaerobia con adición de las arcillas residuales.

## **2.8 Análisis estadístico**

Se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianza, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Bartlett, respectivamente. En los casos en que no se cumplieron las premisas del ANOVA se realizaron las transformaciones apropiadas a la variable analizada. De verificarse las dos premisas anteriores, se empleó un análisis de varianza de clasificación simple y ANOVA bifactorial. Para comparar las medias de los rendimientos de metano, las concentraciones de ácidos grasos volátiles y las AME de los ensayos en discontinuo, así como, para comparar los parámetros evaluados en régimen semicontinuo, se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan utilizando el Software STATGRAPHICS *Centurión XV (versión 15,1)*, para un 95 % de nivel de confianza.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz, con adición de arcillas residuales industriales. Ensayos en discontinuo

##### 3.1.1 Caracterización de los sustratos

Los sustratos estiércol porcino, paja de arroz y las arcillas residuales industriales fueron caracterizados según los parámetros físico-químicos mostrados en la Tabla 3.1. Se observó una desbalanceada relación carbono/nitrógeno en el estiércol (19:1) y en la paja (48:1). También se muestra que la concentración de nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) en el estiércol ocupa más de 50 % del nitrógeno total de esta biomasa ( $2,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). En el caso de la paja, prácticamente todo el nitrógeno proviene del nitrógeno orgánico.

**Tabla 3.1** Características físico-químicas de los sustratos evaluados. Cada valor representa la media de tres repeticiones.

Parámetros	Estiércol porcino	Paja de arroz	Arcillas residuales
ST (%)	6,30	94,60	97,70
SV (% de ST)	69,30	70,40	41,30
COT ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	78,30	43,00	42,80
N-Total ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	4,12	0,89	n/d
N- $\text{NH}_4^+$ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	2,24	0,03	0,00
N-orgánico ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1,88	0,86	n/d
Proteínas ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	11,70	5,38	n/d
Relación C:N	19:1	48:1	n/d
Alcalinidad ( $\text{g CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ )	2,70	n/d	n/d
Relación de Alcalinidades alfa ( $\alpha$ )	0,45	n/d	n/d
pH	7,90	n/d	n/d
$\text{Na}^+$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	245,80	1 972,00	393,50
$\text{K}^+$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	2 100,00	12 186,00	527,50
$\text{Mg}^{2+}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	1 824,00	18,76	42,48
$\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	1 761,00	1 309,00	3 708,00
$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	7 019,00	2,95	<0,50
$\text{Al}^{3+}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	271,90	5 936,00	13 127,00
$\text{Fe}^{2+}$ ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	442,40	4 754,00	1 510,00

n/d: no determinado

Las arcillas residuales contienen poca materia orgánica (SV = 41,3 %) y carbono orgánico total (COT =  $42,8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). En cuanto al contenido de minerales, las arcillas contienen 2,3 veces más

iones  $Mg^{2+}$  que la paja y además contienen 3,4 veces más  $Fe^{2+}$  que el estiércol. También es notable el contenido de  $Al^{3+}$  (2,2 veces más que en la paja, y 48 veces más que en el estiércol). El contenido de iones  $Ca^{2+}$  en las arcillas también es más del doble del contenido de este, tanto en estiércol porcino como en la paja de arroz. Es notable también la concentración de iones  $Na^+$  y  $K^+$  que contienen las arcillas residuales.

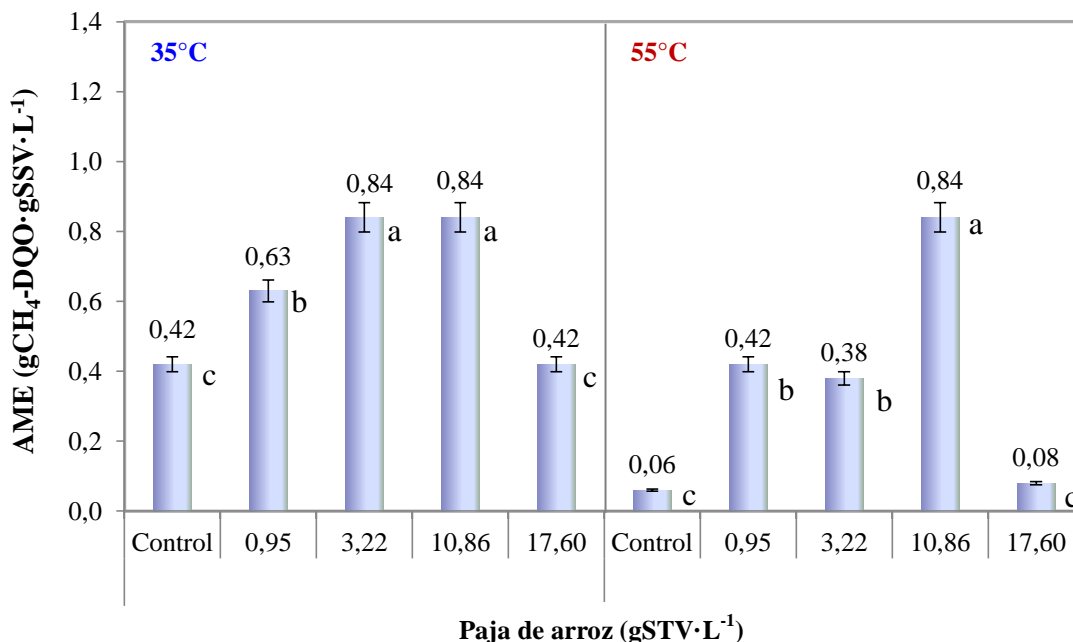
### ***3.1.2 Codigestión anaerobia de estiércol porcino, con la utilización del cosustrato paja de arroz, en condiciones mesofílicas y termofílicas***

En condiciones mesofílicas los resultados mostraron un incremento significativo de la actividad metanogénica específica (AME) cuando se adicionó paja de arroz hasta concentraciones de  $10,86 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 3.1), respecto al control sin paja de arroz (botellas inoculadas sólo con  $36,6 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  de estiércol porcino). A concentraciones de  $17,6 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  se apreció una reducción de la AME a valores similares al control.

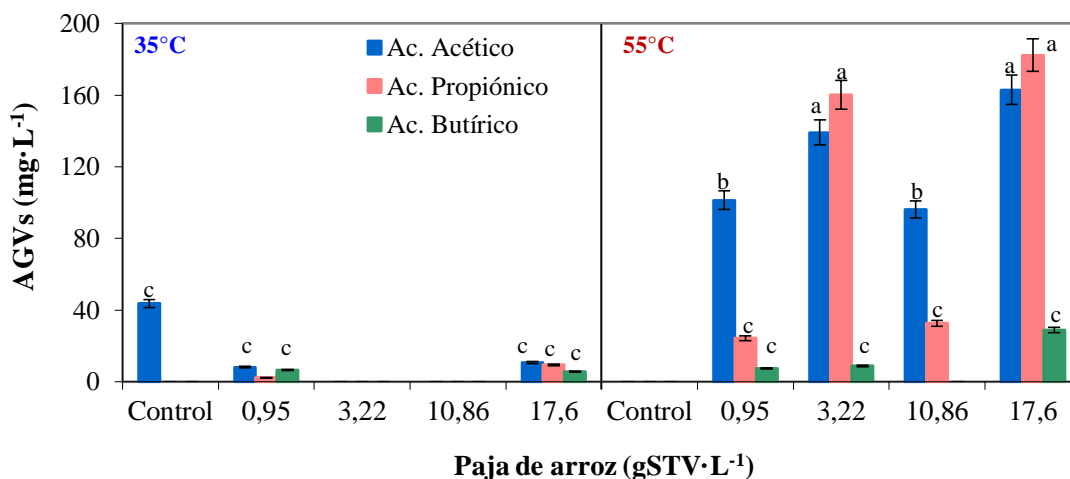
De manera análoga, en condiciones termofílicas también se observó un incremento significativo de la AME con la adición de paja de arroz a concentraciones entre  $0,95$  y  $10,86 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$ , respecto al control sin paja de arroz (Fig. 3.1). No se detectaron diferencias significativas entre las AME a concentraciones de paja de  $0,95$  y  $3,22 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$ , obteniéndose una máximo de actividad cuando se empleó  $10,86 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se destacan los bajos valores de AME obtenidos en el control y a altas concentraciones de paja ( $17,6 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

En términos de rendimiento de metano (calculados en condiciones normales de presión y temperatura) (Tabla 3.2), se evidenció que tanto en condiciones mesofílicas como termofílicas no se existieron diferencias significativas cuando se utilizaron concentraciones de paja arroz de  $0,95$ ;  $3,22$  y  $10,86 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pero sí se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre estos sistemas y el control y cuando se empleó  $17,6 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  de paja de arroz. El potencial de metano obtenido en la digestión anaerobia de estiércol porcino como monosustrato (control), en condiciones mesofílicas, fue de  $285 \pm 21,3 \text{ mL}_N\cdot\text{gSV}^{-1}$ .

Respecto a la acumulación de ácidos grasos volátiles medidos al final de los experimentos, se obtuvieron diferencias significativas entre cada condición de temperatura ensayada (mesofílica y termofílica) (Fig. 3.2). En condiciones termofílicas, se obtuvo mayor acumulación de los ácidos grasos volátiles: acético, propiónico y butírico, mientras que en condiciones mesofílicas estas concentraciones fueron muy bajas ( $< 15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). En el rango termofílico, la fase más afectada



**Fig. 3.1** Actividad metanogénica específica durante la adición de diferentes concentraciones de paja de arroz a la digestión anaerobia de estiércol porcino en condiciones mesofílicas (35 °C) y termofílicas (55 °C). Letras diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), entre las actividades metanogénicas, según la prueba de Duncan aplicada. Control: botellas inoculadas sólo con 36,6 gSTV·L<sup>-1</sup> de estiércol porcino. Cada condición de concentración de paja de arroz fue ensayada con tres repeticiones.



**Fig. 3.2** Concentración de ácidos grasos volátiles al final de la digestión anaerobia de estiércol porcino con 0,95; 3,22; 10,86 y 17,20 gSTV·L<sup>-1</sup> de paja de arroz en condiciones mesofílicas (35 °C) y termofílicas (55 °C). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), entre la concentración de cada ácido, según la prueba de Duncan aplicada. Control: botellas inoculadas sólo con 36,6 gSTV·L<sup>-1</sup> de estiércol porcino. Cada concentración de los ácidos grasos volátiles representa la media de tres repeticiones.

fue la acetogénica, donde los niveles de ácido propiónico fueron los más altos para las concentraciones de 3,22 y 17,6 gSTV·L<sup>-1</sup>, los cuales coinciden con los menores valores de actividad metanogénica específica (AME) (0,4 y 0,1 gCH<sub>4</sub>-DQOg·SV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectivamente) y de remoción de sólidos volátiles (60,3 y 42,9 %, respectivamente) (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2** Parámetros físico-químicos al finalizar la digestión anaerobia de estiércol porcino. Los experimentos se realizaron en régimen discontinuo, con la adición de diferentes concentraciones de paja (0,95; 3,22; 10,86 y 17,6 gSTV·L<sup>-1</sup>), en condiciones mesofílicas (35 °C) y termofílicas (55 °C). Los valores representan la media de tres repeticiones ± desviación estándar.

Parámetros	35°C				55°C			
	0,95	3,22	10,86	17,6	0,95	3,22	10,86	17,6
Paja de arroz (gSTV·L <sup>-1</sup> )								
STT (g·L <sup>-1</sup> )	5,5±1,0	5,8±0,5	6,4±0,1	7,0±0,1	6,5±0,7	7,2±0,9	7,3±0,8	7,6±1,0
STV (g·L <sup>-1</sup> )	1,9±1,0	2,2±0,5	3,7±0,1	4,3±0,1	3,0±0,7	4,3±0,9	3,5±0,8	4,2±1,0
STF (g·L <sup>-1</sup> )	3,6±1,0	3,6±0,5	2,7±0,1	2,7±0,1	3,5±0,7	2,9±0,9	3,8±0,8	3,3±1,0
Alcalinidad (gCaCO <sub>3</sub> ·L <sup>-1</sup> )	3,5±1,0	3,2±0,9	3,5±0,9	3,4±0,8	3,3±0,9	3,2±1,0	3,5±1,0	3,5±0,9
Relación de alcalinidades (α)	0,7±0,0	0,8±0,0	0,8±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,8±0,0	0,5±0,0
pH final	7,5±0,2	7,5±,01	7,5±0,2	7,5±0,2	7,8±0,1	7,7±0,1	7,7±0,3	7,1±0,2
Remoción SV (%)	72,9±4,1	79,4±2,6	79,6±3,4	50,1±2,6	58,2±2,1	60,3±2,6	81,0±3,2	42,9±2,6
CH <sub>4</sub> (mL <sub>N</sub> ·gSV <sup>-1</sup> )	396±10,8	434±14,5	399±8,6	297±32,2	438±25,2	397±59,3	399±17	82,6±3,6

*SST: Sólidos suspendidos totales*

*SSV: Sólidos suspendidos volátiles*

*SSF: Sólidos suspendidos fijos*

*Remoción de SV: Remoción de sólidos volátiles*

Los restantes parámetros físico-químicos determinados respaldaron la estabilidad de los procesos. Se logró una eficiente remoción de sólidos volátiles en condiciones mesofílicas para las concentraciones de paja de arroz de 3,22 y 10,86 gSTV·L<sup>-1</sup> (79,4 y 79,6 %, respectivamente) mientras que en condiciones termofílicas para las mismas concentraciones de paja de arroz (3,22 y 10,86 gSTV·L<sup>-1</sup>) este porcentaje de remoción fue diferente (60,3 y 81,0 %, respectivamente). A 17,6 gSTV·L<sup>-1</sup> de paja, se obtuvo la menor remoción de sólidos volátiles (42,9 %) (Tabla 3.2).

### ***3.1.3 Adición de arcillas a la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz***

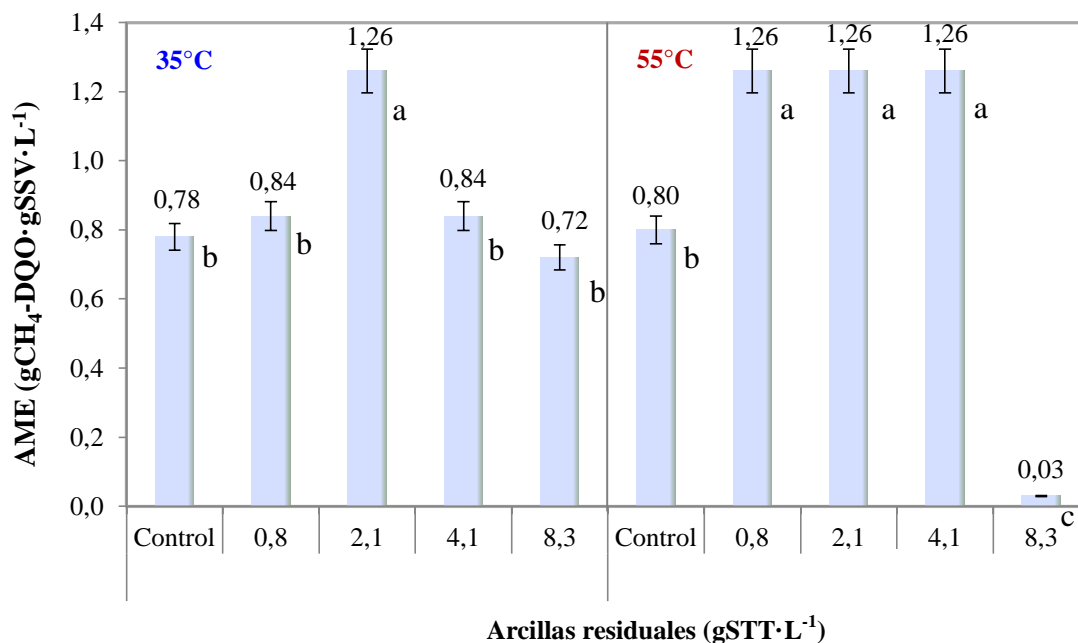
La digestión anaerobia de las arcillas residuales resultantes del proceso de purificación de aceites extraídos del petróleo, utilizando el inóculo adaptado a estiércol porcino, mostró que no es posible la biodegradación de estas como monosustrato, pues la producción de metano en cada botella fue igual e incluso inferior a la del control (inóculo sin sustrato). Por esta razón, las arcillas fueron consideradas en este estudio como aditivo inorgánico y no como materia orgánica aplicada.

Con la adición de arcillas a la codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz (36,6 - 10,86 gSTV·L<sup>-1</sup>, respectivamente), la AME mostró el mismo comportamiento gaussiano descrito para la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz. En condiciones mesofílicas se obtuvo un máximo de AME cuando se empleó 2,1 gSTT·L<sup>-1</sup> de arcillas, cuyo valor fue significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a los obtenidos con el resto de las concentraciones ensayadas (Fig. 3.3). Por el contrario, en condiciones termofílicas se obtuvieron altos valores de AME a las concentraciones de arcillas de 0,8; 2,1 y 4,1 gSTT·L<sup>-1</sup>, los cuales fueron significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a los alcanzados en el control y cuando se utilizó una concentración de arcillas de 8,3 gSTT·L<sup>-1</sup>.

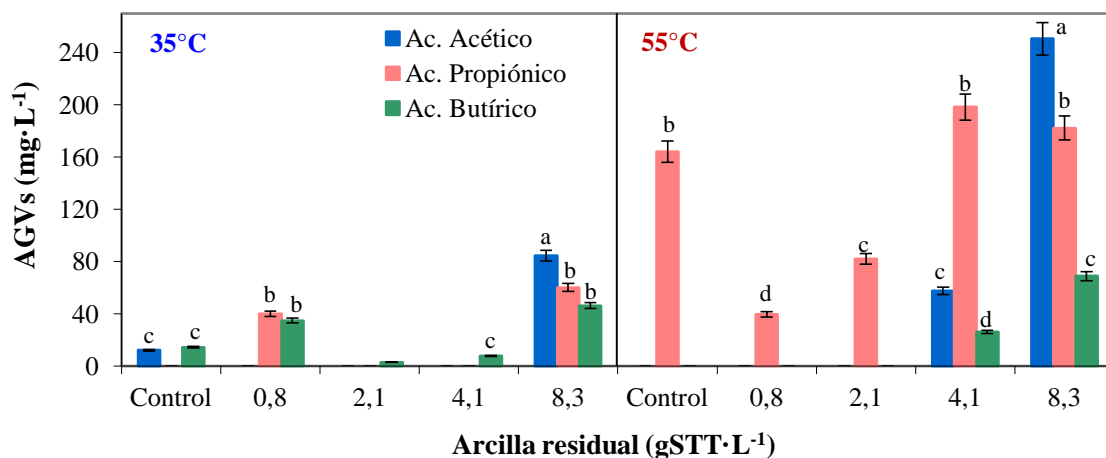
A pesar de los altos valores de AME (1,2 gCH<sub>4</sub>-DQO·gSV<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) alcanzados con la adición de arcillas, en ambas condiciones de temperatura, los rendimientos de metano fueron similares a los obtenidos sin la adición de estas (codigestión de estiércol porcino y paja de arroz), incluso inferiores en condiciones termofílicas (Tabla 3.3).

En cuanto a la acumulación de ácidos grasos volátiles, medida al final de los experimentos, se detectaron bajos niveles en condiciones mesofílicas, principalmente en los sistemas que contenían 2,1 y 4,1 gSTT·L<sup>-1</sup> (Fig. 3.4). En condiciones termofílicas, se notó una mayor acumulación de estos ácidos, sobre todo de propiónico, el cual fue detectado en todos los sistemas de codigestión. En el control los niveles de ácido propiónico acumulados superaron los 160 mg·L<sup>-1</sup> en correspondencia con la baja producción de metano observada (Tabla 3.3). En los sistemas de codigestión donde se adicionaron 8,3 gSTT·L<sup>-1</sup> de arcillas, se alcanzaron concentraciones altas de ácidos grasos volátiles, (en condiciones termofílicas, se superaron los 500 mg·L<sup>-1</sup>), que se corresponde con la baja AME obtenida.

El análisis de algunos parámetros físico-químicos (Tabla 3.3) indicaron que en la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz con la adición de las arcillas a bajas concentraciones (0,8 - 4,1



**Fig. 3.3** Actividad metanogénica específica durante la adición de 0,8; 2,1; 4,1 y 8,3 gSTT·L<sup>-1</sup> de arcilla residual a la codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz, en condiciones mesofílicas (35 °C) y termofílicas (55 °C). Letras diferentes significan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), entre las actividades metanogénica, según la prueba de Duncan aplicada. Control: botellas inoculadas con estiércol porcino y paja de arroz en la misma relación de concentración de 36,6-10,86 gSTV·L<sup>-1</sup>, respectivamente. Cada condición de concentración de arcilla residual fue ensayada con tres repeticiones.



**Fig. 3.4** Concentración de ácidos grasos volátiles al final de la codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz con 0,8; 2,1; 4,1 y 8,3 gSTT·L<sup>-1</sup> de arcilla residual, en condiciones mesofílicas (35 °C) y termofílicas (55 °C). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), entre la concentración de cada ácido, según la prueba de Duncan aplicada. Control: botellas inoculadas con estiércol porcino y paja de arroz en la misma relación de concentración de 36,6-10,86 gSTV·L<sup>-1</sup>, respectivamente. Cada concentración de los ácidos grasos volátiles representa la media de tres repeticiones.

gSTT·L<sup>-1</sup>), las remociones de sólidos volátiles fueron altas (> 87 %, en condiciones mesofílicas y > 81 %, en condiciones termofílicas). La relación de alcalinidades ( $\alpha < 0,5$ ) mostró la inhibición en el sistema que contenía 8,3 gSTT·L<sup>-1</sup> de arcillas residuales en condiciones termofílicas, donde se obtuvo el valor más bajo de pH (6,1).

**Tabla 3.3** Parámetros físico-químicos al finalizar la codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz en régimen discontinuo, con la adición de diferentes concentraciones de arcilla residual (0,8; 2,1; 4,1 y 8,3 gSTT·L<sup>-1</sup>), en condiciones mesofílicas (35 °C) y termofílicas (55 °C). Los valores representan la media de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

Parámetros	35 °C				55 °C			
	0,8	2,1	4,1	8,3	0,8	2,1	4,1	8,3
Arcilla residual (gSTT·L <sup>-1</sup> )								
STT (g·L <sup>-1</sup> )	6,7±0,8	7,4±0,6	8,6±0,9	10,2±1,0	8,3±0,8	8,9±1,0	9,6±0,9	10,2±1,1
STV (g·L <sup>-1</sup> )	2,4±0,8	2,9±0,6	2,9±0,9	4,2±1,0	3,6±0,8	3,8±1,0	3,7±0,9	4,1±1,1
STF (g·L <sup>-1</sup> )	4,3±0,8	4,5±0,6	5,7±0,9	6,0±1,0	4,7±0,8	5,1±1,0	5,9±0,9	6,1±1,1
Alcalinidad (gCaCO <sub>3</sub> ·L <sup>-1</sup> )	3,6±0,8	3,9±0,7	3,8±0,8	2,8±0,8	3,8±0,4	3,7±0,1	3,7±0,3	2,4±0,9
Relación de alcalinidades ( $\alpha$ )	0,8±0,0	0,8±0,0	0,8±0,0	0,6±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,5±0,1
pH final	7,6±0,0	7,5±0,2	7,7±0,1	7,2±0,1	8,0±0,1	7,6±0,1	7,8±0,0	6,1±0,1
Remoción SV (%)	87,5±5,0	86,0±3,3	87,1±6,1	75,3±4,2	81,2±3,9	81,6±4,2	83,4±5,2	42,6±6,4
CH <sub>4</sub> (mL <sub>N</sub> ·gSV <sup>-1</sup> )	394±13,3	424±11,0	361±14,2	290±36,8	313±30,1	290±14,9	269±12,1	0,0±0,0

*STT: Sólidos totales*

*STV: Sólidos volátiles*

*STF: Sólidos fijos*

*Remoción de SV: Remoción de sólidos volátiles*

### 3.1.4 Capacidad de adsorción de las arcillas

Para corroborar las propiedades adsorbentes de las arcillas residuales utilizadas en este estudio, se realizó un ensayo en discontinuo para determinar los coeficientes de adsorción según la Isoterma de Freundlich, al poner en contacto diferentes concentraciones de arcillas con concentraciones conocidas de iones amonio en disolución, como se describe en Materiales y Métodos. La tabla 3.4 muestra los coeficientes obtenidos para cada concentración de arcilla residual empleada, con su respectivo ajuste al modelo determinado por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ).

El mejor comportamiento de la arcilla como adsorbente lo muestra para las concentraciones entre 50 y 93 g·L<sup>-1</sup> de materia fresca de arcilla añadida, donde se obtiene el mejor ajuste al modelo que describe la ecuación o isoterma de Freundlich con coeficientes de adsorción,  $K_f$  iguales a 1,43 y 1,82 respectivamente (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4** Propiedades adsorbentes de las arcillas residuales. Coeficiente de Freundlich ( $K_f$ ) y capacidad de adsorción de la arcilla ( $n$ ) con ajuste a la ecuación logarítmica (coeficiente de correlación  $R^2$ ).

Concentración de arcillas (g·L <sup>-1</sup> )	$K_f$	$n$	$1/n$	$R^2$
20	1,12 ± 0,1	0,67 ± 0,1	1,49	0,87
50	1,43 ± 0,0	1,29 ± 0,0	0,78	0,99
93	1,82 ± 0,0	2,98 ± 0,0	0,34	0,96
172	0,73 ± 0,1	1,79 ± 0,1	0,56	0,70

Además, la intensidad de la isoterma en ambos casos (1,29 y 2,98, respectivamente) demuestran la fortaleza de la unión adsorbente-adsorbido (Tabla 3.4). Sin embargo, se observa que hay falta de ajuste del modelo cuando se utilizan bajas concentraciones de arcillas (20 g·L<sup>-1</sup> de materia fresca de arcilla añadida,  $R^2 = 0,87$ ) o muy altas concentraciones de esta (172 g·L<sup>-1</sup> de materia fresca de arcilla añadida,  $R^2 = 0,70$ ).

La capacidad de adsorción de las arcillas evaluadas, a 37 °C mediante la isoterma de Freundlich puede representarse por la siguiente ecuación:

$$G = 1,43 C_{eq}^{0,78} \quad \text{Ec. 3.1}$$

## 3.2 Optimización de la actividad metanogénica específica en la codigestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales

### 3.2.1 Diseño de los experimentos.

Como se describe en el capítulo anterior, se evaluaron 16 variantes de mezcla donde la actividad metanogénica específica (AME) se utilizó como variable dependiente, tanto para obtener la mejor variante de mezcla (en cuanto a concentración de sustrato) como para analizar el efecto de



interacción entre los sustratos (efecto de la tipología de sustrato), en cada condición de temperatura (mesofílica y termofílica).

El diseño de las variantes de mezcla, como muestra la matriz del diseño de los experimentos sugerido por el software, en términos de concentración de sustrato (Tabla 3.5), permitió trabajar en un rango de concentraciones cercanas a las evaluadas en los ensayos en discontinuo, tanto para el sustrato paja de arroz (7,0 - 17,6 gSTV·L<sup>-1</sup>) como para las arcillas (0,8 - 8,3 gSTT·L<sup>-1</sup>), donde se utilizaron, además, concentraciones inferiores de estiércol (9,1 - 36,6 gSTV·L<sup>-1</sup>) para evitar la inhibición en condiciones termofílicas.

**Tabla 3.5** Variantes de mezcla de sustratos y arcilla residual según el diseño factorial 2<sup>3</sup> a los niveles de concentración bajo, medio y alto.

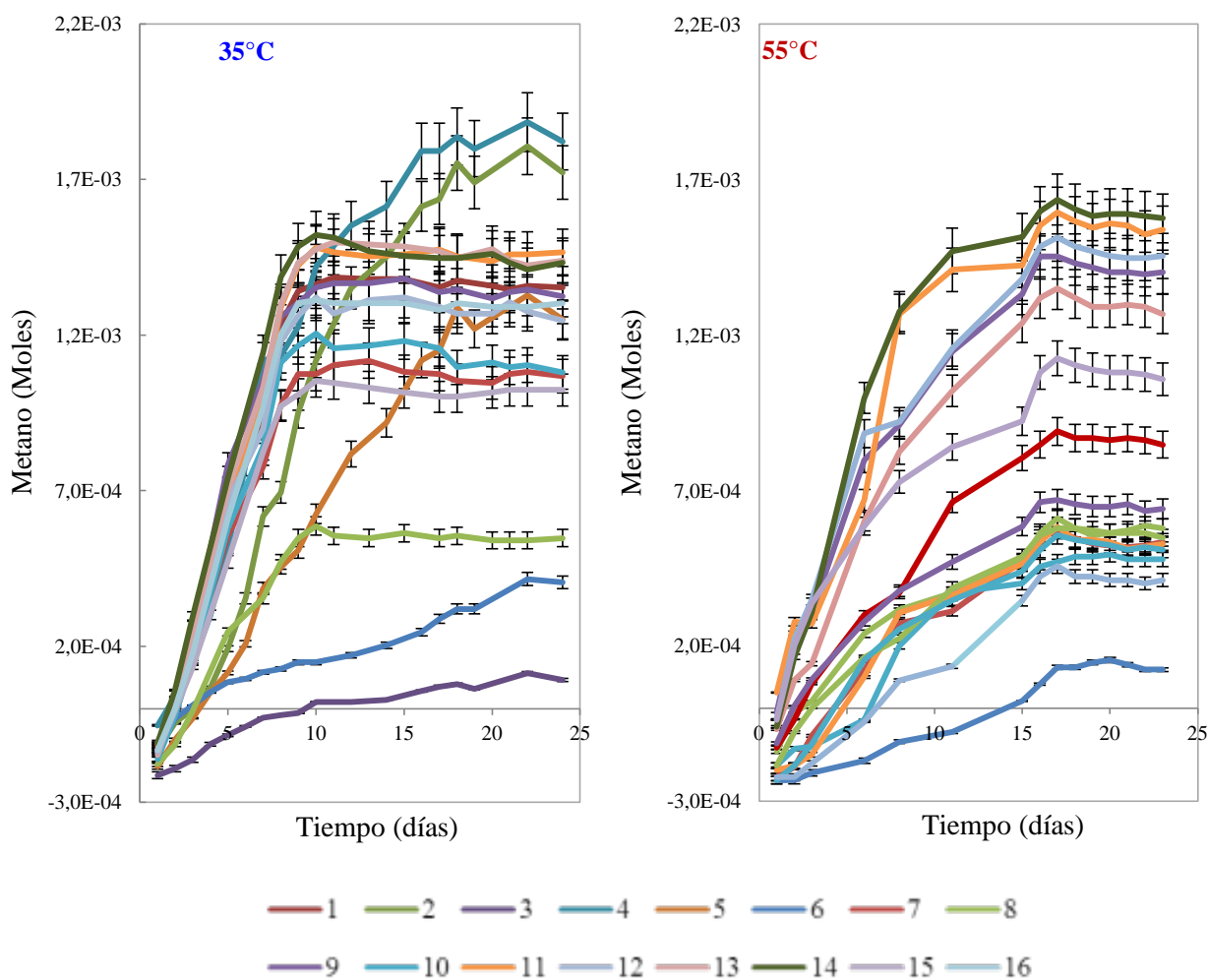
No.	Estiércol porcino (gSTV·L <sup>-1</sup> )	Paja de arroz (gSTV·L <sup>-1</sup> )	Arcilla Residual (gSTT·L <sup>-1</sup> )
1	9,10	7,00	0,80
2	9,10	7,00	8,30
3	9,10	17,60	0,80
4	9,10	17,60	8,30
5	36,60	7,00	0,80
6	36,60	7,00	8,30
7	36,60	17,60	0,80
8	36,60	17,60	8,30
9	9,10	12,30	4,55
10	36,60	12,30	4,55
11	22,85	7,00	4,55
12	22,85	17,60	4,55
13	22,85	12,30	0,80
14	22,85	12,30	8,30
15	22,85	12,30	4,55
16	22,85	12,30	4,55

### 3.2.2 Obtención de metano durante la codigestión anaerobia de estiércol, paja y arcillas en mesofilia y termofilia

Los resultados mostraron un perfil diferente en la formación de metano en ambas temperaturas (Fig. 3.5), lo que demuestra el desigual comportamiento de la comunidad procariota formadora de metano cuando se varían las concentraciones de cada cosustrato. Se notó una inhibición de la metanogénesis, cuando las concentraciones de estiércol y arcillas fueron máximas y mínima la de

paja (mezcla 6). En condiciones mesofílicas se inhibió también la formación de metano en la mezcla 3 (Fig. 3.5).

Los parámetros físico-químicos: pH entre 7,4 y 8,1, alcalinidad entre 2,98 y 3,80 g CaCO<sub>3</sub>·L<sup>-1</sup>,  $\alpha$  entre 0,67 y 0,84 y la remoción de sólidos volátiles entre 72 y 85 %, indicaron estabilidad en los procesos, aunque para las mezclas 6 de ambas temperaturas, la mezcla 3 de condiciones mesofílicas y la mezcla 16 de condiciones termofílicas, se observó una inhibición de la metanogénesis.



**Fig. 3.5** Producción de metano durante la codigestión anaerobia de las mezclas de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales a 35 °C y 55 °C. Las mezclas se determinaron según el diseño factorial 2<sup>3</sup> y cada factor (sustrato) se evaluó a niveles de concentración bajo, medio y alto, con tres repeticiones por mezcla a ensayar.

### 3.2.3 Modelo de regresión y evaluación estadística

Los datos experimentales de actividad metanogénica específica (AME), obtenidos según la curva de metano de cada condición de mezcla (Fig. 3.5), se ajustaron a una ecuación polinomial de segundo orden mediante un análisis de regresión múltiple. Las ecuaciones obtenidas fueron las siguientes para cada condición de temperatura:

$$SMA = 1,2859 + 0,067 \cdot A + 0,053 \cdot B + 0,075 \cdot C - 0,4588 \cdot A^2 - 0,1988 \cdot A \cdot B - 0,1538 \cdot A \cdot C - 0,1088 \cdot B^2 + 0,2313 \cdot B \cdot C - 0,0388 \cdot C^2 \quad \text{Ec. 3.2 (35°C)}$$

$$SMA = 1,3524 - 0,087 \cdot A - 0,066 \cdot B - 0,008 \cdot C - 0,5436 \cdot A^2 + 0,0588 \cdot A \cdot B + 0,2963 \cdot A \cdot C - 0,0986 \cdot B^2 + 0,0038 \cdot B \cdot C - 0,0786 \cdot C^2 \quad \text{Ec. 3.3 (55°C)}$$

Los valores estimados por el modelo y los valores de AME obtenidos experimentalmente en las diferentes concentraciones de mezcla se muestran en la tabla 3.6. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si el modelo cuadrático utilizado fue adecuado. Este análisis mostró que los modelos cuadráticos fueron significativos con un nivel de confianza del 95 % ( $F_{\text{model } 35^\circ\text{C}} = 25,61$ ; valor-p = 0,0041 y  $F_{\text{model } 55^\circ\text{C}} = 9,24$ ; valor-p = 0,0068). Además el valor-F calculado ( $F_{\text{cal}} = MC_{\text{modelo}}/MC_{\text{error}}$ ) resultó mayor que el tabulado ( $F_{\alpha; GL(n-GL+1)} = F_{0,05; 9,6} = 4,1$ ), lo que indicó que el modelo fue adecuado.

El ANOVA mostró, que en condiciones mesofílicas, el efecto del componente cuadrático del estiércol y el efecto de las interacciones entre los cosustratos estiércol y paja; estiércol y arcillas; paja y arcillas, fueron altamente significativos sobre la AME. El efecto lineal de la arcilla fue significativo, pero con un valor menor (valor-p = 0,0495) mientras que la adición de paja no mostró un efecto significativo sobre la AME. En condiciones termofílicas, se obtuvo un efecto altamente significativo del componente cuadrático de estiércol y de la interacción estiércol y arcilla (valores-p de 0,0020 y 0,0026 respectivamente); sin embargo el efecto de los componentes lineales y cuadráticos de la arcilla y la paja, así como el efecto de las demás interacciones, no fueron significativos sobre la AME.

La calidad del ajuste del modelo fue controlado por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). En condiciones mesofílicas ( $R^2 = 0,97463$ ), sólo el 2,54 % de la variación total no pudo ser explicada por el modelo de regresión, pero en condiciones termofílicas ( $R^2 = 0,9327$ ), el 6,73 % de la

variación total no pudo ser explicada por el modelo. No obstante, ambos modelos de regresión resultaron adecuados para estimar los datos experimentales. Los valores de  $R^2$  y el coeficiente ajustado ( $R^2_{adj}$ ) respectivos resultaron próximos, ( $R^2_{adj} = 0,9366$  para condiciones mesofílicas y  $R^2_{adj} = 0,8317$  para condiciones termofílicas). En adición, la baja dispersión de los valores de AME obtenidos y los estimados alrededor de la línea diagonal corroboraron la alta calidad del ajuste del modelo en ambas condiciones de temperatura.

**Tabla 3.6** Actividad metanogénica específica estimada según el modelo bifactorial  $2^3$  y la observada experimentalmente, a las diferentes concentraciones de mezcla indicadas en tabla 3.5.

No.	AME (35 °C)			AME (55 °C)		
	Observada	Estimada	Desviación estándar	Observada	Estimada	Desviación estándar
1	0,27	0,36	0,09	1,11	1,15	0,12
2	0,42	0,36	0,12	0,61	0,54	0,10
3	0,42	0,40	0,14	1,02	0,89	0,10
4	1,26	1,32	0,11	0,29	0,29	0,09
5	1,26	1,20	0,14	0,25	0,27	0,10
6	0,56	0,58	0,14	0,69	0,84	0,14
7	0,38	0,45	0,12	0,15	0,25	0,11
8	0,84	0,75	0,08	0,85	0,83	0,14
9	0,84	0,76	0,01	0,74	0,90	0,11
10	0,84	0,89	0,13	0,96	0,72	0,13
11	1,12	1,12	0,14	1,45	1,32	0,12
12	1,26	1,23	0,14	1,14	1,19	0,12
13	1,26	1,17	0,11	1,31	1,28	0,08
14	1,26	1,32	0,13	1,32	1,27	0,01
15	1,26	1,29	0,18	1,27	1,35	0,21
16	1,26	1,29	0,18	1,27	1,35	0,21

También, el estadígrafo Durbin-Watson fue cercano a 2 en ambos casos (2,3823; valor-p = 0,1623 en condiciones mesofílicas y 2,4736; valor-p = 0,1241 en termofílicas), cuya  $p > 0,05$ , indicó que no hubo indicios de correlación de serie entre los residuos y constituyó otra evidencia de la calidad de ajuste del modelo.

Para confirmar si habían diferencias significativas entre los valores de AME obtenidos experimentalmente y los estimados por el modelo, se analizó el estadístico Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). En ambas condiciones de temperatura se obtuvo que los valores de  $\chi^2$  calculados ( $\chi^2_{cal\ 35^\circ C} = 0,085$ ;  $\chi^2_{cal\ 55^\circ C} = 1,458$ ) fueron menores que el valor de  $\chi^2$  tabulado ( $\chi^2_{tab(\alpha; df-1)} = \chi^2_{tab(0,05; 15)} = 7,261$ ),

por tanto, no hubo diferencias significativas entre los valores de AME obtenidos y los estimados por el modelo. Este estadígrafo también corrobora la adecuación del modelo para optimizar la variable respuesta (AME).

#### ***3.2.4 Efectos de los componentes del modelo y sus interacciones sobre la actividad metanogénica específica***

Los valores de AME en las diferentes variantes de mezcla, muestran un amplio rango en ambas condiciones de temperatura, de 0,27 a 1,26  $\text{g}_{\text{CH}_4\text{-DQO}} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  en condiciones mesofílicas y de 0,15 a 1,45  $\text{g}_{\text{CH}_4\text{-DQO}} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  en condiciones termofílicas. Los resultados indican que la AME fue fuertemente afectada por las variables seleccionadas en este estudio.

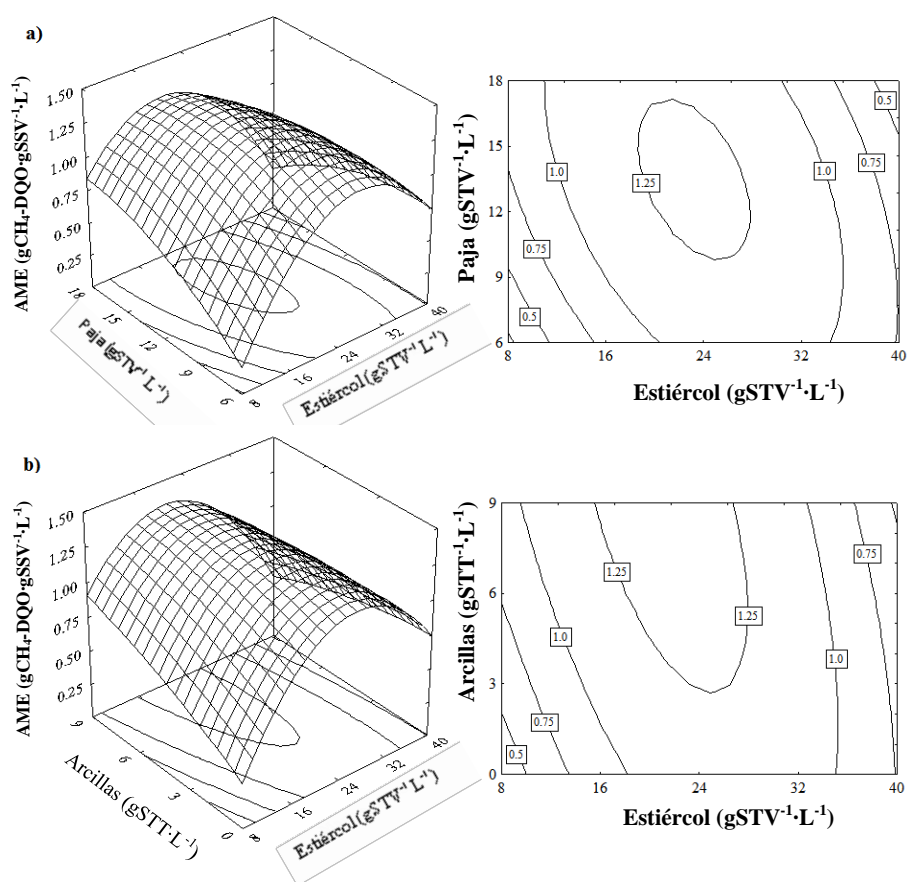
La trascendencia de cada coeficiente, fue analizada mediante el análisis del t-Student (valor-t), con su respectivo valor-p. El valor-t, que representa la razón entre el efecto del parámetro estimado y su desviación estándar, mostró que en condiciones mesofílicas el efecto lineal de las arcillas, el efecto cuadrático del estiércol y las interacciones de primer orden entre el estiércol porcino y la paja de arroz, entre el estiércol porcino y las arcillas residuales y entre las paja de arroz y las arcillas residuales, resultaron los efectos más significativos sobre la AME. Sin embargo, en condiciones termofílicas, el valor-t, indicó que sólo los coeficientes de la interacción entre el estiércol porcino y la paja de arroz y entre el estiércol porcino y las arcillas residuales, fueron significativos.

El porcentaje de contribución (PC), igualmente indicó la baja influencia de los sustratos por separado y el efecto positivo de la interacción entre estos, es decir de la codigestión. En condiciones mesofílicas, la mayor contribución fue de la interacción entre los tres componentes ( $\text{PC}_{\text{tot.int.}} = 56,47 \%$ ), donde la interacción entre la paja de arroz y las arcillas residuales tuvo la mayor contribución (25,89 %).

El componente cuadrático de estiércol también tuvo una gran contribución ( $\text{PC}_{\text{tot. cuad A}} = 35,72 \%$ ). En condiciones termofílicas, la contribución total de los componentes cuadráticos y la de la interacción fue similar ( $\text{PC}_{\text{tot. cuad}} = 49,14 \%$  y  $\text{PC}_{\text{tot.int}} = 43,68 \%$ , respectivamente) además, el componente cuadrático de estiércol y la interacción entre el estiércol porcino y las arcillas residuales ocuparon casi la totalidad del porcentaje de contribución (46,63 y 42,02 %, respectivamente).

### 3.2.5 Superficie de respuesta tridimensional (3D) y sus contornos en dos dimensiones

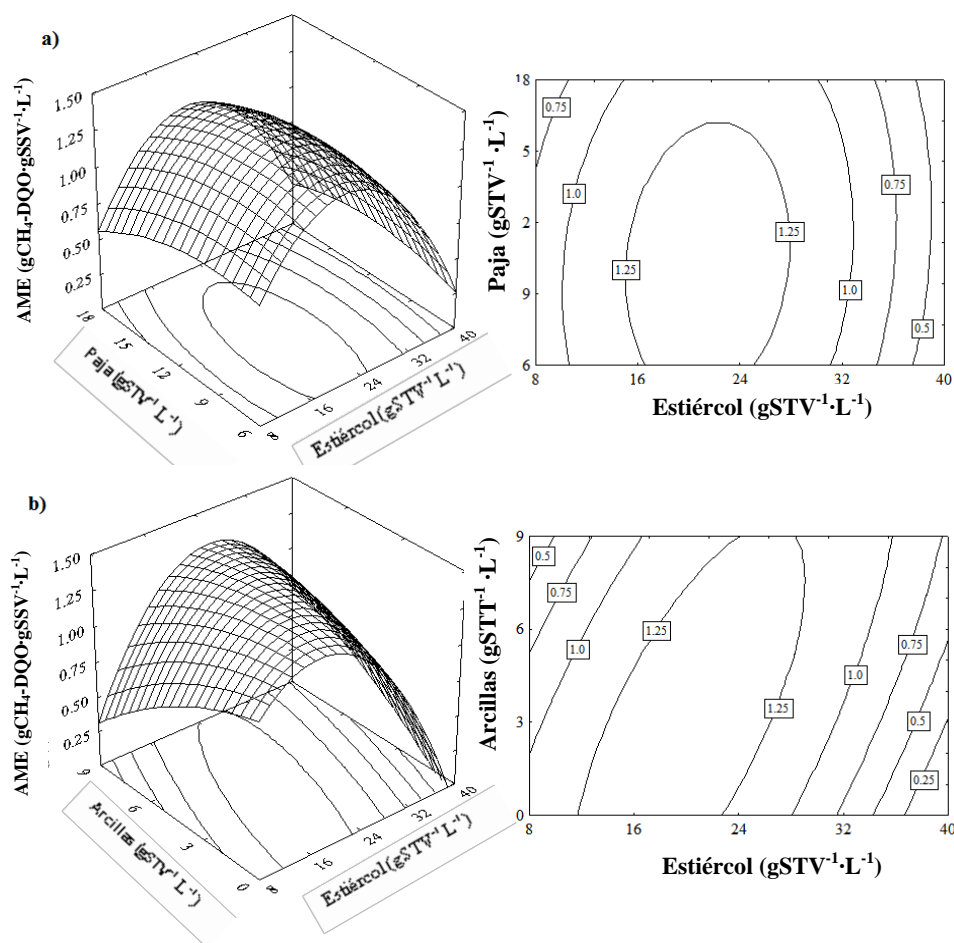
La naturaleza no lineal de las superficies de respuesta obtenidas y la de sus respectivos contornos, demostraron la existencia de una interacción considerable entre los sustratos evaluados. En otras palabras, no existió una relación lineal entre las variables seleccionadas, lo cual corrobora la adecuación del modelo de segundo orden utilizado para estimar los valores de AME. En ambas condiciones de temperatura, se observó que el estiércol porcino influye notablemente sobre la AME (Fig. 3.6a, 3.6b, 3.7a y 3.7b). Cuando las concentraciones de estiércol porcino fueron las extremas (9,1 ó 36,6 gSTV·L<sup>-1</sup>) se obtuvieron menores valores de AME, en comparación con las obtenidas con la concentración media (22,85 gSTV·L<sup>-1</sup>) en ambas temperaturas.



**Fig. 3.6** Superficies de respuesta 3D y sus respectivas gráficas de contornos 2D que muestran el efecto de la interacción de dos sustratos sobre la AME, manteniendo el tercero a nivel fijo, en condiciones mesofílicas.

En cuanto a la paja de arroz, no se obtuvo un efecto significativo sobre la AME. En condiciones mesofílicas el efecto de la interacción entre el estiércol porcino y la paja de arroz a bajas

concentraciones, mostró muy poco efecto sobre la AME; sin embargo, al aumentar los niveles de paja, se observó un incremento en la AME (Fig. 3.6a). En condiciones termofílicas, por el contrario, un ligero decremento fue observado en la AME, al aumentar la concentración de paja de arroz (Fig. 3.7a).



**Fig. 3.7** Superficies de respuesta 3D y sus respectivas gráficas de contornos 2D que muestran el efecto de la interacción de dos sustratos sobre la AME, manteniendo el tercero a nivel fijo, en condiciones termofílicas.

La adición de arcillas sí tuvo un efecto apreciable sobre la AME, sobre todo en su interacción con el estiércol porcino (Fig. 3.6b y 3.7b). En condiciones mesofílicas, se obtuvo un aumento en la AME al aumentar la concentración de arcillas a niveles bajos de estiércol. Por el contrario, en condiciones termofílicas, al aumentar la concentración de arcilla, manteniendo niveles bajos de estiércol, se reduce la AME. Sin embargo, hay un efecto positivo de la arcilla, cuando se utilizan niveles altos de estiércol porcino, lo que indica que las arcillas residuales reducen el efecto

inhibitorio de las altas concentraciones de estiércol porcino sobre la AME.

Cuando se utilizaron concentraciones bajas de paja de arroz y de arcillas residuales se obtuvo una respuesta similar en ambas temperatura. Sin embargo, a altas concentraciones de paja de arroz y de arcillas, en condiciones mesofílicas, se obtuvo una AME superior a  $1,5 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ; mientras que, en condiciones termofílicas, los valores fueron similares en toda la superficie y menores que  $1,5 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ .

### ***3.2.6 Condiciones óptimas para maximizar la AME***

El modelo polinomial de segundo orden obtenido, se utilizó para determinar las condiciones que maximizan los valores de AME y fue ajustado mediante el método de mínimos cuadrados. Sobre la base del análisis del algoritmo de optimización se puede inferir que el modelo de segundo orden se aproxima adecuadamente a la superficie real.

En condiciones mesofílicas, el comportamiento no lineal de la respuesta estimada, a los niveles de estiércol evaluados, mostró el máximo de AME ( $1,536 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) a  $18,73 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  de estiércol; pero las gráficas de paja y arcillas mostraron sus máximos de AME ( $1,31 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a concentraciones de  $17,6 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $8,3 \text{ gSTT}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Por tanto, la combinación óptima sería  $28,35 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  de estiércol,  $17,6 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  de paja y  $8,3 \text{ gSTT}\cdot\text{L}^{-1}$  de arcillas, con un nivel de confianza de 95 %. En condiciones termofílicas, la combinación de concentraciones que resultó en la máxima AME fue a  $20,1 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  de estiércol,  $10,18 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$  de paja y  $3,05 \text{ gSTT}\cdot\text{L}^{-1}$  de arcillas, para valores de AME máximos de  $1,38 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , en el rango de  $1,19$  a  $1,57 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , con un nivel de confianza del 95 %.

### ***3.2.7 Validación de los modelos de optimización***

Para validar la adecuación de los modelos propuestos y predecir la AME en la codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas residuales, se realizaron nuevos experimentos (con tres repeticiones) con la utilización de las concentraciones óptimas antes determinadas. En condiciones mesofílicas, se observó una fase de latencia de 10 días, pero mostró una AME promedio de  $1,23 \pm 0,41 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (valor medio de AME  $\pm$  desviación estándar) mientras que, en condiciones termofílicas, la fase de latencia fue de 4 días y los valores promedio de AME fueron de  $1,35 \pm 0,26 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ . Además, la concentración de ácidos grasos volátiles ( $< 150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), el pH (6,9 - 8,0) y la  $\alpha$  (0,65 - 0,83),



indicaron la estabilidad de los procesos en cada sistema.

Las AME obtenidas no mostraron diferencias significativas entre cada condición de temperatura. En condiciones mesofílicas, el valor de t-Student calculado ( $t_{\text{cal}} = 0,3038$ ) fue menor que el tabulado ( $t_{\text{tab}} (0,05; 4) = 2,1318$ ); y la probabilidad calculada ( $p\text{-valor}_{\text{cal}} = 0,7765$ ), indicó que no hubo diferencias significativas entre los valores de AME observados y los óptimos predichos por el modelo. En condiciones termofílicas, el valor de t-Student ( $t_{\text{cal}} = 0,1655$ ) fue también menor que el tabulado ( $p\text{-valor}_{\text{cal}} = 0,8766$ ), lo que evidencia que tampoco existieron diferencias significativas entre los valores de AME observados y los predichos por el modelo.

### 3.3 Estructura de la comunidad microbiana desarrollada con la codigestión de los tres sustratos en ensayos discontinuos

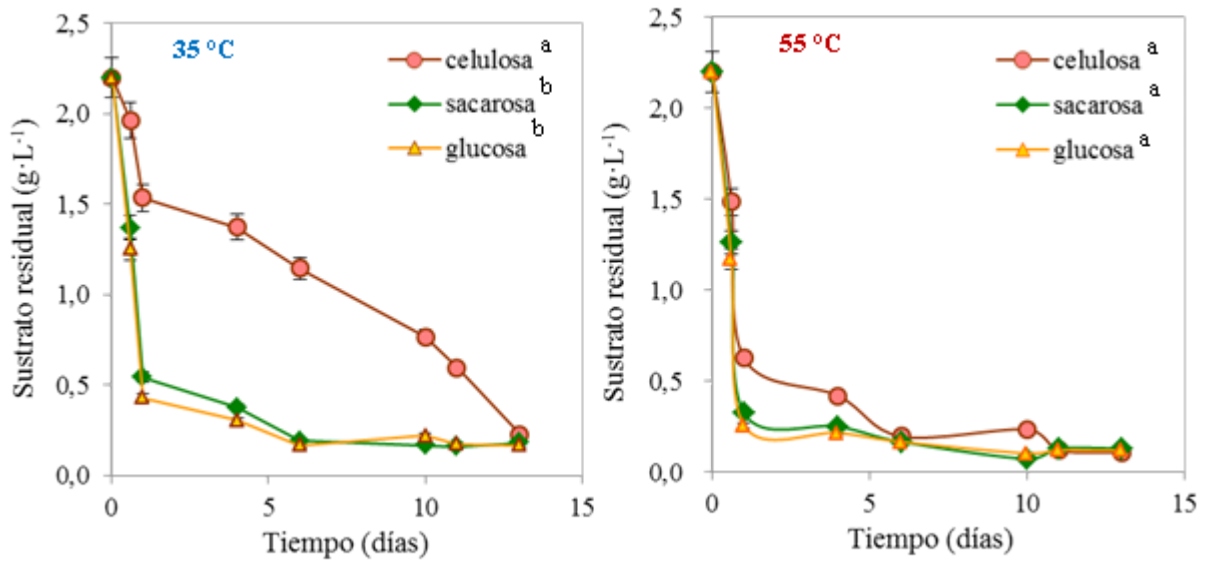
#### 3.3.1 Métodos microbiológicos dependientes de cultivo

La microbiota generada durante la codigestión anaerobia de los tres sustratos a las concentraciones óptimas fue re-inoculada en medios de crecimiento que contenían sustratos específicos. Se apreció el consumo de celulosa, sacarosa y glucosa por bacterias hidrolíticas y fermentativas según se muestra en la Fig. 3.8. En condiciones termofílicas, se favoreció la hidrólisis de la celulosa, respecto a las condiciones mesofílicas; de hecho, la actividad hidrolítica de la microbiota mesófila frente a la celulosa no superó los  $3 \text{ gDQO} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (Tabla 3.7).

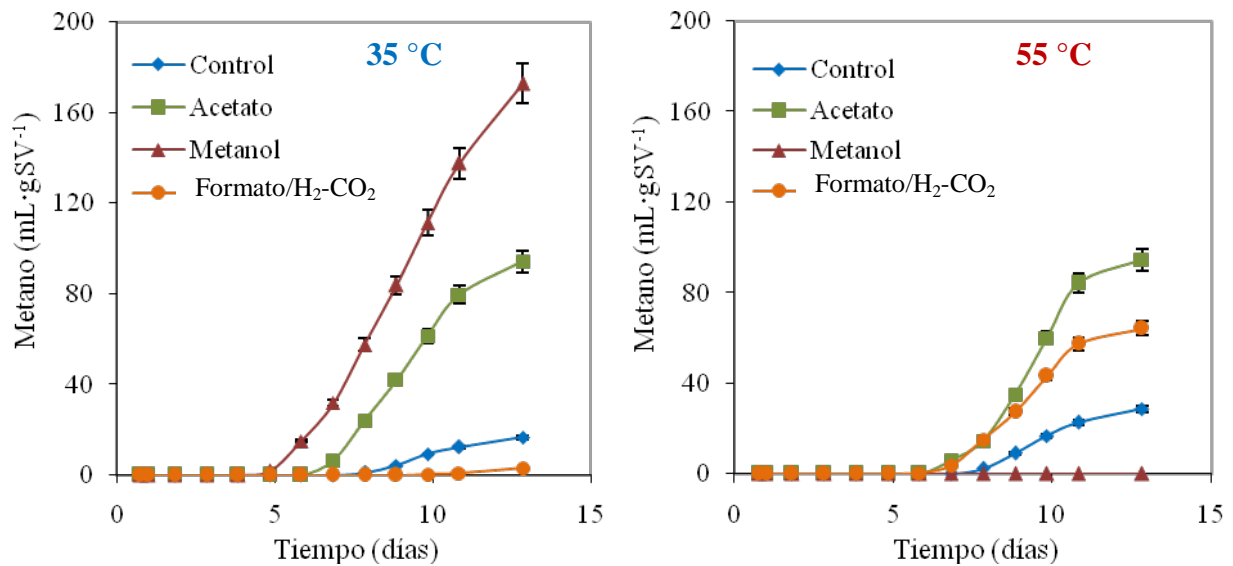
**Tabla 3.7** Actividades enzimáticas celulolítica, sacarolítica y glucolítica de bacterias procedentes de la digestión anaerobia en condiciones mesofílicas y termofílicas.

Temperatura	Actividad Enzimática ( $\text{gDQO} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )		
	Celulolítica	Sacarolítica	Glucolítica
Mesofilia	$2,9 \pm 0,2$	$7,4 \pm 1,2$	$16,5 \pm 2,2$
Termofilia	$13,8 \pm 2,3$	$8,0 \pm 1,3$	$17,2 \pm 2,9$

Para el caso de los grupos acidogénicos y metanogénicos, se determinó la AME. En condiciones mesofílicas, se obtuvo mayor producción de metano en el sistema que contenía metanol, seguida por la producción de metano del sistema con acetato de sodio (Fig. 3.9). Por el contrario, en condiciones termofílicas se obtuvo una producción de metano considerable en el sistema que contenía la mezcla de formato y  $\text{H}_2\text{-CO}_2$ . En ambas condiciones de temperatura también se



**Fig. 3.8** Consumo de diferentes sustratos por los grupos tróficos presentes en el proceso de digestión anaerobia, en condiciones mesofílicas (35 °C) y termofílicas (55 °C). Letras diferentes significan diferencias significativas entre la capacidad de la microbiota para consumir cada sustrato, según la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ), con tres repeticiones por variable a ensayar.

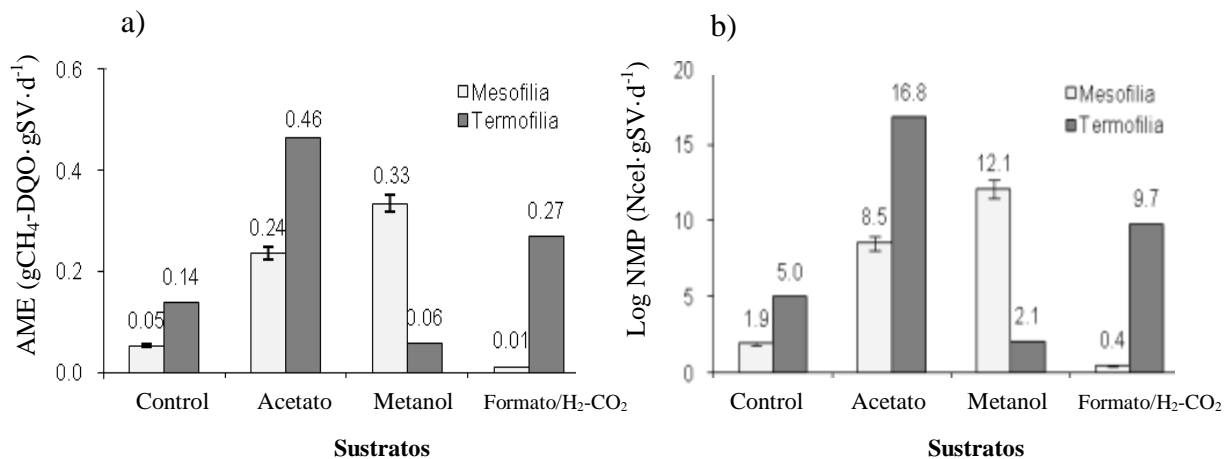


**Fig. 3.9** Producción de metano por los grupos de archaeas metanógenas presentes en el proceso de digestión anaerobia, en condiciones mesofílicas (35 °C) y termofílicas (55 °C) a partir de los sustratos: acetato, metanol y una mezcla de formato/H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>. Se ensayó con tres repeticiones por sustrato evaluado. Control: mezcla de ácidos grasos volátiles (en la relación 2:1:1).

observó crecimiento en el acetato de sodio.

En adición, a partir de las curvas de producción de metano (Fig. 3.9) se determinaron los respectivos valores de AME frente a los diferentes sustratos específicos ensayados (Fig. 3.10a) y posteriormente estos valores fueron utilizados para estimar el número más probable (NMP) de células, en los sistemas con cada sustrato específicos, según la correspondencia que existe entre la AME y el *log NMP*.

En general, se obtuvieron diferencias entre el NMP de la microbiota mesófila y la termófila desarrolladas con la codigestión de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales, lo que indica el efecto de la temperatura en la estructura de la comunidad procariota relacionada con la obtención de metano (Fig. 3.10b).



**Fig. 3.10** Actividad metanogénica específica (a) y Número más probable de células (b) a expensas de diferentes sustratos en mesofilia y termofilia. Control: mezcla de ácidos grasos volátiles en la relación 2:1:1.

### 3.3.2 Métodos moleculares independientes de cultivo

Las microbiota mesófila y termófila desarrollada con la codigestión de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales en los ensayos en discontinuo, fueron también analizadas por métodos moleculares, mediante el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos terminales de restricción (T-RFLP, del inglés). Esto permitió detectar la diversidad de la comunidad procariota, así como la dinámica de esta con la adición del cosustrato paja y las arcillas residuales.

La diversidad obtenida en las muestras inicial y final (después de 21 días de codigestión de estiércol paja y arcillas) demostró que existe una tendencia al predominio de ciertas especies con la codigestión (Tabla 3.8). La riqueza de especies ( $Rr$ ) fue similar, tanto en la muestra inicial, como en la muestra final; sin embargo, según el índice de Jaccard ( $J'$ ), se obtuvo que en mesofilia el 48,4 % de las especies son similares en ambas muestras inicial y final, a diferencia del resultado en termofilia, donde se obtuvo que sólo el 18,8 % de similitud entre la muestra inicial y final, resultados que demuestran el efecto de la temperatura en la asimilación de estos cosustratos.

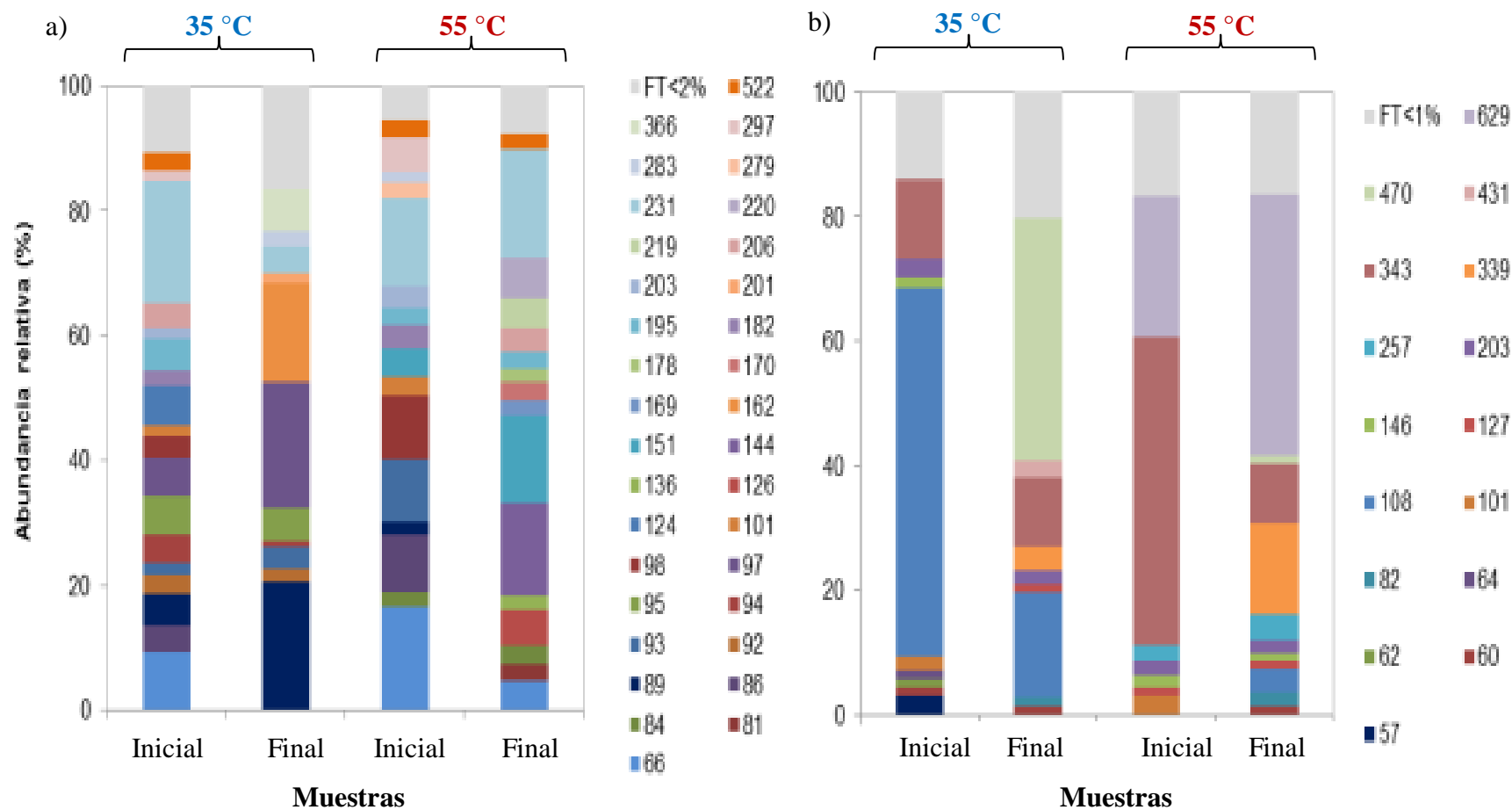
Es de notar que existe un 35,5 % de similitud entre las muestras iniciales de la microbiota mesófila y la termófila, lo cual puede ser esperado, si se tiene en cuenta que ambos inóculos provienen del mismo ecosistema y fueron adaptados a cada condición de temperatura. No obstante, la estructura de la comunidad desarrollada en mesofilia, con la adición de los cosustratos (muestra final), es significativamente diferente a la desarrollada en termofilia, con solo un  $J' = 13,5$  %.

**Dominio Bacteria.** La mayor variedad de especies ( $Rr = 24$ ) se obtuvo en la muestra final que refleja la codigestión anaerobia de los tres sustratos, en mesofilia, aunque el índice de Shannon indicó que la diversidad fue mayor en las muestras iniciales, de ambas temperaturas (Tabla 3.8). La organización de la comunidad expresada como el índice de Equidad, tanto en las muestras iniciales, como en los sistemas de codigestión anaerobia, fue similar, sin embargo, sí se notaron diferencias entre cada temperatura.

**Tabla 3.8** Análisis de la diversidad y organización de la comunidad de bacterias presentes en la codigestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales, al inicio y al cabo de 21 días de incubación a las temperaturas de 35 °C y 55 °C.

Muestras	Temperatura (°C)	Riqueza de especies ( $Rr$ )	Índice de Shannon ( $H$ )	Índice de Equidad ( $H/H_{max}$ )	Varianza ( $Var H$ )
Inicial	35	22	2,46	0,80	0,10
Final	35	24	2,29	0,72	0,09
Inicial	55	20	2,70	0,90	0,11
Final	55	18	2,51	0,87	0,10

La abundancia relativa de los fragmentos de restricción terminales de las muestras iniciales de ambas condiciones de temperatura, mostraron el predominio de los fragmentos de 66, 98 y 231 pb (Fig. 3.11a). En las muestras finales que reflejan la codigestión de los tres sustratos, se notó



**Fig. 3.11** Abundancia relativa de los fragmentos de restricción terminales (FT) y sus tallas en pb, de bacterias (a) y archaeas (b), en la codigestion de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales. El proceso se llevó a cabo en discontinuo, en condiciones mesofílicas (35 °C) y termofílicas (55°C).

una tendencia (más acentuada en mesofilia) al predominio de ciertos grupos. En este sentido, se encontró mayor abundancia relativa de los fragmentos de 89, 97 y 162 pb en mesofilia; mientras que, en termofilia, aumentaron su abundancia los fragmentos de 144, 151 y 231 pb.

**Dominio Archaea.** No se determinaron los índices de diversidad, ni organización de la comunidad procariota ( $H$  y  $H/H_{max}$ ) debido al bajo número de especies obtenidas (entre 5 y 7).

En la muestra inicial de la temperatura mesofílica, predominaron los fragmentos de 108 pb, con un 59,21 % de abundancia relativa, también se destacaron los fragmentos de 343 pb (12,5 % de abundancia relativa) y otros fragmentos de 57 y 203 pb (Fig. 3.11b). En la muestra final, que refleja la codigestión anaerobia de los tres sustratos en mesofilia, se redujo el predominio de los fragmentos de 108 pb, y se favorecieron otras especies (fragmentos de 431 y 470 pb), donde los fragmentos de 470 pb resultaron predominantes.

En la muestra inicial de la temperatura termofílica, se encontró predominio de los fragmentos de 343 y 629 pb, aunque también se detectaron fragmentos de 101, 203, y 257 pb. En la muestra final que refleja la codigestión anaerobia de los tres sustratos en termofilia, la estructura de la comunidad fue similar a la obtenida en el momento inicial; sin embargo, en este caso predominaron los fragmentos de 629 pb, a la vez que disminuyó el predominio de los fragmentos de 343 pb. En este caso, también se detectaron fragmentos de 82, 108, 203, 257, 339 pb. Es de notar que los fragmentos de 108, 203 y 343 pb fueron detectados, tanto en las muestras iniciales como en las muestras finales de ambas condiciones de temperatura.

### **3.4 Codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas en reactor de tipo tanque agitado bajo régimen semicontinuo, en condiciones mesofílicas**

Antes de la adición del cosustrato paja de arroz al reactor de tanque agitado, la digestión anaerobia de estiércol porcino fue analizada a diferentes velocidades de cargas orgánicas de estiércol. En este caso, se encontró que los parámetros físico-químicos (rendimiento y % (v/v) de metano, pH,  $N-NH_4^+$  y  $NH_3$ ) fueron los esperados para este sustrato (Tabla 3.9). A medida que se aumentó la carga orgánica de estiércol, se observó el aumento significativo en cuanto a la producción volumétrica de metano, el rendimiento de este, el pH, la concentración de nitrógeno amoniacal y el amoníaco libre.

Con la adición del cosustrato paja de arroz ( $1,5 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), a la digestión anaerobia de  $1,5 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  de estiércol, se notó un incremento en la producción volumétrica de metano que fue significativamente diferente de los valores obtenidos cuando sólo se digiere estiércol porcino. Sin embargo, los valores de rendimiento de metano se mantuvieron en el mismo orden de magnitud, dado por la mayor carga orgánica adicionada, en términos de sólidos volátiles, que aporta el cosustrato paja de arroz (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9** Comportamiento de las variables físico-químicas durante la digestión de estiércol porcino (monosustrato) y en codigestión con paja de arroz, a diferentes velocidades de carga orgánica de estiércol en el reactor. Letras diferentes en cada fila, indican diferencias significativas en las variables estudiadas según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan con un 95 % de confianza. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

Parámetros	Digestión de estiércol porcino (monosustrato)			Codigestión estiércol-paja de arroz	
	1,0	1,5	2,0	1,0-1,5	1,5-1,5
VCO ( $\text{gSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )					
$\text{CH}_4$ ( $\text{L}_\text{N}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ )	$349,9 \pm 51,2^c$	$401,6 \pm 29,7^c$	$492,5 \pm 39,4^b$	$455,1 \pm 38,7^b$	$581,9 \pm 58,4^a$
$\text{CH}_4$ ( $\text{L}_\text{N}\cdot\text{kgSV}^{-1}$ )	$223,9 \pm 9,4^b$	$246,8 \pm 37,8^b$	$312,5 \pm 36,6^a$	$199,0 \pm 9,1^b$	$209,0 \pm 39,1^b$
$\text{CH}_4$ (% v/v)	$48,0 \pm 3,0^b$	$49,0 \pm 4,0^b$	$49,0 \pm 3,0^b$	$52,0 \pm 2,0^b$	$55,0 \pm 2,0^a$
pH	$7,7 \pm 0,1^b$	$7,7 \pm 0,1^b$	$8,0 \pm 0,2^a$	$7,7 \pm 0,2^b$	$7,6 \pm 0,0^b$
AGVs ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$0,8 \pm 0,4^b$	$1,1 \pm 0,3^b$	$0,6 \pm 0,4^b$	$1,9 \pm 0,2^a$	$1,8 \pm 0,1^a$
AGVs/AT	$0,2 \pm 0,1^a$	$0,3 \pm 0,0^a$	$0,2 \pm 0,1^a$	$0,3 \pm 0,0^a$	$0,3 \pm 0,0^a$
N- $\text{NH}_4^+$ ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	$0,8 \pm 0,0^b$	$1,1 \pm 0,0^a$	$1,2 \pm 0,0^a$	$0,9 \pm 0,1^b$	$1,0 \pm 0,0^b$
$\text{NH}_3$ ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	$0,1 \pm 0,0^b$	$0,1 \pm 0,0^b$	$0,2 \pm 0,0^a$	$0,1 \pm 0,0^b$	$0,1 \pm 0,0^b$

VCO: velocidad de carga orgánica

AGVs: ácidos grasos volátiles

AT: alcalinidad total

Además, con la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz se notó un incremento significativo en el porcentaje de metano en el biogás y una acumulación significativa de ácidos grasos volátiles, que provocó una disminución del pH. Es de notar que con la aplicación del cosustrato paja de arroz a la digestión anaerobia de  $1,5 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  de estiércol porcino, se obtienen concentraciones de nitrógeno amoniacal y de amoníaco libre que no difieren significativamente de las obtenidas cuando se utilizan bajas carga de estiércol ( $1,0 \text{ gSV}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ). La relación AGVs/AT se mantuvo entre los valores aceptables ( $\leq 0,3$ ), indicando la estabilidad en el reactor durante este período de codigestión.

Una vez estabilizado el sistema de codigestión anaerobia de estiércol y paja, durante 30 días, se evaluó la adición de las arcillas residuales, con base bentonita, en tres fases (I, II y III) (Fig. 3.12). En la fase I (adición de  $0,5 \text{ gSV} \cdot \text{L}_{\text{react}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  de arcillas, por 5 días), se observó un período de latencia para la formación de metano, cuya producción después de 60 h se incrementó hasta superar los  $350 \text{ L}_\text{N} \cdot \text{kgSV}^{-1}$  pero después de 11 días esta disminuyó hasta los valores iniciales ( $199,0 \pm 9,1 \text{ L}_\text{N} \cdot \text{kgSV}^{-1}$ ). En el biogás se alcanzó un 65 % (v/v) de metano con este incremento.

Las concentraciones de nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) dentro del reactor, disminuyeron desde un valor promedio de 0,9 hasta  $0,3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , justo después de la adición de arcillas. Esto provocó una disminución del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) libre, de 0,08 hasta  $0,03 \text{ g kg}^{-1}$ , a pH estable entre 7,6 y 7,4.

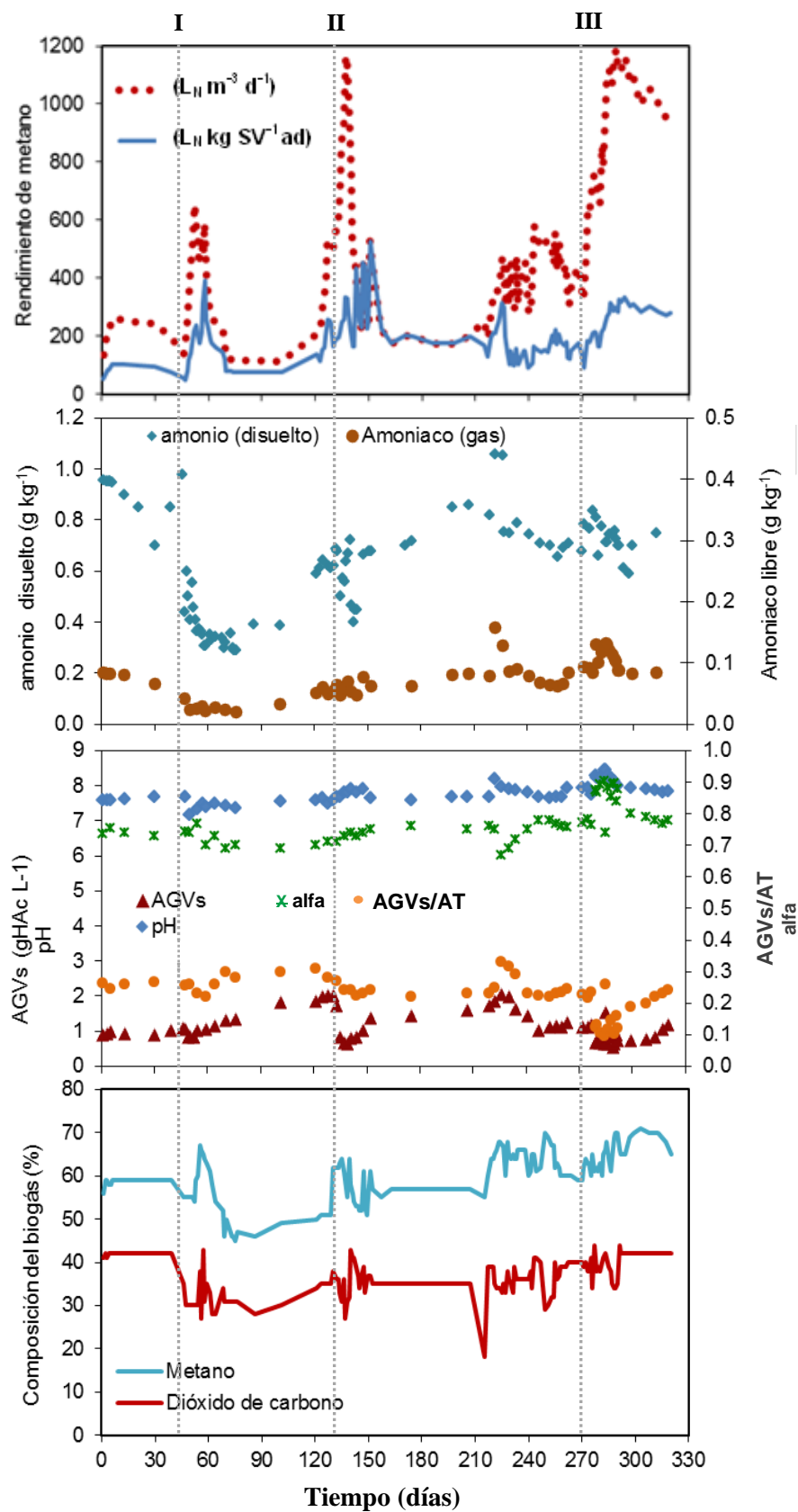
Los parámetros de concentración de ácidos grasos volátiles y relación de alcalinidades,  $\alpha$  (0,65-0,72), se mantuvieron estables, sin embargo, la concentración de ácidos grasos volátiles mostró un incremento a partir de 18 días después de la adición de arcillas. Esto no tuvo repercusión en el pH que no disminuyó de 7,4, aun cuando la concentración de ácidos grasos volátiles fue la más alta detectada en esta fase I ( $1,99 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Los valores de cenizas (sólidos totales fijos) en el reactor mostraron una disminución después de 60 días de aplicadas las primeras dosis de arcilla, tiempo en el cual este valor no superó los  $25 \text{ gSTF} \cdot \text{L}^{-1}$ . Los sólidos volátiles se mantuvieron entre 30 y  $35 \text{ gSTV} \cdot \text{L}^{-1}$ , durante esta fase I.

Antes de la segunda aplicación de las arcillas residuales (fase II), fue aumentada la VCO de estiércol a  $1,5 \text{ gSV} \cdot \text{L}_{\text{react}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , manteniendo la carga orgánica de paja a  $1,5 \text{ gSV} \cdot \text{L}_{\text{react}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Las variables físico-químicas evaluadas durante esta codigestión de estiércol y paja, muestran el aumento de metano correspondiente, en términos de producción volumétrica (Tabla 3.9). Sin embargo, en cuanto a rendimiento de metano, no se obtuvo diferencias significativas respecto a la codigestión cuando se usó  $1,0 \text{ gSV} \cdot \text{L}_{\text{react}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  de estiércol ni cuando se usó este como monosustrato a  $1,5 \text{ gSV} \cdot \text{L}_{\text{react}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Además, se obtuvo el esperado aumento en las concentraciones de nitrógeno amoniacal (Tabla 3.9).

En la fase II, se volvieron a aplicar  $0,5 \text{ gSV} \cdot \text{L}_{\text{react}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  de arcillas, por 7 días. El total de arcillas representó el valor de concentración que maximiza la actividad metanogénica específica, obtenido en este estudio durante su optimización, en condiciones mesofílicas ( $8,3 \text{ gSTT} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Los resultados mostraron un rápido incremento en el rendimiento de metano hasta alcanzar  $500 \text{ L}_\text{N} \cdot \text{kgSV}^{-1}$  en menos de 24 h (Fig. 3.12). Sin embargo, el reactor no se mostró estable en cuanto





**Fig. 3.12** Producción de metano y monitoreo de variables durante la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas residuales. Se utilizó un reactor de tanque agitado, bajo régimen semicontinuo (ciclos de adición-extracción), a temperatura mesofílica. Las líneas discontinuas verticales indican el inicio de las fases de adición de las arcillas residuales (I, II y III).

al rendimiento de metano y se observaron máximos y mínimos. A pesar de ello, se observó una disminución de las concentraciones de  $\text{N-NH}_4^+$  pero en este caso, no se afectaron las concentraciones de  $\text{NH}_3$  gaseoso, cuyo valor medio fue de  $0,6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

La concentración total de los ácidos graso volátiles, disminuyó hasta  $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pero aumentaron nuevamente, después de 19 días de la adición de arcillas. Aunque los valores de pH no fueron afectados por esta disminución de los ácidos, sí se notó un ligero incremento a valores medios de 7,82. Por otro lado, a pesar de la inestabilidad en el rendimiento de metano, la relación de alcalinidades ( $\alpha$ ) se mantuvo en valores entre 0,71 y 0,74.

Posteriormente, durante 100 días fueron evaluadas diferentes cargas orgánicas de estiércol y paja que representaron tiempos de retención hidráulica de 30, 35 y 25 días. En este período, se detectó un variable rendimiento de metano, en correspondencia con la carga orgánica aplicada al reactor. Se notó un aumento en la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$ , dado por el incremento de la carga orgánica de estiércol lo que conllevó a un aumento del  $\text{NH}_3$  gaseoso, hasta  $0,16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , que pudo estar relacionado con el valor más bajo de la relación de alcalinidades obtenido ( $\alpha = 0,65$ ) en ese momento (día 226), donde coincidió además con la más alta concentración de AGVs obtenida en ese período ( $2,03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Al tiempo de retención hidráulica de 25 días se obtuvo la mayor estabilidad de las variables físico-químicas, por lo que a este tiempo de retención hidráulica, fue llevada a cabo la tercera fase de aplicación de arcillas.

En la fase III, se aplicó la misma concentración de arcillas pero durante 9 días y a intervalos de dos días para evitar la sobrecarga del sistema apreciada en la fase II. En este caso, se realizó a mayores cargas orgánicas de estiércol ( $2,0 \text{ gSV}\cdot\text{L}_{\text{react}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) manteniendo la carga de paja de  $1,5 \text{ gSV}\cdot\text{L}_{\text{react}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (tiempo de retención hidráulica de 25 días). Estas cargas orgánicas de estiércol y paja corresponden a las concentraciones que maximizan la actividad metanogénica específica, obtenidas en este estudio durante la optimización en régimen discontinuo.

En esta fase, se notó nuevamente un incremento del rendimiento de metano, por encima de  $300 \text{ L}_\text{N}\cdot\text{kgSV}^{-1}$ , pero menor que en la fase II. Sin embargo, se alcanzó una estabilidad mayor en el rendimiento de metano, el cual se mantuvo a esos niveles hasta después de 30 días de la adición de arcillas. En términos de producción volumétrica de metano, se obtuvieron diferencias significativas entre la producción de metano en esta fase III y la producción de metano durante la codigestión de estiércol y paja a los diferentes tiempos de retención hidráulica evaluados.

Las concentraciones de  $\text{N-NH}_4^+$ , que habían sido aumentadas con el largo periodo de codigestión anaerobia de estiércol y paja, mostraron un descenso más conservador; pero, a pesar de la alta carga de estiércol las concentraciones de  $\text{N-NH}_4^+$  no sobrepasaron los  $0,75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Además, se notó una disminución en la concentración de ácidos grasos volátiles, que aumentó el pH hasta 8,4; lo cual desplazó el equilibrio hacia la formación de  $\text{NH}_3$ , (con un máximo de  $0,13 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). En este momento, también se obtuvo el valor máximo de  $\alpha$  obtenido, durante toda la experimentación (0,89).

A pesar de la estabilidad en la producción de metano, 8 días después de aplicada la primera dosis de arcillas en la fase III, se observó una variación transitoria de los parámetros físico-químicos  $\alpha$ , pH,  $\text{NH}_3$  gas y ácidos grasos volátiles, cuyos valores fueron estabilizados gradualmente. En cuanto al contenido de metano en el biogás se registraron valores por encima de 65 % (v/v) el cual fue sostenido por más de 30 días después de aplicadas las arcillas.

### **3.5 Análisis de la comunidad microbiana desarrollada en el reactor de tanque agitado con la adición del cosustrato paja de arroz y durante la adición de arcillas**

La comunidad microbiana fue analizada por métodos moleculares independientes de cultivo. Se tomaron muestras representativas del reactor, para evaluar la estructura de la comunidad en cuanto a diversidad, dinámica, identificación y cuantificación de las bacterias y archaeas. Se analizaron muestras del reactor mesofílico de tanque agitado durante: la digestión anaerobia de estiércol porcino como monosustrato; la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz; y durante la adición de arcillas residuales, en la fase III a los: 4, 8, 10, 12 y 21 días después de aplicar la primera dosis de estas.

#### ***3.5.1 Diversidad y dinámica de la comunidad microbiana basado en la técnica de T-RFLP***

La riqueza de especies, asumida como el número de fragmento de restricción terminales, detectados en cada muestra, mostró una mayor diversidad de especies de bacterias (de 19 a 26 fragmentos por muestra), que de archaeas (de 6 a 8 fragmentos por muestra).

**Dominio Bacterias.** La diversidad de las especies de bacterias fue revelada, según el índice de Shannon ( $H$ ) (Tabla 3.10), donde el valor mínimo (1,98) correspondió a la muestra tomada durante la III fase de adición de arcillas al reactor, 10 días después de la aplicar la primera dosis.

**Tabla 3.10** Diversidad y organización de la comunidad bacteriana durante la digestión de estiércol porcino, de la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz, y de la aplicación de las arcillas residuales en la fase III.

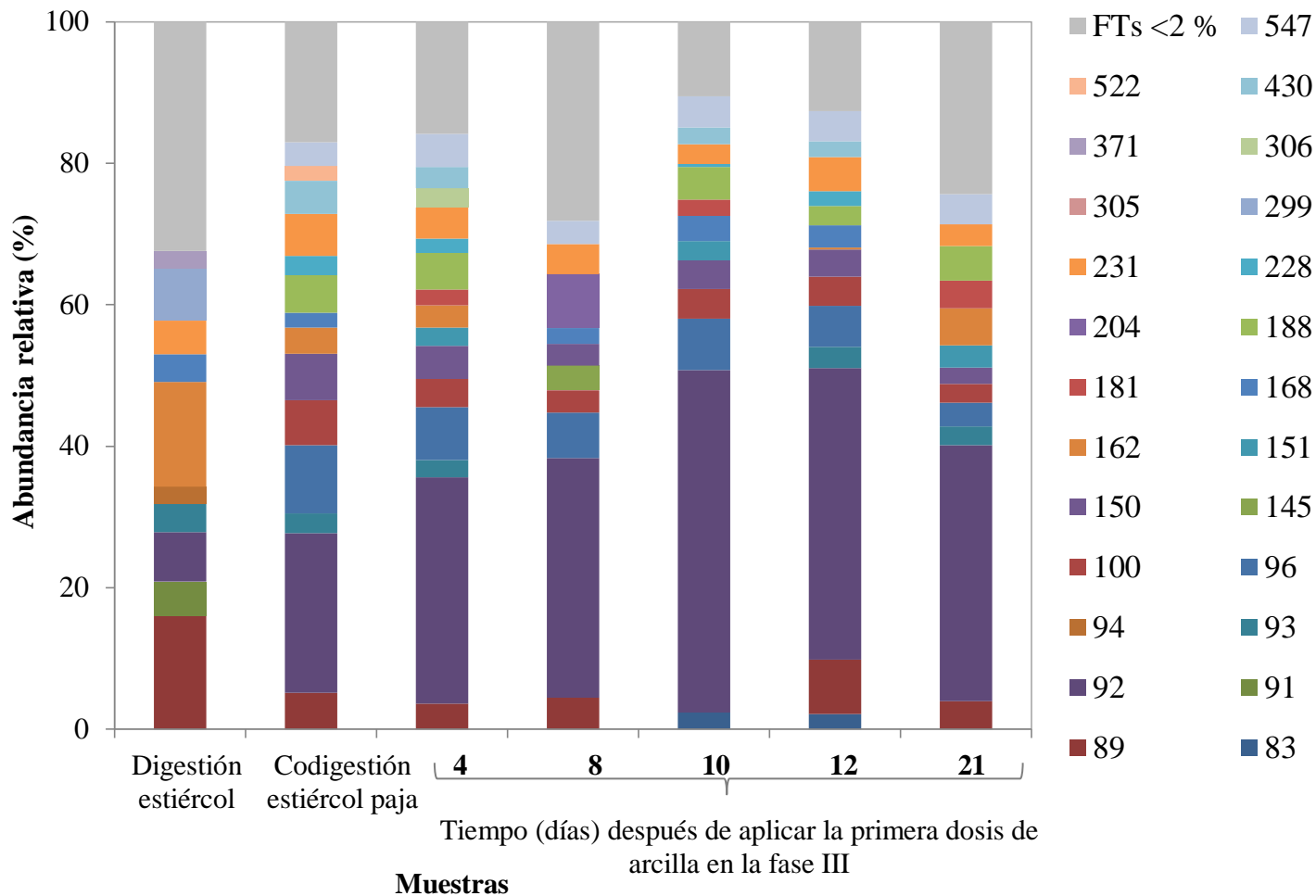
Índices	Digestión de estiércol	Codigestión estiércol y paja	Adición de arcillas				
			Tiempo (días) después de aplicar la 1 <sup>era</sup> dosis en la fase III				
			4	8	10	12	21
Riqueza de Especies ( $R_r$ )	26	23	22	24	19	20	23
Índice de Shannon ( $H$ )	2,79	2,74	2,45	2,39	1,98	2,20	2,34
Índice de Equidad ( $H/H_{max}$ )	0,86	0,87	0,79	0,75	0,67	0,73	0,74
Varianza (Var $H$ )	0,08	0,09	0,08	0,08	0,07	0,07	0,08

La organización de la comunidad, según el índice de Equidad de Pielou ( $H/H_{max}$ ), resultó en valores entre 0,86 y 0,87 durante la digestión de estiércol porcino y durante la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz, respectivamente; sin embargo después de la adición de arcillas, estos valores disminuyeron (0,65 – 0,79), donde el valor mínimo (0,65) correspondió a la muestra tomada 10 días después de la aplicar la primera dosis de arcillas durante la fase III.

El perfil de los fragmentos de restricción terminales de bacterias mostró una mayor diversidad en la muestra del reactor de la digestión de estiércol porcino, donde se detectaron 26 fragmentos y un  $H = 2,79$ . Pero esta diversidad luego disminuyó con la codigestión de estiércol y paja y luego con la adición de arcillas, hasta un mínimo de 19 fragmentos ( $H = 1,98$ ), obtenidos 10 días después de aplicar la primera dosis de arcillas en la fase III.

El análisis de la abundancia relativa de los fragmentos, también refleja la dinámica de la población bacteriana durante la experimentación. En este caso, un aumento en la abundancia relativa de algunos, unido a la disminución, aparición o no detección de otros, fue observado con la aplicación del cosustrato paja y, posteriormente, durante la aplicación de las arcillas, respecto a la comunidad microbiana, que digería estiércol como monosustrato (Fig. 3.13).

En la muestra de la digestión de estiércol, los fragmentos de 89 y 162 pb mostraron su predominio al ocupar el 16 y el 14,8 % de la abundancia relativa total, respectivamente. Los fragmentos de 91, 92, 231 y 299 pb también fueron abundantes, pero en un orden menor de magnitud que los fragmentos de 89 y 162 pb. Es de notar, además, que 32,4 % de la abundancia



**Fig. 3.13** Abundancia relativa de los fragmentos de restricción terminales de bacterias y sus tallas en pb, en muestras del reactor de tanque agitado durante: la digestión de estiércol porcino; la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz; y durante la adición de arcillas en la fase III a los: 4, 8, 10, 12 y 21 días después de aplicar la primera dosis. La abundancia relativa de cada fragmento se determinó en base a la altura de su máximo de fluorescencia, respecto al total de las alturas de todos los picos detectados en la muestra.

relativa total es ocupada por aquellos fragmentos no considerados, debido a que su abundancia relativa individual es menor del 2 %.

El análisis del coeficiente de Jaccard ( $J'$ ) también fue utilizado para evaluar la dinámica, y establecer la similitud entre la muestra de la digestión de estiércol y las demás muestras durante la codigestión anaerobia y la adición de arcillas. Estos valores de  $J'$  estuvieron entre 19 y 25 %.

En la muestra del reactor tomada durante la codigestión anaerobia de estiércol y paja, los fragmentos de 92 pb mostraron una abundancia relativa de 22,6 %, que indicó su predominio en esta fase del experimento (Fig. 3.13). La abundancia relativa de estos fragmentos de 92 pb aumentó conforme se adicionaron las dosis de arcillas. Posteriormente, la abundancia de estos fragmentos de 92 pb disminuyó en la muestra del día 21, después de aplicada la primera dosis de arcilla en la fase III, hasta valores similares a la abundancia mostrada en las muestras de la codigestión de estiércol y paja. Por tanto, este grupo de bacterias (de fragmentos de 92 pb) es afectado por la adición del cosustrato paja, y luego durante la adición de arcillas.

En la muestra de la codigestión de estiércol y paja también se detectaron otros fragmentos de 96, 100, 150, 231 y 522 pb, cuyas abundancias relativas disminuyeron considerablemente o no se detectaron durante la aplicación de arcillas (Fig. 3.13).

El perfil de fragmentos, 4 días después de aplicar la primera dosis de arcilla en la fase III, fue similar al de la codigestión de estiércol y paja; sin embargo una disminución drástica del número de fragmentos con abundancia relativa superior al 2 % fue observada 8 días después de aplicar la primera dosis de arcilla en la fase III. Esto motivó que se manifestara la menor diversidad de fragmentos en el día 10 después de aplicar la primera dosis de arcilla, donde sólo se detectaron 19 fragmentos, incluso considerando la abundancia relativa por encima de 1 %. En esta muestra (día 10), los fragmentos de 92 pb fueron detectados con una abundancia relativa de 48,4 %, lo cual indicó el predominio de este grupo de bacterias (Fig. 3.13). En cambio, los fragmentos de 89 pb, abundantes en las demás muestras, no fueron detectados en esta muestra del día 10 y por el contrario los fragmentos de 83 pb sólo fueron detectados en esta muestra. No obstante, se obtuvo una similitud considerable ( $J' = 69$  %) entre esta muestra y la tomada dos días después.

Después de 12 días de aplicar la primera dosis de arcilla en la fase III, la dinámica de la comunidad mostró una tendencia a su regulación, evidenciada por la similitud de los fragmentos con las muestras de la codigestión estiércol y paja, según el coeficiente de Jaccard ( $J' = 65,4$  %).

También, en la muestra tomada 21 días después de aplicar la primera dosis de arcilla, se obtuvieron fragmentos similares a los de las muestras de la codigestión estiércol y paja ( $J'$  entre 48,4 y 55,2 %), otra evidencia de la conservación de especies de bacterias ante perturbaciones como la adición de nuevos nutrientes minerales.

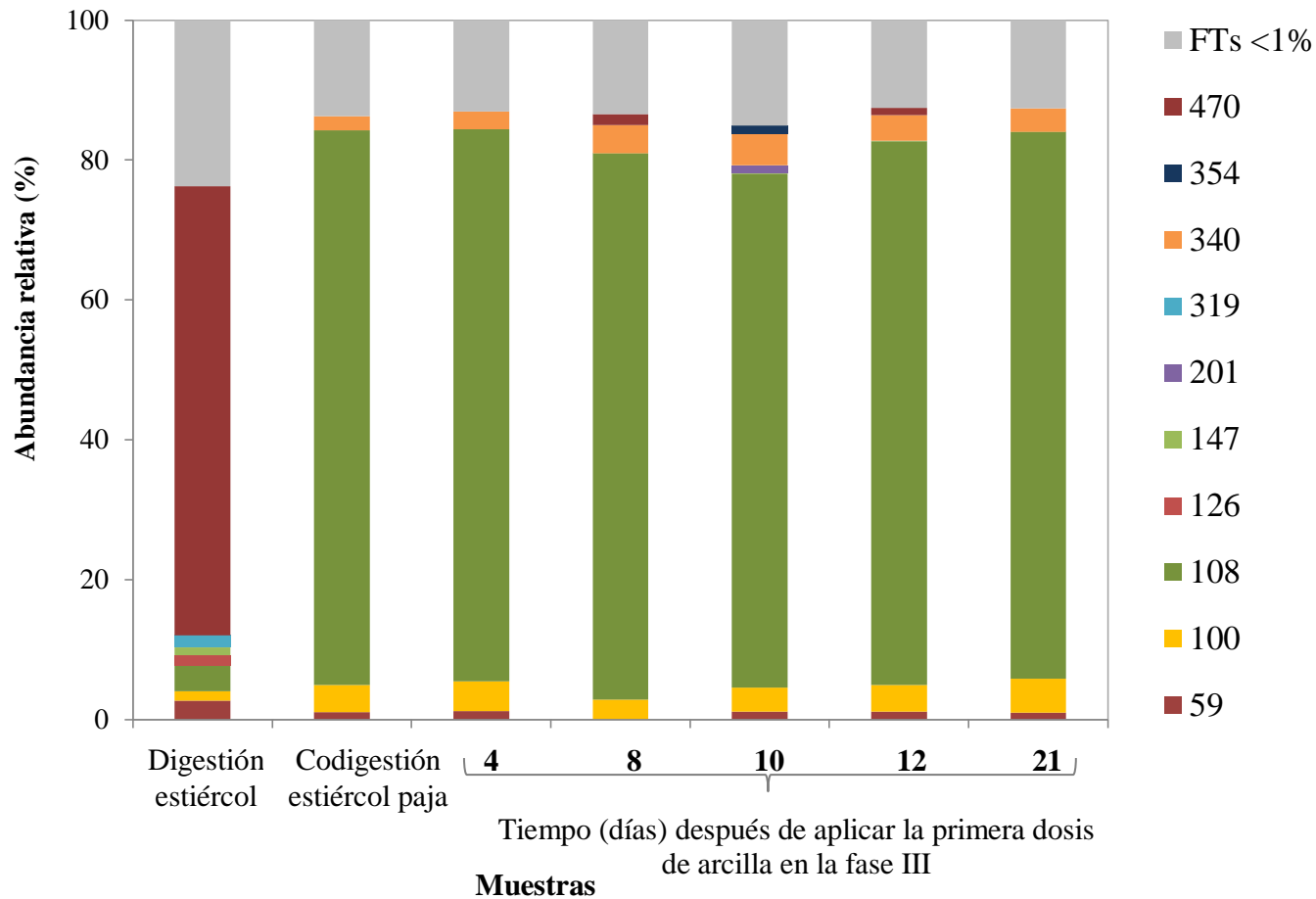
**Dominio Archaea.** Se detectaron de 6 a 8 fragmentos por muestra, donde la mayor diversidad fue observada en la digestión anaerobia de estiércol porcino. En esta muestra, los fragmentos de 470 pb ocuparon el 64,3 % de la abundancia relativa total, aunque también se notó la presencia de fragmentos de 59, 108, 126, 147 y 319 pb, que en su conjunto ocuparon cerca del 15 % de la abundancia relativa total de la muestra (Fig. 3.14).

Sin embargo, con la adición del cosustrato paja se percibió un cambio en el predominio de los fragmentos, pues se obtuvo un incremento de la abundancia relativa de fragmentos de 108 pb, desde un 4 % en la muestra de la digestión de estiércol hasta valores entre 73,5 y 79,3 % en el resto de las muestras. A su vez, los fragmentos de 470 pb predominantes en la digestión de estiércol solo fueron detectados en algunas muestras después de aplicar la primera dosis de arcillas (días 8 y 12), con baja abundancia relativa (1,6 y 1,1, respectivamente).

Los fragmentos de 59 y 100 pb detectados en la digestión de estiércol también fueron detectados durante la codigestión de estiércol y paja y luego con la adición de arcillas, con una abundancia entre 3 y 5 %. Otros fragmentos de 201, 340 y 354 pb, no detectados en la digestión de estiércol, sí tuvieron relativa abundancia (1,5 - 4,9 %), durante la codigestión de estiércol y paja y luego con la adición de arcillas (Fig. 3.14).

### ***3.5.2 Diversidad e identificación de bacterias y archaeas basado en el análisis filogenético, a partir de la construcción de librerías de clones del gen ARNr 16S***

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de T-RFLP, se seleccionaron tres muestras representativas para identificar el mayor número de bacterias y archaeas posibles, presentes en el reactor antes, durante y después de la adición del cosustrato paja y las arcillas. De esta manera, para los ensayos moleculares: construcción de librería de clones de los genes *ARNr 16S* y la cuantificación por PCR en tiempo real, se utilizaron las muestras de la digestión de estiércol como monosustrato; la muestra de la codigestión a 4 y 10 días después de aplicar la primera dosis de arcilla.



**Fig. 3.14** Abundancia relativa de los fragmentos de restricción terminales de archaeas y sus tallas en pb, en muestras del reactor de tanque agitado durante: la digestión de estiércol porcino; la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz; y durante la adición de arcillas en la fase III a los: 4, 8, 10, 12 y 21 días después de aplicar la primera dosis. La abundancia relativa de cada fragmento se determinó en base a la altura de su máximo de fluorescencia, respecto al total de las alturas de todos los picos detectados en la muestra.



En general, se aislaron 162 clones de bacterias (54 por muestra) y 108 clones de archaeas (36 por muestras), de los cuales 155 y 101, respectivamente, resultaron positivos (correcta inserción del gen *ARNr 16S*). Todas las secuencias obtenidas en este estudio fueron depositadas en la base de datos de los Laboratorios de Biología Molecular Europeos (EMBL, del inglés) bajo los números de acceso **HG007881-HG007957** (para Bacterias) y **HG007868-HG007880** (para Archaeas).

**Diversidad del dominio Bacteria:** A partir de los 155 clones positivos, se identificaron 77 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs). La Tabla 3.11 muestra la riqueza de especies de cada muestra, considerando el presupuesto teórico de que cada OTU representa una especie. Similar a lo obtenido según el análisis del T-RFLP, la mayor diversidad fue observada en la muestra de la digestión de estiércol porcino ( $H = 2,02$ ), cuya diversidad también disminuyó a medida que se adicionó la arcilla (muestra del día 10). A pesar de obtener mayor riqueza de especies que en el análisis del T-RFLP se obtuvieron menores índices de  $H/H_{max}$  (0,56 - 0,57).

**Tabla 3.11** Diversidad y organización de la comunidad bacteriana obtenida según la librería de clones del gen *ARNr 16S*, durante la digestión de estiércol porcino y durante la aplicación de las arcillas residuales a la codigestión de estiércol y paja.

Índices	Digestión de estiércol	Adición de arcillas	
		Tiempo (días) después de aplicar la 1 <sup>era</sup> dosis en la fase III	
		4	10
Riqueza de Especies ( <i>Rr</i> )	34	34	24
Índice de Shannon ( <i>H</i> )	2,02	1,98	1,77
Índice de Equidad ( $H/H_{max}$ )	0,57	0,56	0,56
Varianza ( <i>Var H</i> )	0,08	0,07	0,08

**Identificación del dominio Bacteria:** A partir del árbol filogenético obtenido (Fig. 3.15) y la distribución taxonómica de los clones aislados (Tabla 3.12) se pudo determinar que el 56,8 % del total de clones pertenecían al filo Firmicutes, donde la clase más representada fue Clostridia.

El 36 % de los clones aislados de la muestra de la digestión de estiércol, pertenecieron al filo Firmicutes, pero, en las muestras tomadas a los 4 y 10 días después de aplicar la primera dosis de arcilla, solo pertenecieron a este Filo, el 25 y 27 % del total de clones aislados, respectivamente. Dentro de la clase Clostridia el orden más representado fue Clostridiales (43,9 % del total los

**Tabla 3.12** Distribución taxonómica de la comunidad procariota presente en las muestras analizadas, identificadas a partir de la librería de clones del gen *ARNr 16S*. Se representa el número de clones aislados de cada muestra y su concentración relativa (en %) respecto al total.

Dominio	Filo	Clase	Orden	Familia	Digestion estiércol	Numero de clones Diferentes días después de la primera dosis de arcillas		% de Total		
						4 días	10 días			
Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales		36	25	27	56.8		
					29	21	18	43.9		
					Clostridiaceae	12	9	12	21.3	
					Eubacteriaceae	1	2	0	1.9	
					Peptococcaceae	0	1	0	0.6	
					Peptostreptococcaceae	0	1	0	0.6	
					Ruminococcaceae	3	1	1	3.2	
					Synthrophomonaceae	3	3	2	5.2	
					no relacionada	10	4	3	11.0	
					Thermoanaerobacterales	1	3	7	7.1	
					Bacillis	Lactobacillales	2	0	0	1.3
					Bacillales	0	1	0	0.6	
					no relacionada	4	0	2	3.9	
					Bacteroidetes	7	15	26	31.0	
					Cloriflexi	7	4	2	8.4	
Proteobacteria desconocido	0	5	0	3.2						
	0	1	0	0.6						
	<b>Relación Bacteroidetes:Firmicutes</b>			<b>0.19</b>	<b>0.60</b>	<b>0.96</b>				
Archaea	Euryarchaeota	Methanomicrobia	Methanosarcinales		35	32	22	88.1		
					34	32	20	85.1		
					Methanosaetaceae	5	32	20	56.4	
					Methanosarcinaceae	29	0	0	28.7	
					Methanomicrobiales	1	0	0	1.0	
					Methanomicrobiaceae	1	0	0	1.0	
					Methanomicrobia no clasificada	0	0	2	2.0	
					( <i>Methanomassiliicoccus</i> )	0	0	2	2.0	
					Methanobacteria	1	0	11	11.9	
					Methanobacteriales	1	0	11	11.9	
					Methanobacteriaceae	1	0	11	11.9	

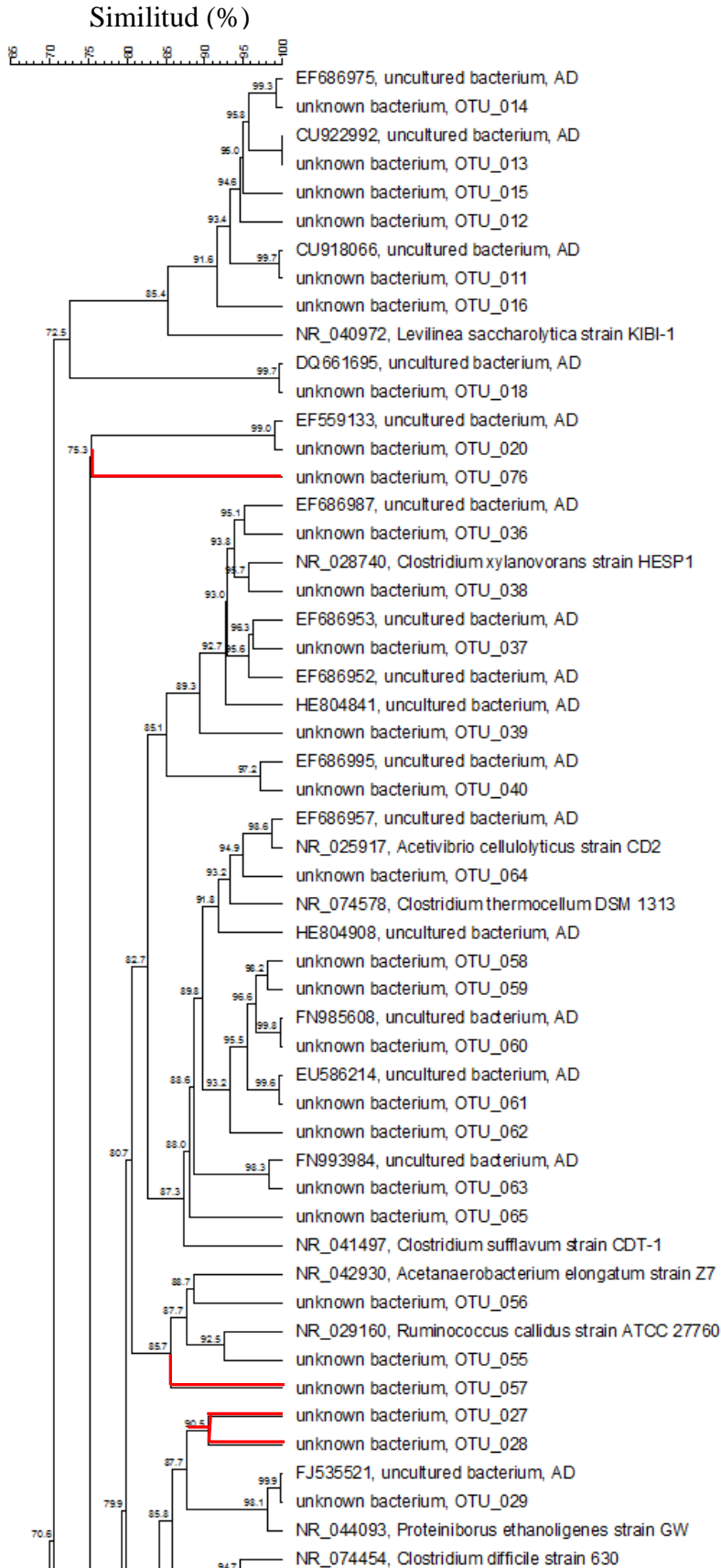
clones aislados) y se identificaron clones pertenecientes al orden Thermoanaerobacterales (7,1 %). El 21,3 % del total de clones pertenecieron a la familia Clostridiaceae. También se detectaron clones pertenecientes a las familias: Syntrophomonaceae (5,2 %), Ruminococcaceae (3,2 %), Eubacteriaceae (1,9 %), Peptococcaceae (0,6 %) y Peptostreptococcaceae (0,6 %), todas pertenecientes al orden Clostridiales. En adición, un 11 % del total de clones fue identificado dentro de este último orden, pero no relacionado a ninguna de las familias descritas, de los cuales 10 clones fueron aislados a partir de la muestra de la digestión de estiércol, 4 clones se aislaron a partir de la muestra tomada en el día 4, después de aplicar la primera dosis de arcilla y 3 de la muestra tomada el día 10, después de aplicar la primera dosis de arcilla.

Además, se aislaron clones pertenecientes a la clase Bacillis (1,6 y 0,3 %), representados por clones de los órdenes Lactobacillales y Bacillales. Otros 6 clones aislados de las muestras de la digestión de estiércol y de la muestra tomada el día 10 después de aplicar la primera dosis de arcilla, fueron identificados dentro del filo Firmicutes, pero no relacionados a ninguna de las clases descritas (Tabla 3.12).

Por otro lado, 48 clones pertenecientes al filo Bacteroidetes (31 % del total de clones) fueron aislados a partir de la muestra de la digestión de estiércol (7 clones), de la muestra tomada al 4to día después de aplicar la primera dosis de arcilla (15 clones) y a partir de la muestra tomada el décimo día después de aplicar la primera dosis de arcilla (26 clones) (Tabla 3.12). La razón Bacteroidetes/Firmicutes se incrementó a medida que se adicionaron las arcillas residuales al reactor, desde 0,19 hasta 0,96.

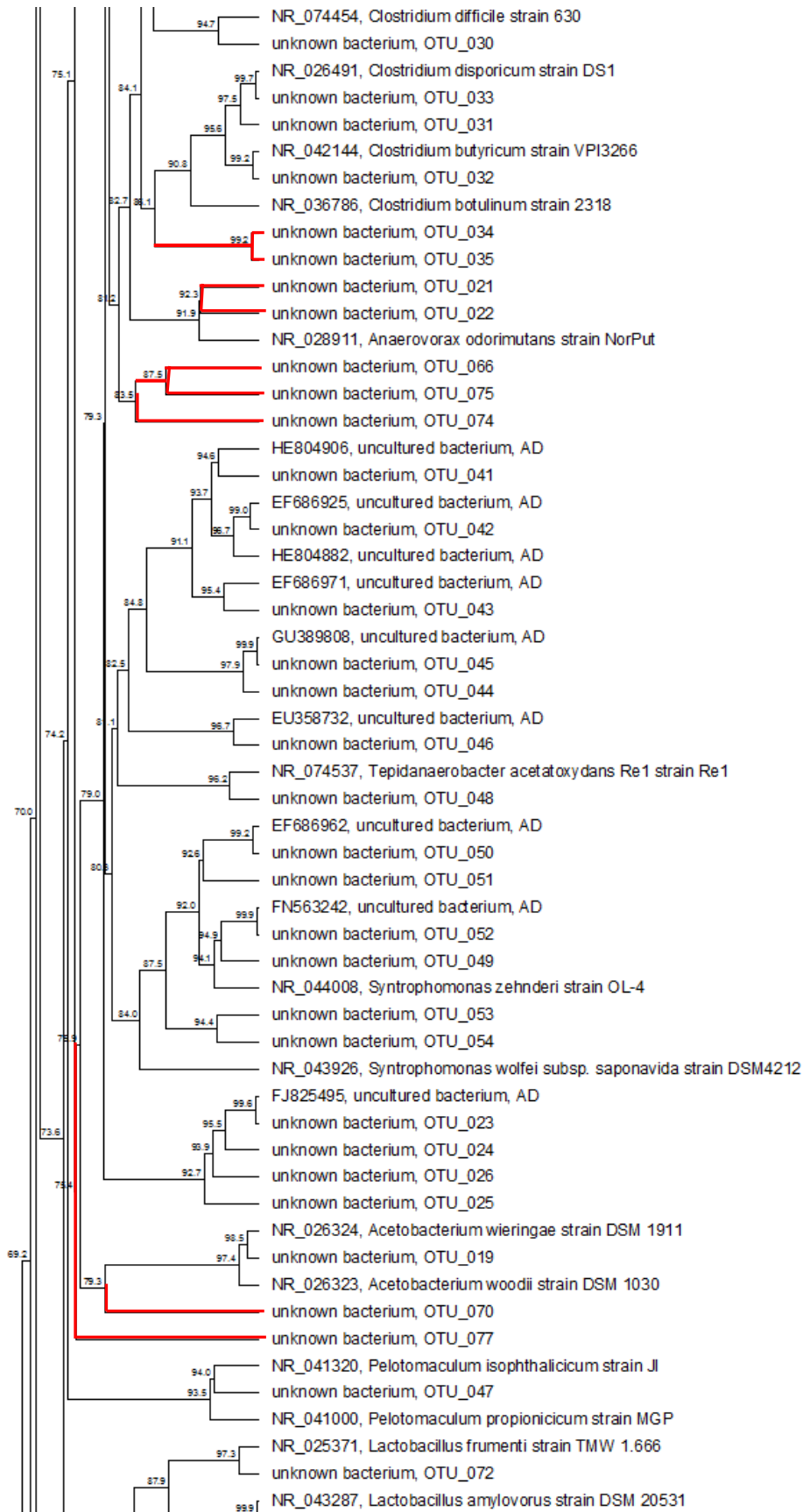
El 8,4 % del total de clones aislados pertenecieron al filo Chloroflexi, de ellos la mayoría se aislaron de la muestra de la digestión de estiércol y un número menor de la muestra tomada el día 4 después de aplicar la primera dosis de arcilla.

El 3,2 % de los clones pertenecieron al filo Proteobacteria, aislados principalmente, a partir de la muestra tomada el día 4 después de aplicar la primera dosis de arcilla. Un clon aislado (OTU\_017) a partir de esta muestra, no fue identificado dentro de ningún filo pero su secuencia estaba afiliada al dominio Bacteria (Fig. 3.15).

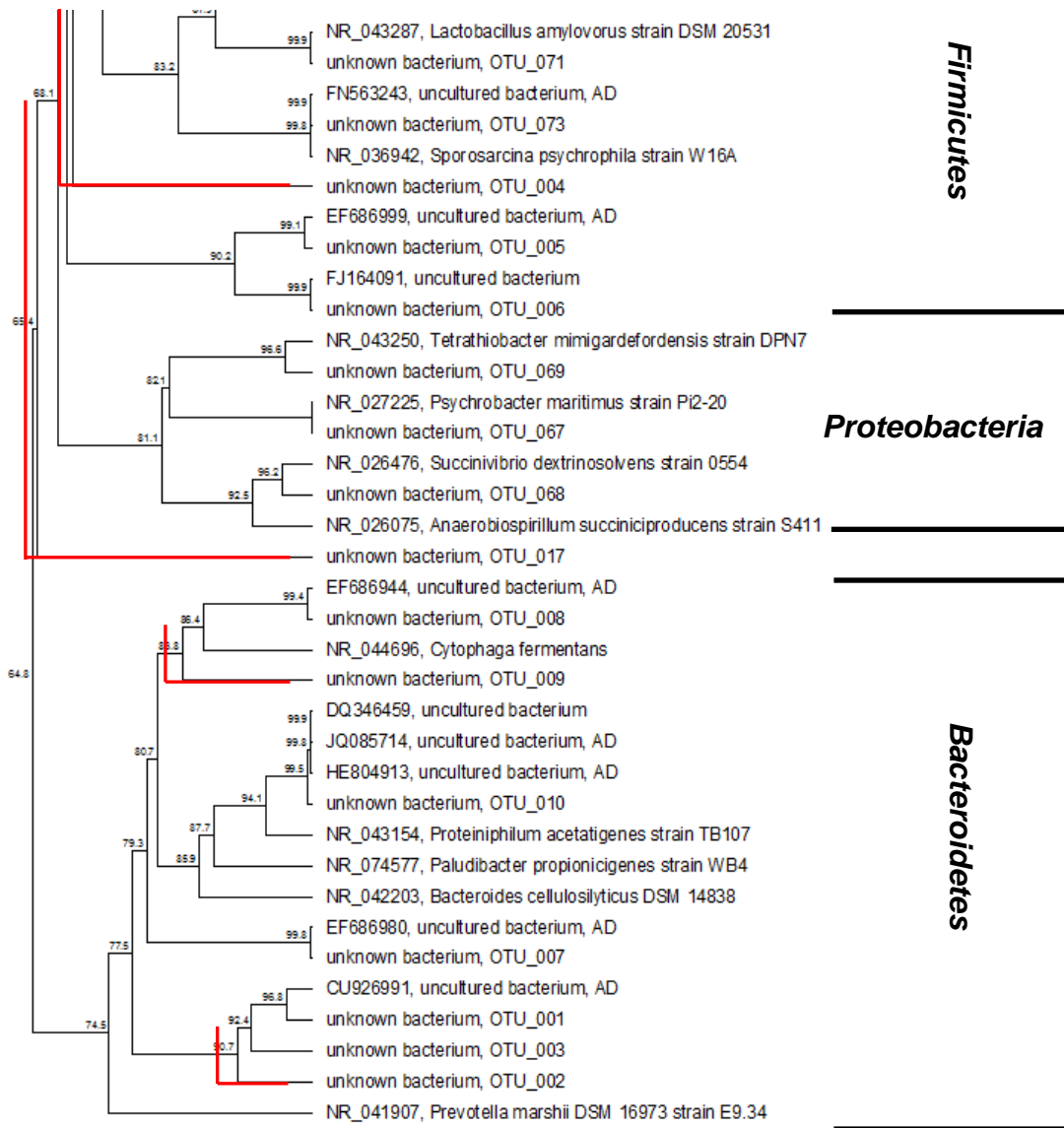


***Chloroflexi***

***Firmicutes***



**Firmicutes**



**Fig. 3.15.** Árbol filogenético de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) detectadas pertenecientes al Dominio Bacterias, basado en el análisis del algoritmo UPGUMA de la secuencia de nucleótido del gen parcial *ARNr 16S*. Se destacan con líneas rojas la baja similitud de algunos OTUs con las secuencias descritas.

**Diversidad del dominio Archaea:** A partir de los 101 clones positivos aislados, se identificaron 13 OTUs pertenecientes al dominio Archaea (Tabla 3.13). Todos los clones aislados de la muestra tomada el día 4 después de aplicar la primera dosis de arcilla, resultaron ser especies de la misma familia, es decir, pertenecientes a un solo OTUs (OTU\_001). En general, se obtuvo baja diversidad de especies según  $H$ , así como bajos valores del índice de equidad ( $H/H_{max}$ ).

**Identificación del dominio Archaeas:** Todos los clones aislados pertenecieron al filo Euryarchaeota, de los cuales el 85,1 % fueron identificados dentro del orden Methanosarcinales. La mayoría de los clones aislados de la muestra de la digestión de estiércol (28,9 %) pertenecieron a la familia Methanosarcinaceae, sin embargo, la mayoría de los clones aislados de las muestras tomadas el día 4 y el día 10, después de aplicar la primera dosis de arcilla en la fase III, fueron identificados dentro de este mismo orden, pero pertenecientes a la familia Methanosaetaceae (Tabla 3.12). La figura 3.16 muestra el árbol filogenético obtenido para el Dominio Archaeas.

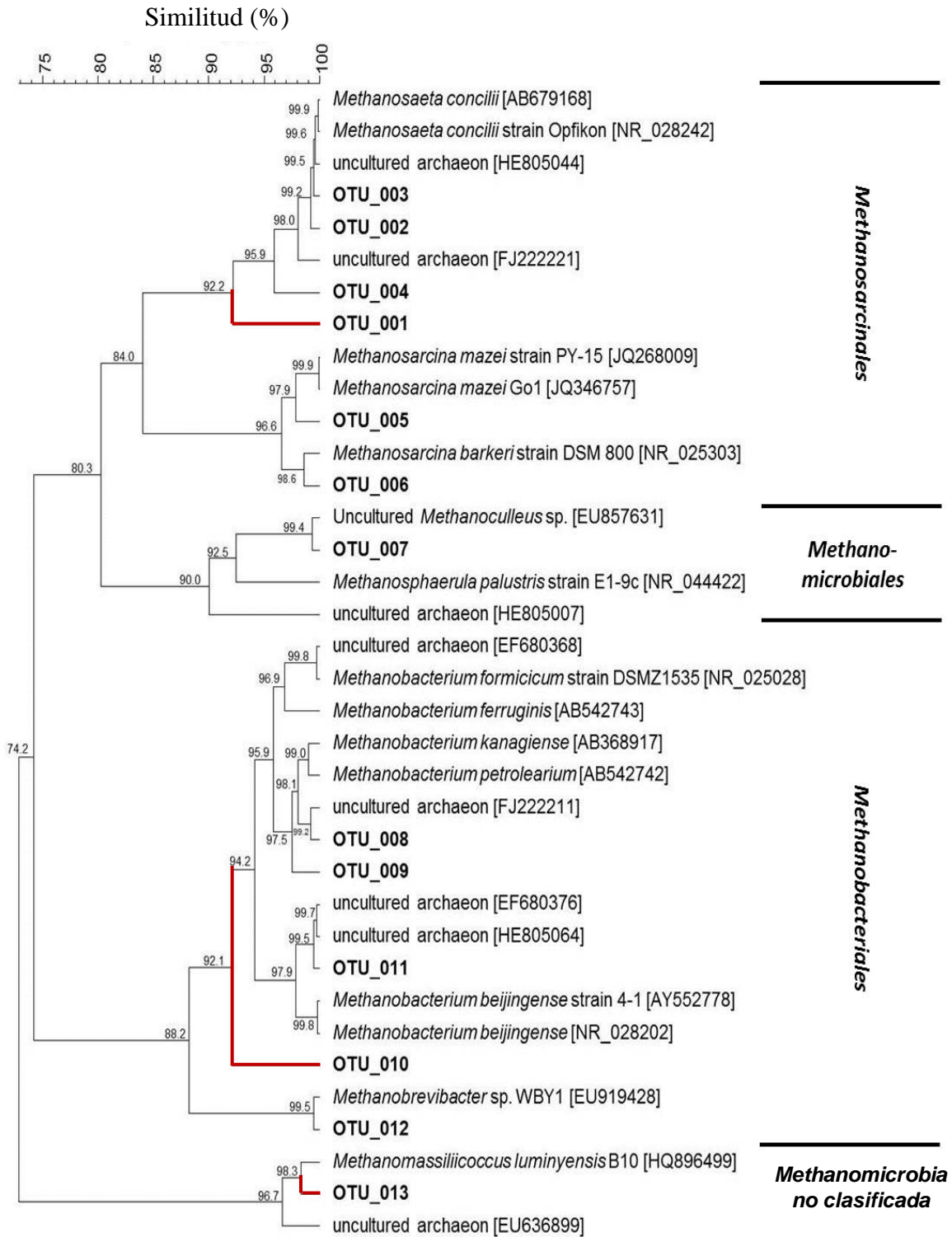
**Tabla 3.13** Diversidad y organización de la comunidad de archaeas obtenida según la librería de clones del gen *ARNr 16S*, durante la digestión de estiércol porcino y durante la aplicación de las arcillas residuales a la codigestión de estiércol y paja.

Índices	Digestión de estiércol	Adición de arcillas	
		Tiempo (días) después de aplicar la 1 <sup>era</sup> dosis en la fase III	
		4	10
Riqueza de Especies ( <i>Rr</i> )	7	1	7
Índice de Shannon ( <i>H</i> )	0,70	0,36	0,80
Índice de Equidad ( <i>H/H<sub>max</sub></i> )	0,36	0,00	0,41
Varianza ( <i>Var H</i> )	0,03	0,00	0,03

Por otro lado, el 11,9 % del total de clones aislados pertenecieron al orden Methanobacteriales, el 1 % al orden Methanomicrobiales, y el 2 % fueron agrupados en el OTU\_013, el cual mostró un 98,3 % de similitud con la especie *Methanomassiliicoccus luminyensis* perteneciente al orden Methanomicrobia no clasificada (Fig. 3.16).

### 3.5.3 Cuantificación de bacterias y archaeas basado en la PCR en tiempo real (q-PCR)

La cuantificación de bacterias y archaeas también mostró el predominio de bacterias en la comunidad microbiana del reactor. La Tabla 3.14 muestra el número de copias del gen *ARNr 16S* de cada muestra analizada. La relación Archaea/Bacteria disminuyó desde 0,083 (obtenida muestra de la digestión de estiércol porcino), hasta 0,003 (obtenida en la muestra tomada 10 días después de la primera dosis de arcillas en la fase III).



**Fig. 3.16** Árbol filogenético de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) detectadas pertenecientes al Filo *Euryarchaeota*, basado en el análisis del algoritmo UPGUMA de la secuencia de nucleótido del gen parcial *ARNr 16S*. Se destacan con líneas rojas la baja similitud de algunos OTUs con las secuencias descritas.



**Tabla 3.14** Número de copias del gen *ARNr 16S*, determinado por PCR en tiempo real grupo-específico, a partir del ADN molde extraído de las muestras de la digestión de estiércol y de las muestras después de la adición de arcillas residuales.

Grupos microbianos	Número de copias del gen <i>ARNr 16S</i> (por mL <sup>-1</sup> )		
	Digestión de estiércol	Adición de arcillas	
		Tiempo (días) después de aplicar la 1 <sup>era</sup> dosis en la fase III	
		4	10
<b>Bacteria</b>	$(1,79 \pm 0,35) \times 10^6$	$(9,97 \pm 1,01) \times 10^5$	$(1,05 \pm 0,21) \times 10^6$
<b>Euryarchaeota</b>	$(1,48 \pm 0,78) \times 10^5$	$(1,79 \pm 0,56) \times 10^4$	$(3,63 \pm 0,62) \times 10^3$
<b>Methanobacteriales</b>	$(2,33 \pm 0,48) \times 10^2$	$(8,09 \pm 4,34) \times 10^1$	$(4,09 \pm 1,36) \times 10^1$
<b>Methanomicrobiales</b>	$(1,94 \pm 0,10) \times 10^2$	<i>nd</i>	<i>nd</i>
<b>Methanosarcinaceae</b>	$(8,69 \pm 6,50) \times 10^4$	$(5,89 \pm 4,24) \times 10^1$	<i>nd</i>
<b>Methanosaetaceae</b>	$(4,48 \pm 0,88) \times 10^3$	$(2,02 \pm 0,35) \times 10^4$	$(2,02 \pm 0,77) \times 10^3$

*nd: no detectado*

En la muestra de la digestión de estiércol, el 59 % del total de archaeas del filo Euryarchaeota cuantificadas, pertenecían a la familia Methanosarcinaceae. También, fueron cuantificadas archaeas metanógenas de la familia de Methanosaetaceae, y de los órdenes Methanobacteriales y Methanomicrobiales.

En la muestra tomada a los 4 días después de aplicada la primera dosis de arcillas, se observó una reducción de las archaeas metanógenas de la familia Methanosarcinaceae, por lo que las metanógenas de la familia Methanosaetaceae se vieron favorecidas y ocuparon más del 99 % de las archaeas del filo Euryarchaeota de la comunidad del reactor en ese momento. Algunas copias (menos del 1 %) del gen *ARNr 16S* de metanógenas del orden de Methanobacteriales, también fueron cuantificadas.

En la muestra tomada a los 10 días después de aplicada la primera dosis de arcillas, se observó una reducción de las archaeas, donde las metanógenas de la familia Methanosaetaceae ocuparon el 56 % del total de Euryarchaeotas y las metanógenas del orden Methanobacteriales se mantuvieron en el mismo orden de magnitud. En este caso, no fueron detectadas metanógenas del orden Methanomicrobiales, ni de la familia de Methanosarcinaceae.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz, con adición de arcillas residuales industriales. Ensayos en discontinuo

Los ensayos de digestión anaerobia en régimen discontinuo, conocidos también como “Pruebas de actividad metanogénica específica” (Soto *et al.*, 1993), permitieron determinar el potencial máximo de metano de los residuos orgánicos objeto de estudio, así como la viabilidad de los inóculos provenientes de lodos anaerobios de estiércol porcino para degradar estos residuos. También mostraron el efecto de las concentraciones de los sustratos que pueden resultar favorables o inhibitorias para las archaeas metanógenas en ambas condiciones de temperatura (Souto *et al.*, 2010).

Las actividades metanogénicas específicas (AME) obtenidas en los ensayos en discontinuo durante la digestión de estiércol porcino como monosustrato son similares ( $0,1-1,0 \text{ gCH}_4\text{-DOQ}\cdot\text{gSSV}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a las informadas por algunos autores cuando se degradan sustratos análogos (Soto *et al.*, 1993; Laubie *et al.*, 2010) (Fig. 3.1). Con la adición de paja de arroz (Fig. 3.1) y posteriormente de arcillas residuales (Fig. 3.3), los valores de AME fueron superiores a los alcanzados utilizando estiércol porcino (monosustrato), debido fundamentalmente al establecimiento de mejores condiciones nutritivas para el desarrollo de las archaeas metanógenas durante la codigestión (Souto *et al.*, 2010; Mata-Alvarez *et al.*, 2014).

Los potenciales de metano informados en la literatura para la digestión del estiércol porcino oscilan entre 300 y 360  $\text{L}_\text{N}\cdot\text{kgSV}^{-1}$  (Moller *et al.*, 2004). En este trabajo, el potencial de metano alcanzado con la digestión anaerobia de estiércol porcino como monosustrato (control) fue ligeramente inferior ( $285 \pm 21,3 \text{ mL}_\text{N}\cdot\text{gSV}^{-1}$ ). Este comportamiento se debe a las altas concentraciones de estiércol utilizadas en el estudio ( $36,6 \text{ gSTV}\cdot\text{L}^{-1}$ ), detectándose la inhibición de la metanogénesis a 55 °C, lo cual se corresponde con los bajos valores de AME mostrados en la Fig. 3.3. La inhibición de la metanogénesis en condiciones termofílicas tiene lugar debido a las altas concentraciones de amoníaco libre, pues aunque se adicionó la misma concentración de estiércol que en condiciones mesofílicas (igual contenido de nitrógeno total y amoniacal), la concentración de amoníaco libre es mayor a 55 °C, ya que a altas temperaturas se desplaza el equilibrio amonio  $\leftrightarrow$  amoníaco hacia la formación de amoníaco (Campos, 2001).

La adición de la paja de arroz como cosustrato a la digestión anaerobia de estiércol porcino aumentó el potencial de metano de este último entre 15-39 %, cuando se utilizaron concentraciones de paja entre 0,95 y 10,86 gSTV·L<sup>-1</sup> en ambas condiciones de temperatura (Tabla 3.2). Este resultado fue semejante al obtenido previamente por otros autores quienes demostraron incrementos del 10-13 % en el potencial teórico de metano, a partir de la adición de 10 kg de paja de trigo por cada tonelada de estiércol porcino o bovino digerido (Moller *et al.*, 2004), o incrementos del 10 % en la productividad de metano con la adición de 4,6 kg de paja de trigo por tonelada de estiércol porcino, en plantas de tratamiento que utilizan estiércol porcino como sustrato base (Wang *et al.*, 2009).

La caracterización de la paja de arroz (Tabla 3.1), sugiere que el aumento en la producción de metano con la codigestión, puede deberse al aporte de carbono de la paja de arroz al balance carbono/nitrógeno total (Alatríste-Mondragón *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2008; Kacprzak *et al.*, 2010; Molinuevo-Salces *et al.*, 2012; Mata-Alvarez *et al.*, 2014), pero además al aporte de micro y macronutrientes, fundamentalmente K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup>.

El aporte de minerales también tiene un efecto positivo sobre la formación de metano (Pereda *et al.*, 2006; Demirel y Scherer, 2011). Pocos autores han considerado en sus estudios el aporte de minerales de los cosustratos orgánicos. De hecho, en la mayoría de los informes que muestran las características de la paja de arroz, se hace énfasis en el contenido de lignina, celulosa, hemicelulosa, carbono orgánico total y nitrógeno total (Karimi *et al.*, 2006; Contreras *et al.*, 2012; Contreras, 2013), pero muy poco se dice acerca del contenido de minerales en estos residuos.

Este efecto positivo de la paja de arroz sobre la digestión anaerobia del estiércol porcino, constituye una alternativa racional para el manejo ecológico de este residuo. Baste decir que solo un 20 % de la producción mundial de paja de arroz es reutilizada (Zhao *et al.*, 2010; Hanafi *et al.*, 2012), la mayor parte queda en el campo como cobertura vegetal para los suelos o en muchas ocasiones es incinerada a campo abierto causando serios daños ambientales. Nuestro país no escapa a esta regularidad, una situación similar se aprecia en la Empresa Arrocería “Sur del Jibaro” de Sancti Spíritus (García-Rivero, 2010; Contreras, 2013), donde se recolectó la paja de arroz para este estudio.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con la codigestión de estiércol y paja, las concentraciones de amoníaco alcanzadas sobre todo en condiciones termofílicas resultaron inhibitorias para las archaeas metanógenas termófilas y en consecuencia disminuye la AME (Fig. 3.1). Estos resultados coinciden con lo informado en la literatura acerca de la inhibición por nitrógeno amoniacal en los sistemas de digestión anaerobia bajo condiciones termofílicas (Angelidaki y Ahring, 1994; Hansen *et al.*, 1999). Otros mecanismos propuestos para explicar la inhibición por amonio incluyen el cambio del pH intracelular, el incremento de la energía requerida para el mantenimiento o la inhibición de reacciones enzimáticas específicas (Whittmann *et al.*, 1995). El ion amonio y el amoníaco libre son las dos formas del nitrógeno amoniacal inorgánico en solución acuosa. El amoníaco libre puede ser una causa de inhibición, ya que puede difundir libremente a través de la membrana celular (Vigneron *et al.*, 2007). Los iones amonio difunden pasivamente a través de la membrana, lo que puede ocasionar desbalance de protones, deficiencia de potasio o desnaturalización de las proteínas (Gallert *et al.*, 1998).

Los argumentos anteriormente planteados justifican la necesidad de recurrir a otras estrategias que permitan utilizar altas cargas de estiércol en los digestores sin que tenga lugar la inhibición de la metanogénesis por el nitrógeno amoniacal. Las arcillas residuales pueden utilizarse para este fin, ya sea como superficie adsorbente de los iones amonio en disolución o como fuente de nutrientes en sistemas anaerobios para el tratamiento de estos residuos. El contenido de minerales observado en las arcillas (Tabla 3.1) puede sustentar lo anteriormente planteado, un resultado de esta índole fue obtenido por (Guerra *et al.*, 2003) empleando zeolitas naturales como una bomba dosificadora de iones amonio y como fuente de nutrientes salinos para la producción de celulasas en cultivos aerobios de *Trichoderma citrinoviride*.

El contenido de materia orgánica de las arcillas residuales mostrado en la tabla 3.1 se debe a la presencia de ciclo alcanos, parafinas y naftenos aromáticos, derivados de la contaminación con los aceites básicos del proceso industrial, lo cual justifica la no producción de metano cuando se utilizaron las arcillas como monosustrato en la digestión anaerobia. Estos compuestos no constituyen fuentes de carbono y energía de fácil metabolización y solo son biodegradados en condiciones determinadas con la presencia de microbiotas específicas (Leahy y Colwell, 1990; Holliger y Zehnder, 1996; Prince, 2005). Es por ello que las arcillas se emplearon solo como aditivo inorgánico.

Cuando se realizó el ensayo en discontinuo de la codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz, con la utilización de las arcillas como aditivo inorgánico, se obtuvo un incremento significativo en la actividad metanogénica específica en ambas condiciones de temperaturas, respecto al control (Fig. 3.3). El efecto estimulante de las arcillas no se debe a su contribución en materia orgánica, como se explicó anteriormente, sino que puede atribuirse a sus propiedades de intercambio iónico, que le permite adsorber iones amonio por reacciones de intercambio catiónico, de manera similar a lo informado para varios minerales como glauconita, bentonita y zeolitas naturales (clinoptilolita, mordenita) y modificadas (Angelidaki y Ahring, 1993; Hansen *et al.*, 1999; Milan *et al.*, 2001; Milan *et al.*, 2003; Montalvo *et al.*, 2005; Duran-Barrantes *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2008; Kotsopoulos *et al.*, 2008).

Las arcillas contienen varios cationes, fundamentalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabla 3.1), que pueden intercambiarse con los iones amonio presentes en el medio. Las propiedades adsorbentes de estas arcillas fueron evaluadas y analizadas mediante la Isoterma de Freundlich (Tabla 3.4), cuyo coeficiente  $K_f$  (1,43), fue similar a los descritos por Wang *et al.*, 2011 para las zeolitas modificadas ( $K_f = 1,13$ ) y los informados por Cooney *et al.*, 1999; Liu y Lo, 2001 para algunas zeolitas naturales ( $K_f = 1,10 - 1,30$ ).

La intensidad de la isoterma de adsorción ( $n = 1,29$ ) mostró la fortaleza de la unión adsorbente-adsorbido, similar también a lo encontrado por Wang *et al.*, 2011 empleando zeolitas modificadas ( $n = 1,90$ ) (Wang *et al.*, 2011). Por tanto, las arcillas residuales evaluadas en este trabajo, mostraron capacidad para adsorber los iones amonio en disolución, lo que permitió reducir las concentraciones de nitrógeno amoniacal del estiércol y con ello disminuir el efecto inhibitorio que ejercen sobre la producción de metano. Este resultado concuerda con otros autores que han utilizado zeolitas con este fin (Angelidaki y Ahring, 1993; Hansen *et al.*, 1998).

Los potenciales de metano (rendimiento en  $\text{mL}_N \cdot \text{gSV}^{-1}$ ), en condiciones normales de presión y temperatura, obtenidos utilizando concentraciones de arcillas de 0,8; 2,1 y 4,1  $\text{gSTT} \cdot \text{L}^{-1}$ , tanto en condiciones mesofílicas ( $361 - 424 \text{ mL}_N \cdot \text{gSV}^{-1}$ ), como en termofílicas ( $269 - 313 \text{ mL}_N \cdot \text{gSV}^{-1}$ ), resultaron superiores a los obtenidos por Hansen *et al.*, (1998) y Campos (2001) al digerir estiércol porcino con potenciales entre 66 y  $150 \text{ mL} \cdot \text{gSV}^{-1}$ .

Los valores obtenidos en condiciones mesofílicas también fueron superiores a los obtenidos por Moller *et al.*, (2004) durante la digestión de estiércol de cerdos en engorde ( $350 \text{ mL}_N \cdot \text{gSV}^{-1}$ ),

durante la digestión de estiércol de cerdas ( $300 \text{ mL}_N \cdot \text{gSV}^{-1}$ ) y durante la codigestión de estiércol de cerdos con paja de trigo ( $365 \text{ mL}_N \cdot \text{gSV}^{-1}$ ) (Moller *et al.*, 2004). Los altos potenciales de metano alcanzados en este estudio pueden atribuirse a los efectos beneficiosos de la sinergia de las mezclas con la codigestión (Campos, 2001; Lehtomaki *et al.*, 2007; Molinuevo-Salces *et al.*, 2012), y en general a las mejores condiciones de cultivo que incluyen el empleo de un medio de crecimiento cuya única fuente de carbono disponible estaba contenida en los sustratos estiércol porcino y paja de arroz, como se detalló en el epígrafe 2.2.2.

En estos ensayos en discontinuo, la producción de ácidos grasos volátiles (de 3 y 4 átomos de carbono) fue muy diferente a las dos temperaturas ensayadas (Fig. 3.4). La acumulación de ácido propiónico en las condiciones termofílicas, a altas concentraciones de arcillas, indicó la inhibición de la fase acetogénica a partir de la degradación del ácido propiónico. En cuanto a esto, diversos autores han relacionado el aumento de la presión parcial de hidrógeno con la acumulación de los ácidos propiónico y butírico (Fukuzaki *et al.*, 1990).

La presencia de las formas *iso* de los ácidos butírico y valérico se ha relacionado con el mal funcionamiento de reactores de tanque agitado en régimen continuo, a niveles de concentración por encima de  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Cobb y Hill, 1991) y el aumento de la fracción *iso* sobre la concentración total (suma de los dos isómeros) se ha asociado con el aumento de la presión parcial de hidrógeno en el reactor (Hill y Cobb, 1993). Por ello, una posible causa de la acumulación de ácido propiónico pudo ser el aumento de la presión parcial de hidrógeno, debido a un desequilibrio entre la formación y el consumo de este ácido motivado por una sobrecarga orgánica. Otra posible causa, pudo ser el aumento de la presión parcial de  $\text{CO}_2$ , ya que coincidió con una importante acumulación de este gas en el reactor. Algunos autores también han relacionado la presión parcial de  $\text{CO}_2$  con acumulaciones de ácido propiónico y en menor medida, con acumulaciones de ácido butírico e iso-butírico, aunque estos últimos no provocan la inhibición de los microorganismos consumidores de hidrógeno (Hansson y Molin, 1981).

En general, las concentraciones de ácidos grasos volátiles apreciadas en ambas condiciones de temperatura fueron inferiores a las informadas como inhibitorias de los procesos anaerobios (Fukuzaki *et al.*, 1990; Hyun *et al.*, 1998; Campos, 2001). Sin embargo, la concentración de ácido acético, ácido butírico y sobre todo la de ácido propiónico durante la aplicación de altas

concentraciones de arcillas ( $8,3 \text{ gSTT}\cdot\text{L}^{-1}$ ), en condiciones termofílicas, indicó la inhibición de la acetogénesis a partir del ácido propiónico.

#### **4.2 Optimización de la actividad metanogénica específica en la codigestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales**

Los resultados de los ensayos en régimen discontinuo, el efecto sobre la actividad metanogénica específica y la influencia de la temperatura sobre la asimilación de los sustratos, indicaron la pertinencia de optimizar esta actividad enzimática (responsable de la formación de  $\text{CH}_4$ ) mediante el diseño de un medio de codigestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales, con el empleo de lodo anaerobio de estiércol porcino como inóculo, en ambas condiciones de temperatura.

El efecto de la concentración de diferentes sustratos así como el efecto de su interacción sobre la actividad metanogénica específica ha sido muy poco estudiado y no se han encontrado informes en la literatura sobre la utilización de los sustratos objeto de estudio. El diseño de las combinaciones de mezcla con la utilización de la metodología de superficie de respuesta, permitió evaluar un amplio rango de concentraciones de los tres sustratos a la vez, en un número limitado de experimentos, aprovechando las ventajas que ofrece esta metodología (Montgomery, 2005; Xing *et al.*, 2008; Khalili y Bonakdarpour, 2010).

Las curvas de formación de metano (Fig. 3.5), el ANOVA y el análisis del porcentaje de contribución (PC) permitió discernir el efecto de cada sustrato y su interacción sobre la AME, marcado sobre todo por las diferencias obtenidas en cada condición de temperatura. Esto constituye una evidencia del efecto de la temperatura sobre la AME (Van Lier *et al.*, 1993), y por tanto sobre la comunidad procariota frente a diferentes concentraciones de sustratos de diversa tipología (Sanchez *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002).

Aunque la adecuación del modelo fue de mayor calidad en condiciones mesofílicas, donde se obtuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) superior, la cercanía de los valores de  $R^2$  y los coeficientes de determinación ajustados ( $R^2_{\text{adj}}$ ) respectivos, en cada condición de temperatura, mostró el fino ajuste de los modelos teniendo en cuenta el tamaño de muestra analizada y el número de componentes del modelo. Esto coincide con los altos valores de los coeficientes  $R^2$  y  $R^2_{\text{adj}}$  obtenidos por otros autores, que han utilizado con éxito, la metodología de superficie de

respuesta (Liu *et al.*, 2004; Yetilmezsoy *et al.*, 2009). Los demás estadígrafos descriptivos utilizados (coeficiente de correlación, R y Durbin-Watson) también evidenciaron la calidad del ajuste de los modelos en cada condición de temperatura.

Los valores de AME de los sistemas de digestión anaerobia de las diferentes combinaciones de mezcla mostraron un amplio rango en ambas condiciones de temperatura. Los resultados indicaron que la AME fue fuertemente afectada por los sustratos, aunque en ambas condiciones de temperatura no se observó un efecto aparente de la paja, debido probablemente a su compleja estructura lignocelulósica que limita la fase hidrolítica del proceso y por tanto retarda la metanogénesis (Zhang y Zhang, 1999; Mussatto *et al.*, 2008).

La paja mostró muy bajo efecto sobre la AME en condiciones termofílicas, donde se supone que las altas temperaturas favorecen la hidrólisis (Zhang y Zhang, 1999). Este comportamiento pudo deberse a que el tiempo de fermentación en discontinuo (21 días) no fue suficiente para una completa hidrólisis del material lignocelulósico, que impidió la biodisponibilidad del carbono contenido en la paja de arroz.

La representación gráfica de la superficie de respuesta (fig. 3.6 y 3.7) respaldó el efecto de los factores principales y su interacción sobre la actividad metanogénica específica (Adinarayana y Ellaiah, 2002; Yetilmezsoy *et al.*, 2009). Además, las superficies tridimensional (3D) y sus correspondientes contornos en un plano bidimensional (2D), facilitaron el análisis de manera más sencilla, del efecto de los tres sustratos sobre la AME (Wu *et al.*, 2009).

De esta manera, la naturaleza no lineal de todas las superficies de respuesta obtenidas y de sus respectivos contornos, demostraron la existencia de una interacción considerable entre los tres sustratos evaluados. En otras palabras, no existió una relación lineal entre las variables seleccionadas, lo cual corrobora la adecuación del modelo de segundo orden utilizado para estimar los valores de AME.

El principal factor que influyó sobre la AME fue la concentración de estiércol porcino, debido a que altas concentraciones de estiércol contienen concentraciones de nitrógeno amoniacal que pueden resultar inhibitorias para la comunidad microbiana relacionada con la obtención de metano, tal y como se ha discutido en este trabajo y ha sido informado por varios autores (Hansen *et al.*, 1998; Campos, 2001; Sung y Liu, 2003). Ante este fenómeno, se evidenció el efecto positivo de las arcillas residuales como adsorbente de iones amonio, lo que contrarresta su efecto



inhibitorio, comportamiento similar a lo obtenido por otros autores que han utilizado zeolitas naturales y modificadas, así como otros materiales arcillosos (Angelidaki y Ahring, 1993; Hansen *et al.*, 1999; Milan *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2005).

La utilización de la actividad metanogénica específica como criterio de optimización del medio de codigestión anaerobia de residuos orgánicos, constituye un paso clave para incrementar la producción de metano. El diseño compuesto central, el modelo estadístico y la metodología de superficie de respuesta resultaron herramientas poderosas para la optimización de esta actividad enzimática en la codigestión anaerobia de residuos de diferente naturaleza, tal y como se ha informado en la literatura (Bhunia y Ghangrekar, 2008; Wang y Wan, 2008).

En general, los valores de AME de los lodos obtenidos en la degradación de residuos orgánicos (estiércoles y residuos de naturaleza agrícola) en reactores anaerobios oscilan en un rango entre 0,1 y 1,0 gCH<sub>4</sub>-DOQ·gSSV·L<sup>-1</sup> según han planteado varios autores (Soto *et al.*, 1993; Riffat y Krongthamchat, 2007; Laubie *et al.*, 2010) y pueden ser mayores (entre 1,2 y 2,0 gCH<sub>4</sub>-DOQ·gSSV·L<sup>-1</sup>) solo cuando se utilizan sustratos más sencillos como el acetato y algunos ácidos grasos volátiles, que pueden utilizar directamente las archaeas metanógenas. Los valores máximos de AME obtenidos en este trabajo (1,31 y 1,38 gCH<sub>4</sub>-DOQ·gSSV·L<sup>-1</sup> en condiciones mesofílicas y termofílicas, respectivamente) y que fueron validados posteriormente son considerados valores altos. Por ello, el diseño del medio de codigestión de los sustratos evaluados resulta novedoso ya que permite optimizar la actividad metanogénica específica a valores superiores a los informados en la literatura cuando se degradan sustratos similares como es el caso de los residuos agropecuarios.

### **4.3 Estructura de la comunidad procariota responsable de la codigestión de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales en régimen discontinuo**

El cultivo de la microbiota obtenida con el medio optimizado en medios diferenciales permitió discernir entre los grupos de procariotas presentes en ambos ecosistemas (mesófilas y termófilas). El objetivo del ensayo de AME fue determinar el potencial metanogénico máximo de la biomasa celular, con la utilización de diferentes sustratos metanogénicos para a su vez diferenciar los principales grupos tróficos presentes. En general, las actividades hidrolíticas del lodo termófilo fueron similares a las informadas por otros autores (Soto *et al.*, 1993; López, 2000). Durante la codigestión de los tres sustratos en condiciones termofílicas, se detectó una alta actividad

celulolítica en medios con celulosa lo cual evidencia el desarrollo de una microbiota celulolítica. Estas bacterias celulolíticas deben ser bacterias termófilas del filo Firmicutes, ya que en los resultados del análisis molecular (T-RFLP), se obtuvieron fragmentos de 151 pb (Fig. 3.11a) que según Rademacher *et al.*, (2012) pertenecen a especies de *Clostridium*. Esto último se pudo afirmar debido a que en el presente trabajo se siguió el mismo protocolo utilizado por Rademacher *et al.*, (2012) para la caracterización molecular, que incluyó la librería de clones del gen *ARNr 16S* de bacterias y archaeas, empleando el mismo juego de cebadores para amplificar los genes de *ARNr 16S* y las mismas enzimas de restricción.

En cuanto a las poblaciones de archaeas, Rademacher *et al.*, (2012) también obtuvieron los fragmentos predominantes de 108, 339 y 629 pb en reactores termofilicos de cama empacada. Los ensayos posteriores de secuenciación revelaron que pertenecen a especies de los géneros *Methanosaetas*, *Methanothermobacter* y *Methanosarcinas*, repectivamente.

En los sistemas en mesofilia, el análisis de bacterias corroboró también la presencia de bacterias anaerobias hidrolíticas del filo Firmicutes, sobre todo especies de *Clostridium* de 231 pb, especies de *Fusobacteria* no cultivadas de 366 pb y bacterias del rumen no cultivadas de 201 pb, según se determinó después de analizar la librería de clones del gen *ARNr 16S* de bacterias (Fig. 3.11a).

Además, con la codigestión de los tres sustratos después de 21 días de incubación, aumentó la abundancia de los fragmentos de 162 pb, respecto a lo obtenido en la muestra inicial, los cuales corresponden a bacterias del orden Clostridiales (Rademacher *et al.*, 2012).

El filo Bacteroidetes, mantuvo un 40 % de la abundancia relativa (fragmentos: 89 y 97 pb) lo que demuestra que se favorece con la codigestión. Este filo Bacteroidetes, también fue encontrado predominante en reactores que degradan estiércol bovino antes y durante la codigestión con ensilaje de maíz, en condiciones mesofílicas (Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, no se ha informado el predominio de bacterias de este Filo en reactores que degraden el estiércol porcino.

En cuanto a las archaeas, con la codigestión (muestra final) a temperatura mesofílica, predominaron los fragmentos de 108 y 470 pb (Fig. 3.11b), que corresponden a las familias Methanosaetaceae y Methanosarcinaceae, respectivamente, mientras que a temperatura termofílica, abundaron las especies de *Methanothermobacter* y *Methanobacterium*, del orden Methanobacteriales (339 pb) y especies de *Methanosarcinas* (629 pb), similar a lo informado

previamente en la degradación de estiércol porcino (Boopathy, 1996) ya que forman parte de la microbiota intestinal de cerdos y por tanto se encuentran en sus heces fecales.

Los fragmentos de 343 pb fueron detectados en todos los casos (muestras iniciales y finales) (Fig. 3.11b), lo cual indica su estabilidad frente a cambios nutricionales y ambientales. Estos fragmentos pertenecen a especies del orden Methanobacteriales, similar a lo obtenido por otros autores en la caracterización molecular de la biota en reactores de membrana para la digestión de estiércol porcino (Padmasiri *et al.*, 2007).

Sin embargo, cuando se adicionaron los cosustratos (muestra final) en ambas condiciones de temperatura, la abundancia de estos fragmentos de 343 pb disminuyó, resultado que contrasta con lo informado por otros autores que han demostrado el predominio de los órdenes Methanobacteriales y Methanomicrobiales (Kim *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2012) en reactores en discontinuo para el tratamiento de residual porcino y en codigestión con gallinaza, respectivamente.

Los fragmentos de 108 pb resultaron predominantes sobre todo en mesofilia. Estos fragmentos pertenecen a especies de la familia Methanosaetaceae según Padmasiri *et al.*, (2007) y Rademacher *et al.*, (2012). Los fragmentos de 470 pb que también predominaron en condiciones mesofílicas, pertenecen a especies del orden Methanosarcinales pero de la familia Methanosarcinaceae según lo obtenido por Padmasiri *et al.*, (2007).

El crecimiento rápido sobre el sustrato acetato de sodio que se obtuvo durante los ensayos microbiológicos de crecimiento en medio con sustratos diferenciales (Fig. 3.9), confirma la prevalencia de estas archaeas metanógenas acetoclásticas.

La obtención de fragmentos de 470 pb en condiciones mesofílicas, con la adición de los tres sustratos y su abundancia relativa (40 %), se corresponde con el pronunciado crecimiento en metanol que se obtuvo en el ensayo de crecimiento en medio diferencial. Esto ayudó a dilucidar su correspondencia con las especies del orden Methanosarcinales, similar a lo obtenido por Kim *et al.*, (2010) en trabajos con cultivos puros de la especie *Metanosarcina Barkeri*.

Los fragmentos de 339 y 343 pb que predominaron en condiciones termofílicas, de conjunto con el crecimiento en formato/H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> obtenido también a esta temperatura (Fig. 3.9), indicó que estos fragmentos deben corresponder a especies de los órdenes Methanomicrobiales, Methanobacteriales o Methanococales, cuyos sustratos específicos los enmarcan dentro de las

archaeas metanógenas hidrogenotróficas. Algunas especies de estos órdenes, también se han encontrado en ecosistemas anaerobios donde se degrada el estiércol porcino como sustrato base (Kim *et al.*, 2010).

También se obtuvo cierta abundancia de los fragmentos de 431 pb en condiciones mesofílicas, con la adición de los tres sustratos (muestra final a 35 °C) (Fig. 3.11b). Kim *et al.*, (2010) y Padmasiri *et al.*, (2007) obtuvieron fragmentos de esta talla y los identificaron dentro del orden Methanomicrobiales.

Es de notar que la presencia de especies del orden Methanomicrobiales unido a la disminución de especies del orden Methanobacterales discutido anteriormente, está motivado probablemente por la competencia que se establece por el H<sub>2</sub> disponible. Esto concuerda con los resultados de otros autores que han constatado la relación entre estas archaeas hidrogenotróficas durante la arrancada de reactores que digieren aguas residuales porcinas (Cho *et al.*, 2013).

La presencia de los fragmentos de 108, 203 y 343 pb tanto en las muestras iniciales como en las muestras finales de ambas condiciones de temperatura (Fig. 3.11b), indica que son especies importantes y que forman parte de la estructura de la comunidad base, cuyo predominio varía en dependencia de la temperatura. Además, se detectó la presencia de fragmentos de 203 pb, cuya referencia filogenética no ha sido informada hasta la fecha.

El crecimiento en los medios diferenciales estuvo en concordancia con los resultados obtenidos en el análisis molecular con la utilización de la técnica de T-RFLP. En condiciones mesofílicas predominaron las archaeas metanógenas acetotróficas del orden de Methanosarcinales y en condiciones termofílicas predominaron las archaeas metanógenas hidrogenotróficas de los órdenes Methanomicrobiales, Methanobacterales.

Las actividades enzimáticas hidrolíticas, glucolíticas y metanogénicas (Fig. 3.8 y 3.9) resultaron variables a considerar en un sistema anaerobio ya que mostraron el comportamiento de la microbiota y el predominio de las poblaciones en determinadas condiciones de temperatura y variación nutricional, similar a lo informado por López (2000).

El análisis de la microbiota formadora de metano durante la codigestión de los tres sustratos, mostró el efecto de la temperatura en la diversidad y la estructura de la comunidad (Van Lier *et al.*, 1993). Con la codigestión, sobre todo en las archaeas, aumentó la abundancia relativa de

ciertas especies, dado por las nuevas condiciones nutricionales (adición de cosustratos y minerales) que favorecen el crecimiento y desarrollo de estas especies específicas.

#### **4.4 Codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas, en reactor de tipo tanque agitado en régimen semicontinuo**

La utilización de paja de arroz como cosustrato de la digestión anaerobia de estiércol porcino, bajo régimen semicontinuo, mostró un aumento de la producción volumétrica de metano, (Tabla 3.9), sobre todo cuando se empleó una relación de 1:1 de carga orgánica de estiércol y paja, respectivamente. En estas condiciones, la producción de metano aumentó en un 13 % con respecto a la utilización de estiércol como monosustrato, resultado que concuerda con lo obtenido en los ensayos en discontinuo. Otros autores han informado incrementos similares (en 10 %) en la producción de metano con la aplicación de cosustratos de naturaleza agrícola a la digestión anaerobia de estiércol porcino (Moller *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009).

El rendimiento de metano en la codigestión de estiércol y paja es similar al obtenido por Lehtomäki *et al.*, (2007) empleando estiércol vacuno con paja residual agrícola ( $210 \text{ L}\cdot\text{kgSV}^{-1}$ ), y al informado por Comino *et al.*, (2010) en ensayos de codigestión anaerobia de estiércol vacuno con mezcla de ensilaje de diferentes cultivos ( $237\text{-}249 \text{ L}\cdot\text{kgSV}^{-1}$ ).

No obstante, el rendimiento de metano pudo mejorarse con la reducción del tamaño de partícula de la paja, pues en el efluente fueron observadas partículas de aproximadamente 4-5 cm sin degradar. Un menor tamaño de partículas favorece la hidrólisis de los componentes del sustrato y una mejor transferencia de masa en el reactor. Esto se fundamenta en los trabajos realizados por otros autores quienes demostraron que el tamaño de partícula del sustrato tuvo un efecto importante en la producción de metano en sistemas de codigestión de estiércoles con residuos agrícolas (Wu *et al.*, 2010; Cuetos *et al.*, 2011).

La acumulación de paja en el reactor tuvo repercusión en la agitación del reactor, la cual fue aumentada de 50 a 80 rpm, después de la tercera semana de la codigestión. Esto presupone un efecto en la hidrodinámica del sistema e influye en la formación de los agregados microbianos que optimizan el proceso anaerobio, lo cual debe considerarse cuando se utiliza la paja de arroz como cosustrato en reactores a escala industrial. De hecho, la agitación máxima recomendada,

para la digestión anaerobia de residuos semisólidos en reactores de laboratorio tipo tanque agitado, está entre 50 y 100 rpm (VDI-4630, 2006; VDI-4631, 2011).

Teniendo en cuenta el resultado discutido anteriormente, acerca del escaso efecto aparente que tiene la paja sobre la actividad metanogénica específica, debido principalmente a su compleja estructura de lignocelulosa, (Zhang y Zhang, 1999; Mussatto *et al.*, 2008), y su efecto sobre la hidrodinámica del reactor de tanque agitado, dado por el tamaño de partícula (Wu *et al.*, 2010; Cuetos *et al.*, 2011), resulta conveniente practicar un pre-tratamiento físico-químico y/o biológico a la paja de arroz para aumentar la biodisponibilidad de sus componentes, sobre todo del carbono. Esto aumentaría mucho más la producción volumétrica de metano y aumentaría la eficiencia de conversión de la biomasa en metano y por tanto, su porcentaje en el biogás (Wu *et al.*, 2010; Cuetos *et al.*, 2011). No obstante, en este estudio se obtienen resultados prometedores cuando se aplica la paja como cosustrato con un aumento significativo del porcentaje de metano (54 %, Tabla 3.9).

Por otro lado, el efecto de la adición de arcillas residuales (con base bentonita) provenientes de la industria petroquímica, sobre la codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz, en régimen semicontinuo, no ha sido informado hasta la fecha. Los resultados obtenidos en este trabajo, han mostrado el efecto estimulante de las arcillas dado fundamentalmente por su capacidad de adsorber iones amonio y estabilizar el equilibrio amonio  $\leftrightarrow$  amoníaco, cuando se fermentan residuos ricos en nitrógeno amoniacal, como el estiércol porcino.

En general, el proceso discontinuo en condiciones termofílicas mostró menor viabilidad (menor rendimiento de metano y mayor acumulación de ácidos grasos volátiles) que el proceso en condiciones mesofílicas, resultado similar a lo obtenido por Campos (2001). Uno de las causas de este hecho es la inhibición por amoníaco que sufren las metanógenas a esta temperatura, cuando se degradan sustratos ricos en nitrógeno amoniacal, como el estiércol porcino (Hansen *et al.*, 1998; Sung y Liu, 2003).

En este trabajo, se evaluó la adición de arcillas a la codigestión de estiércol y paja en semicontinuo, sólo en condiciones mesofílicas, en primer lugar para evitar las altas concentraciones de amoníaco que pueden originarse por efecto de altas temperaturas (Angelidaki y Ahring, 1994; Boe y Angelidaki, 2009) y en segundo lugar con vistas a la futura aplicación de la tecnología en Cuba, un país tropical donde las condiciones climáticas favorecen el uso del

proceso en condiciones mesofílicas a un menor costo (Kaparaju *et al.*, 2009; Suryawanshi *et al.*, 2010; Angelidaki *et al.*, 2011).

Por otro lado, los residuos ganaderos presentan un alto nivel de alcalinidad, lo que los convierte en buenos sustratos base para la codigestión anaerobia (Campos, 2001). Sin embargo, en los casos con alto contenido en nitrógeno amoniacal, la gran capacidad tampón limita la capacidad de autorregulación del sistema enunciada por Angelidaki y Ahring (1993) ya que a pesar de acumularse grandes concentraciones de ácidos, no se produce una caída significativa del pH y por tanto la concentración de amoníaco se mantiene alta.

Con la primera adición de las arcillas residuales al reactor de tanque agitado, las concentraciones de nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_4^+$ ) dentro del reactor, disminuyeron drásticamente desde un valor promedio de 0,9 hasta 0,31  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Fig. 3.12). Esto puede atribuirse a la capacidad de las arcillas de adsorber iones amonio por intercambio catiónico discutido anteriormente y apoyado en las evidencias de varios autores, que han utilizado minerales arcillosos similares (Angelidaki y Ahring, 1993; Milan *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2005).

El empleo de arcillas provocó una disminución de la concentración de amoníaco libre ( $\text{NH}_3$ ), de 0,08 hasta 0,03  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , con lo cual después de la fase de latencia se estimuló el rendimiento de metano hasta sobrepasar los 350  $\text{L}_\text{N}\cdot\text{kgSV}^{-1}$  (Fig. 3.12). Sin embargo, la producción de metano no fue estable, el rendimiento comenzó a decaer y 11 días después de la aplicación de arcillas se redujo a los valores iniciales. Prueba de ello son las pequeñas variaciones de la relación AGVs/AT, que primero disminuye y luego tiende a aumentar, aunque en el rango de valores permisibles ( $< 0,3$ ) (VDI-4630, 2006).

La concentración de ácidos grasos volátiles mostró una tendencia a incrementarse, a partir de los 18 días después de aplicada las arcillas. No obstante, esto no tuvo repercusión en el pH, que no disminuyó de 7,4 incluso cuando la concentración de ácidos grasos volátiles fue la más alta detectada en esta fase I (1,99  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Esta baja concentración de ácidos grasos volátiles, está en correspondencia con los resultados de los ensayos en discontinuo (Fig. 3.4), e indican un buen funcionamiento del reactor, ya que son valores inferiores a los informados como inhibitorios de la digestión anaerobia (Fukuzaki *et al.*, 1990; Hyun *et al.*, 1998; Campos, 2001).

En otras palabras, la concentración de ácidos grasos volátiles relativamente estable, durante la operación del reactor, muestra la eficiente utilización metabólica de estos ácidos, llevada a cabo

por las archaeas metanógenas presentes, que como se discute más adelante, son principalmente, especies acetotróficas (utilizan acetato como fuente de carbono y energía).

En la fase II, se incrementó la carga orgánica de estiércol a  $1,5 \text{ gSV} \cdot \text{L}_{\text{react}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , en tales condiciones era de esperarse una mayor concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  (Fig. 3.12). Los resultados mostraron un rápido incremento en el rendimiento de metano, hasta alcanzar los  $500 \text{ L}_\text{N} \cdot \text{kgSV}^{-1}$ , que constituyó el mayor rendimiento en menos de 24 h. Este valor se considera alto para la digestión anaerobia de este tipo de residuos (Suryawanshi *et al.*, 2010), sin embargo, en esta ocasión el reactor no mostró una estabilidad en el rendimiento diario de metano. A pesar de ello, en esta fase, también se observó una disminución de las concentraciones de  $\text{N-NH}_4^+$ , pero en este caso no se afectaron las concentraciones de  $\text{NH}_3$  libre (Fig. 3.12).

Además, se detectó una disminución de la concentración de ácidos grasos volátiles, cuyos valores aumentaron nuevamente, después de 19 días de aplicadas las arcillas. Por tanto, la inestabilidad en el rendimiento diario de metano no debe ser atribuida a parámetros operacionales, sino a las condiciones nutricionales que requieren, sobre todo las archaeas metanógenas, donde se establece una competencia por el sustrato disponible. En estas condiciones, de relativamente bajas concentraciones de ácidos, el acetato es también limitado y por tanto, se favorecen las especies *Methanosaetas*, que tienen mayor afinidad por el acetato que *Methanosarcinas* (McMahon *et al.*, 2001; Leven *et al.*, 2007).

Durante la evaluación de los diferentes tiempos de retención hidráulica (de 30, 35 y 25 días), se pudo detectar un aumento en la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$ , dado por el incremento en la carga orgánica de estiércol que conllevó a un aumento del  $\text{NH}_3$  hasta  $0,16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Esto se correspondió con el valor más bajo de la relación de alcalinidades ( $\alpha = 0,65$ ) en ese período, que además coincidió con la más alta concentración de ácidos grasos volátiles ( $2,03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Fig. 3.12). Este breve desbalance de las variables, según lo recomendado para evaluar la calidad de la digestión anaerobia (VDI-4630, 2006; VDI-4631, 2011), explica el variable e inestable rendimiento de metano en este período.

La mayor estabilidad de las variables (VDI-4630, 2006; VDI-4631, 2011) se obtuvo a los 25 días de retención hidráulica, que resultó un tiempo menor que los utilizados para la codigestión de estiércoles con residuos agrícolas (Cuetos *et al.*, 2011).



Durante la fase III de aplicación de arcillas, se apreció nuevamente un incremento en el rendimiento de metano por encima de  $300 \text{ L}_N \cdot \text{kgSV}^{-1}$ , aunque este valor es menor que el alcanzado en la II fase, se logró mayor estabilidad en el rendimiento de metano, incluso hasta después de pasados los 30 días de adicionar las arcillas (Fig. 3.12).

De manera general, los valores de rendimiento de metano, alcanzados cuando se aplicaron las arcillas residuales, son del mismo orden de magnitud que los obtenidos en ensayos de codigestión anaerobia de estiércol porcino con cultivos energéticos (Cuetos *et al.*, 2011) o con residuos agrícolas (Suryawanshi *et al.*, 2010), donde los potenciales teóricos de metano son superiores debido a la mayor degradabilidad de los cosustratos empleados por estos autores respecto a la paja de arroz, cuyo contenido de lignina es mayor.

Los parámetros restantes se mantuvieron en rangos estables, indicando la estabilidad del reactor en la fase III (VDI-4630, 2006; VDI-4631, 2011). Un ejemplo de ello lo constituyó la baja concentración de ácidos grasos volátiles ( $< 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) que está relacionada con la prevalencia de archaeas metanógenas acetoclásticas del orden Methanosarcinales, familia Methanosaetaceae (Griffin *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2006).

Las concentraciones de  $\text{N-NH}_4^+$ , que habían aumentado con el largo periodo de codigestión estiércol-paja, mostraron un descenso más moderado, pero, a pesar de la alta carga de estiércol aplicada y las concentraciones de  $\text{N-NH}_4^+$ , no sobrepasaron los  $0,75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , niveles inferiores a los informados como inhibitorios (Angelidaki y Ahring, 1993; Hansen *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2008; Belmonte *et al.*, 2011). Este comportamiento se justifica por la capacidad de adsorción de las arcillas, discutida anteriormente.

Sin embargo, un ligero incremento en el  $\text{NH}_3$  libre fue detectado (por encima de  $0,15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), después de la segunda dosis de arcillas. Este valor pudo no ser tolerado por ciertas especies ya que se observó una disminución de la diversidad de bacterias después de este suceso, probablemente se trate de bacterias proteolíticas (Gallert *et al.*, 1998). Este resultado coincide con lo encontrado en otros estudios que identifican a  $0,15 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  como el valor máximo tolerable de  $\text{NH}_3$  libre (Kayhanian, 1999). También existen informes sobre un mayor nivel de tolerancia por parte de las metanógenas, con valores máximos de  $\text{NH}_3$  libre de hasta  $0,33 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  (Strik *et al.*, 2006).

En general, la estabilidad relativa del reactor unido al aumento en la producción de metano después de la aplicación de arcillas a intervalos definidos, demostró el efecto estimulante de esta sobre la comunidad procariota. Durante el proceso se aprecian cambios cualitativos y cuantitativos en la comunidad, que permitieron su “adaptación” a las condiciones ambientales y nutricionales impuestas por este aditivo inorgánico, donde se vieron favorecidos ciertos grupos microbianos. De esta manera, el estudio con enfoque polifásico que incluyó el uso de tres técnicas moleculares, permitió analizar la estructura de esta comunidad, su diversidad, dinámica, así como su cuantificación y filiación genética, durante la experimentación.

#### **4.5 Comunidad procariota desarrollada con la adición de paja de arroz y de arcillas en el reactor de tipo tanque agitado en régimen semicontinuo**

Los ensayos de optimización del medio de codigestión anaerobia de estiércol de los tres sustratos para maximizar los valores de AME y el análisis microbiológico y molecular de la comunidad microbiana generada en discontinuo, demostró que la adición del cosustrato paja de arroz y la adición de las arcillas residuales, debe responder a cada situación nutricional y ambiental dentro del reactor. Por ello es necesaria la correspondencia entre los parámetros operacionales del reactor y la estructura, diversidad y dinámica de la comunidad microbiana, antes y durante la aplicación de los cosustratos en régimen semicontinuo.

En concordancia con lo afirmado por algunos autores, la cuantificación de la comunidad microbiana según la técnica de q-PCR, reveló la existencia de un mayor número de bacterias que de archaeas dentro del reactor (Leven *et al.*, 2007) (Tabla 3.14), hecho que también se constató con las demás técnicas moleculares utilizadas. Esto se puede explicar si se tiene en cuenta que la digestión anaerobia para obtener metano ocurre en 4 etapas fundamentales (hidrolítica, acidogénica, acetogénica y metanogénica), tres de las cuales son realizadas por bacterias y solo la etapa metanogénica es realizada por las archaeas metanógenas (Madigan *et al.*, 2010).

Tanto el análisis de T-RFLP, como la librería de clones del gen *ARNr 16S*, mostraron que la diversidad de bacterias disminuyó a medida que se adicionó la arcilla al reactor. El índice de Jaccard y el perfil de fragmentos de restricción terminales de bacterias mostraron claramente, la dinámica de la comunidad dentro del reactor (Fig. 3.13).

Durante la digestión anaerobia de estiércol como monosustrato, predominaron las bacterias del filo Firmicutes, sin embargo con la adición de la paja y luego con la adición de las arcillas, las bacterias del filo Bacteroidetes aumentaron su abundancia relativa. Esto indica que la comunidad bacteriana puede adaptarse a los cosustratos pero su dinámica es fuertemente afectada por ellos, similar a lo informado cuando se adicionó pulpa de yuca a la digestión anaerobia de residuales porcinos en reactores de laboratorio tipo tanque agitado (Panichnumsin *et al.*, 2012).

Dentro del filo Firmicutes, las predominantes fueron las bacterias del orden *Clostridiales* (por ejemplo especies de *Clostridium*) y otras bacterias degradadoras de celulosa (Tabla 3.12). Esta diversidad reflejó la capacidad del inóculo de metabolizar un gran variedad de sustratos (proteínas, lípidos, azúcares, celulosas, etc.), sobre todo en las etapas hidrolíticas y acidógenicas (Leven *et al.*, 2007; Krakat *et al.*, 2011). El predominio del filo Firmicutes en estos ecosistemas, ha sido informado por varios autores, cuando se ha ensayado la digestión de estiércol porcino con la utilización de materiales lignocelulósicos como cosustrato (Li *et al.*, 2010; Wirth *et al.*, 2012), o durante la codigestión anaerobia de estiércol porcino con otros sustratos (Ren *et al.*, 2014).

El predominio de especies de este filo Firmicutes, durante la digestión de estiércol como monosustrato (Tabla 3.12) (Fig. 3.15), resulta similar a lo obtenido por varios autores (Li *et al.*, 2010; Wirth *et al.*, 2012), donde también se observó una amplia representación del filo Firmicutes. Asimismo, fueron dominantes especies degradadores de celulosa y lignocelulosa, principalmente de las familias Clostridiaceae (ejemplo: *Clostridium butyricum*, OTU\_32), Synthrophomonaceae y Ruminococcaceae (Brulc *et al.*, 2011).

Además, se detectaron bacterias proteolíticas como las especies de *Proteiniborus* (OTU\_29) (Niu *et al.*, 2008) y otras especies singulares que aparecieron fundamentalmente después de la aplicación de las arcillas, como *Cryptanaerobacter phenolicus* y *Sedimentibacter hydroxybenzoicus*, las cuales probablemente provengan de este sustrato de arcillas (residuos de la purificación de aceites básicos industriales extraídos del petróleo).

También se detectó la presencia de especies del género *Tepidanaerobacter* (*T. acetotoxydans*, OTU\_48) (Fig. 3.15), lo cual resultó interesante ya que estas solo han sido aisladas de ambientes termofílicos y realizan fundamentalmente el metabolismo del iso-butirato, el lactato y otros alcoholes (Sekiguchi *et al.*, 2006). Estas bacterias se aislaron después de añadidas las arcillas y

se han caracterizado por ser bacterias oxidadora de acetato, que toleran altas concentraciones de amonio (hasta  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (Sekiguchi *et al.*, 2006).

Las bacterias del filo Bacteroidetes ocuparon el 31 % del total de bacterias, y fueron detectadas, principalmente, en las muestras que reflejan la adición del cosustrato paja y las arcillas (Tabla 3.12) (Fig. 3.15). Se puede afirmar que la tercera parte de la comunidad de bacterias dentro del reactor fue dominada por este filo, después de aplicar las arcillas residuales, lo cual muestra su importante papel para estabilizar la comunidad después de un cambio en las condiciones nutritivas.

Varios autores han demostrado que las bacterias del filo Bacteroidetes predominan en reactores anaerobios, cuando se digieren residuos domésticos o residuos sólidos urbanos en condiciones mesofílicas (Leven *et al.*, 2007; Trzcinski *et al.*, 2010) y que constituyen las bacterias acidogénicas más representadas en otros ambientes anaerobios (Zhang *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2013). Sin embargo no se han encontrado informes que muestren la presencia de especies de este Filo en comunidades anaerobias que degraden estiércoles o residuos agrícolas.

Dentro de este filo Bacteroidetes, los OTU\_7 y OTU\_10, compuestos por clones aislados de las muestras de la codigestión de estiércol porcino y paja de arroz y de las muestras después de adicionar las arcillas al reactor, mostraron similitud con las especies *Proteiniphilum acetatigenes* (cepa TB107) (Fig. 3.15), que fue aislada de reactores de lecho de lodos de flujo ascendente que tratan aguas residuales de cervecería. Estas especies se caracterizan por degradar proteínas, aunque pueden utilizar el piruvato como fuente de carbono; sus principales productos son ácido acético y amoníaco y en menor cuantía el ácido propiónico (Chen y Dong, 2005).

Estos OTUs 7 y 10, también presentaron similitud con las especies *Paludibacter propionicigenes* (Ueki *et al.*, 2006; Gronow *et al.*, 2011) y *Bacteroides cellulosilyticus* (Robert *et al.*, 2007) (Fig. 3.15), que se caracterizan por fermentar celulosa, pero sobre todo utilizan como fuente de carbono la xilosa, manosa, galactosa, fructosa (principales componentes de la hemicelulosa); además pueden fermentar almidón, maltosa y melibiosa. Sus principales productos son ácido propiónico y en menor medida ácido acético y succínico.

Resulta también interesante, la similitud de los clones aislados en este estudio con la especie *Paludibacter propionicigenes* cepa WB4 (Fig. 3.15), pues esta fue aislada por primera vez en Japón del suelo de campos de arroz inundados. La presencia de esta especie en el reactor, después

de añadir la paja de arroz está ligada a la degradación de este cosustrato, lo cual resulta atractivo en la búsqueda de consorcios microbianos capaces de degradar compuestos lignocelulósicos, en aras de mejorar su degradabilidad anaerobia (Yan *et al.*, 2012).

Por otro lado, también se detectaron especies de *Psychrobacter* y *Succinivibrio* (OTUs\_067 y OTUs\_068), pertenecientes al filo Proteobacteria. Las especies de *Psychrobacter* fueron detectadas, solamente, en la muestra tomada 4 días después de aplicar la primera dosis de arcillas en la fase III y se presume que estén relacionadas con la degradación de glucosa en el sistema (Romanenko *et al.*, 2004). Las especies de *Succinivibrio* deben estar relacionadas con la baja concentración de nitrógeno y a la asimilación de este (Patterson y Hespell, 1985) por ello, sólo se detectó esta especie en la muestra tomada 4 días después de aplicar la primera dosis de arcillas en la fase III, donde las arcillas añadidas adsorben los iones amonio y por tanto disminuyen la concentración de estos en el medio.

Respecto a la comunidad de archaeas, el orden Methanosarcinales fue el que predominó en todas las muestras (Tabla 3.12), lo cual se corresponde con que el 70 % del metano es producido por metanógenas acetoclásticas a partir del acetato (Ahring, 2003; Karakashev *et al.*, 2005; Supaphol *et al.*, 2011). Este resultado contrasta con lo planteado por la mayoría de los autores, que aseveran que la digestión de estiércol porcino es dominada por las archaeas metanógenas hidrogenotróficas de los órdenes Methanomicrobiales y Metanobacteriales (Whitehead y Cotta, 1999; 2001; Snell-Castro *et al.*, 2005; Peu *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011), incluso cuando el estiércol se co-digiere con residuos agrícolas (Nettmann *et al.*, 2010; Jaenicke *et al.*, 2011).

De hecho, algunos autores consideran que las archaeas metanógenas del género *Methanoculleus*, pueden considerarse como marcadores de la digestión anaerobia de estiércol porcino, dado por su contribución a la metanogénesis (Barret *et al.*, 2012) o por su abundancia en estos ecosistemas (Patil *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2014).

En este estudio se pudo comprobar un cambio en el predominio de archaeas de la familia Methanosarcinaceae a la familia Methanosaetaceae, con la adición de paja y luego de la aplicación de arcillas, donde además se detectaron especies de *Methanobacterium*. Las especies de *Methanosaetas* utilizan el acetato como principal fuente de carbono (Smitha y Ingram-Smitha, 2007) lo que apunta que en este caso las especies *Methanosaetas* conducen la metanogénesis principalmente a partir de acetato, lo cual difiere con los hallazgos de otros autores que han

informado el predominio de las especies *Methanosarcina* en estos ambientes de (Leven *et al.*, 2007; Trzcinski *et al.*, 2010).

Este predominio de las especies *Methanosaetas* está relacionado con las bajas concentraciones de ácidos grasos volátiles (principalmente ácido acético) detectados en el reactor en comparación con otros estudios similares (McMahon *et al.*, 2001; Leven *et al.*, 2007). De acuerdo con algunos autores, se plantea que cuando las concentraciones de acetato se encuentran por encima de 250-500 mg·L<sup>-1</sup> se favorecen las especies de la familia Methanosarcinaceae, pero a concentraciones de acetato menores se favorecen las especies de la familia Methanosaetaceae (De Vrieze *et al.*, 2012), dado por la mayor afinidad de estas últimas por el acetato (McMahon *et al.*, 2001; Leven *et al.*, 2007).

Las bajas concentraciones de AGVs detectadas durante la operación de reactor puede estar relacionada con la presencia de la especie de bacteria *Acetobacterium* (OTUs\_019), perteneciente a la clase Clostridia, cuya actividad enzimática regula el acetato disponible (Biegel y Muller, 2011). Algunos autores han demostrado la relación directa entre el desarrollo de especies *Methanosaetas* y los cambios nutricionales que implican alguna variación en la concentraciones de ácidos grasos volátiles (Panichnumsin *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011).

En la muestra tomada 10 días después de aplicada la primera dosis de arcilla en la fase III, se detectaron especies de *Methanobacterium* (*M. petrolearium*) y especies de *Methanobrevibacter*. Estas pueden provenir de las arcillas, que como se había indicado anteriormente, son residuos de la purificación de aceites básicos industriales extraídos de derivados del petróleo.

El ligero incremento en las concentraciones de NH<sub>3</sub>, detectado en la muestra tomada 8 días después de aplicada la primera dosis de arcilla en la fase III, pudo provocar la disminución en el número de archaeas obtenidas, según la q-PCR, ya que precisamente las acetotróficas son las menos tolerantes a la inhibición por NH<sub>3</sub> (Hansen *et al.*, 1998; Kayhanian, 1999).

Existen resultados muy disimiles en cuanto a la prevalencia de especies de archaeas durante la digestión de estiércoles. De hecho, algunos autores aseveran que las especies *Methanosaetas* no predominan en la digestión de estiércol porcino, debido a su contenido de NH<sub>3</sub> (Karakashev *et al.*, 2005), de ahí que se encuentren otras especies como las de *Methanobrevibacter* u otras especies de archaeas metanógenas hidrogenotróficas que son menos sensibles a la inhibición por NH<sub>3</sub> (Song *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 2011).

Sin embargo, los resultados de este trabajo coinciden con lo obtenido por otros autores que también encontraron el predominio de *Methanosaetas* en reactores anaerobios donde se utilizan el estiércol porcino como sustrato base (Panichnumsin *et al.*, 2012) y apoya la teoría de su importante rol durante la formación de gránulos que permiten aumentar la eficiencia en la operación de reactores UASB durante la digestión anaerobia de aguas residuales porcinas (Song *et al.*, 2010).

En este trabajo, el predominio de *Methanosaetas* después de la adición de los cosustratos es un indicador del “buen balance” del proceso anaerobio (la metanogénesis, fundamentalmente) y de una producción de metano estable, con la adición a intervalos de las arcillas residuales. Estos resultados corroboran lo planteado por otros autores acerca de que la especie *Methanosaeta* puede considerarse un *indicador biológico* del buen funcionamiento en un reactor anaerobio con una producción de metano alta y estable (De Vrize *et al.*, 2013).

Sorpresivamente, se aislaron clones (OTU\_013) con alto grado de similitud (98 %) a la especie *Methanomassiliicoccus luminyensis* (Dridi *et al.*, 2012), que pertenecen a la clase de Methanomicrobia, pero no relacionada con ninguno de los órdenes descritos (Fig. 3.16). Esta especie, propuesta como representante de un nuevo género (Dridi *et al.*, 2012) fue aislada inicialmente de las heces fecales de humanos; forma metano a partir de metanol y requiere de tungsteno y selenito para su desarrollo. Su presencia en el reactor después de aplicar las arcillas residuales, las relaciona estrechamente con este sustrato.

## CONCLUSIONES

1. Las arcillas residuales estimularon la producción de metano por más de 20 días, dado por su capacidad para adsorber iones amonio en solución, lo que permite emplear mayores cargas orgánicas de estiércol porcino, sin la inhibición de las archaeas metanógenas.
2. El diseño del medio de codigestión de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales permitió optimizar la actividad metanogénica específica, cuyos valores de  $1,3 \text{ gCH}_4\text{-DQO}\cdot\text{gSSV}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  resultan superiores a los informados en la literatura para mezclas de sustratos similares. El medio formulado posibilita un mejor aprovechamiento de estas mezclas de residuos para la producción de metano.
3. La temperatura tuvo un efecto determinante sobre la composición de bacterias y archaeas durante la codigestión de estiércol porcino, paja de arroz y arcilla residual. En condiciones mesofílicas prevalecieron las archaeas metanógenas acetotróficas que fueron las responsables del incremento de metano, lo que facilita la implementación de estos sistemas de digestión anaerobia en las condiciones ambientales de nuestro país.
4. La adición de paja de arroz y arcillas residuales a la digestión de estiércol porcino provocó cambios en la diversidad y dinámica de la comunidad procariota, donde las poblaciones favorecidas fueron bacterias celulolíticas, especies del filo Bacteroidetes y especies de archaeas de la familia Methanosaetaceae. Esto constituye un aporte al estado actual del conocimiento sobre la estructura de estas comunidades procariotas y su dependencia de las interacciones tróficas.
5. Se encontraron siete secuencias del gen *ARNr 16S* de bacterias que participan en la digestión anaerobia de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales, las cuales difieren de las previamente descritas en los órdenes bacterianos conocidos. Se obtuvieron, además, dos secuencias del gen *ARNr 16S* de archaeas pertenecientes al orden Methanomicrobiales pero no relacionadas con ninguna de las familias anteriormente descritas. Este hallazgo contribuye al conocimiento sobre la diversidad de genes y/o de especies desarrolladas en sistemas anaerobios bajo condiciones nutricionales específicas.



## **RECOMENDACIONES**

- ✓ Continuar el estudio a nivel molecular para la identificación de los principales géneros y especies relacionadas con la producción de metano bajo las condiciones nutricionales evaluadas.
- ✓ Analizar la codigestión anaerobia de estiércol porcino y paja de arroz con adición de arcillas residuales a mayor escala.
- ✓ Analizar el efecto de las arcillas residuales sobre a la digestión anaerobia de otros sustratos ricos en nitrógeno amoniacal, teniendo en cuenta el aporte de minerales al proceso y el análisis de la comunidad procariota.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdo, Z., Schuette, U. M. E., Bent, S. J., Williams, C. J., Forney, L. J., Joyce, P. (2006). Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environ. Microbiol* 8: 929-938.
- Abril, D., Navarro, E., Abril, A. (2009). La paja de arroz. Consecuencias de su manejo y alternativas de aprovechamiento. *Agronomía* 17(2): 69 - 79.
- Adinarayana, K., Ellaiah, P. (2002). Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.* *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5: 272-278.
- Ahring, B. K. (1995). Methanogenesis in Thermophilic Biogas Reactors. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 67(1): 91-102.
- Ahring, B. K. (2003). Perspectives for anaerobic digestion. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 81: 1-30.
- Ahring, B. K., Angelidaki, I., Johansen, K. (1992). Anaerobic Treatment of Manure Together with Industrial-Waste. *Water Science and Technology* 25(7): 311-318.
- Ahring, B. K., Sandberg, M., Angelidaki, I. (1995). Volatile Fatty-Acids as Indicators of Process Imbalance Is Anaerobic Digesters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43(3): 559-565.
- Alatríste-Mondragon, F., Samar, P., Cox, H. H. J., Ahring, B. K., Iranpour, R. (2006). Anaerobic codigestion of municipal, farm, and industrial organic wastes: A survey of recent literature. *Water Environment Research* 78(6): 607-636.
- Almeida, A., Nafarrate-Rivera, E., Alvarado, A., Cervantes-Ovalle, A., Luevanos, M. P. E., Oropeza, R., Balagurusamy, N. (2011). Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. *Acta Química Mexicana: Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 3(6).
- Amann, R., Fuchs, B. M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology* 6(5): 339-348.
- Andrade, E., Solis, C., Aceves, J. M., Miranda, R., Cruz, J., Rocha, M. F., Zavala, E. P. (2008). Characterization of natural and modified zeolites using ion beam analysis techniques. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 266: 2379-2382.
- Angelidaki, I., Ahring, B. K. (1993). Thermophilic Anaerobic-Digestion of Livestock Waste - the Effect of Ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38(4): 560-564.
- Angelidaki, I., Ahring, B. K. (1994). Anaerobic Thermophilic Digestion of Manure at Different Ammonia Loads - Effect of Temperature. *Water Research* 28(3): 727-731.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L. (2003). Codigestion of manure and organic wastes in centralized biogas plants - Status and future trends. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 109(1-3): 95-105.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B. K. (1993). A Mathematical-Model for Dynamic Simulation of Anaerobic-Digestion of Complex Substrates - Focusing on Ammonia Inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 42(2): 159-166.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M., Stams, A. J. M. (2011). Biomethanation and Its Potential. *Methods in Enzymology: Methods in Methane Metabolism, Pt A* 494: 327-351.
- Anneli, P., Mette, T. H., Henrik, H. N., Anne-Belinda, T. (2007). Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean Biomass and Bioenergy 31: 812-819.

- APHA-AWWA-WEF, Ed. (2012). Standard Methods for examination of water and wastewater. Washington DC, USA, American Public Health Association.
- Barret, M., Gagnon, N., Morissette, B., Topp, E., Kalmokoff, M., Brooks, S., Matias, F., Massé, D., Masse, L., Talbot, G. (2012). Methanoculleus spp. as a biomarker of methanogenic activity in swine manure storage tanks. *FEMS Microbiol. Ecol* 80: 427-440.
- Barreto-Torrela, S. (2006). Estrategia para la inserción industrial de la digestión anaerobia en el desarrollo local. PhD, Universidad de Camagüey.
- Belmonte, M., Hsieh, C. F., Figueroa, C., Campos, J. L., Vidal, G. (2011). Effect of free ammonia nitrogen on the methanogenic activity of swine wastewater. *Electronic Journal of Biotechnology* 14(3).
- Bergmann, I., Mundt, K., Sontag, M., Baumstark, I., Nettmann, E., Klocke, M. (2010). Influence of DNA isolation on Q-PCR-based quantification of methanogenic Archaea in biogas fermenters. *Systematic and Applied Microbiology* 33(2): 78-84.
- Bhunia, P., Ghangrekar, M. M. (2008). Statistical modeling and optimization of biomass granulation and COD removal in UASB reactors treating low strength wastewaters. *Bioresource Technology* 99(10): 4229-4238.
- Biegel, E., Muller, V. (2011). A Na(+)-translocating Pyrophosphatase in the Acetogenic Bacterium *Acetobacterium woodii*. *Journal of Biological Chemistry* 286(8): 6080-6084.
- Blaut, M. (1994). Metabolism of methanogens Kluwer Academic Publishers Antoine van Leeuwenhoek 66: 187-208.
- Blume, F., Bergmann, I., Nettmann, E., Schelle, H., Rehde, G., Mundt, K., Klocke, M. (2010). Methanogenic population dynamics during semi-continuous biogas fermentation and acidification by overloading. *Journal of Applied Microbiology* 109(2): 441-450.
- Boe, K., Angelidaki, I. (2009). Serial CSTR digester configuration for improving biogas production from manure. *Water Research* 43(1): 166-172.
- Boone, D. R. (2001). Class I. Methanobacteria class. nov. . New York: , Springer Verlag.
- Boopathy, R. (1996). Isolation and characterization of a methanogenic bacterium from swine manure. *Bioresource Technology* 55(3): 231-235.
- Borja, R., Sanchez, E., Weiland, P. (1996). Influence of ammonia concentration on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Process Biochemistry* 31(5): 477-483.
- Borja, R., Sanchez, E., Weiland, P., Travieso, L., Martin, A. (1993). Effect of Natural Zeolite Support on the Kinetics of Cow Manure Anaerobic-Digestion. *Biomass & Bioenergy* 5(5): 395-400.
- Boursier, H., Béline, F., Paul, E. (2005). Piggery wastewater characterisation for biological nitrogen removal process design. *Bioresource Technology* 96(3): 351-358.
- Braun, R., Drog, B., Bochmann, G., Weiss, S., Kirchmayr, R. (2010). Recent Developments in Bio-Energy Recovery Through Fermentation. *Microbes at Work: From Wastes to Resources*: 35-58.
- Bruic, J. M., Yeoman, C. J., Wilson, M. K., Berg-Miller, M. E., Jeraldo, P., et al. (2011). Cellulosomics, a Gene-Centric Approach to Investigating the Intraspecific Diversity and Adaptation of *Ruminococcus flavefaciens* within the Rumen *PLoS ONE* 6(10): e25329.
- Butchaiah, G., Menke, C., Wassmann, R. (2009). Rice straw as a renewable energy source in India, Thailand, and the Philippines: Overall potential and limitations for energy contribution and greenhouse gas mitigation *Biomass and Bioenergy* 33: 1532-1546.

- Cabirol, N., Fernandez, F. J., Mendoza, L., Noyola, A. (2003). Acclimation of mesophilic anaerobic sludge to thermophilic conditions: PCR genera detection methodology. *Water Science and Technology* 48(6): 81-86.
- Campos, E., Flotats, X. (2003). Dynamic simulation of pH in anaerobic processes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 109(1-3): 63-76.
- Campos, P. A. E. (2001). Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante co-digestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria PhD thesis, Universitat de Lleida.
- Carballa, M., Smits, M., Etchebehere, C., Boon, N., Verstraete, W. (2011). Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89(2): 303-314.
- Cavinato, C., Fatone, F., Bolzonella, D., Pavan, P. (2010). Thermophilic anaerobic co-digestion of cattle manure with agro-wastes and energy crops: Comparison of pilot and full scale experiences. *Bioresource Technology* 101(2): 545-550.
- Cobb, S. A., Hill, D. T. (1991). Volatile Fatty-Acid Relationships in Attached Growth Anaerobic Fermenters. *Transactions of the Asae* 34(6): 2564-2572.
- Contreras, L. M. (2013). Digestión anaerobia de residuos de la agroindustria arrocera cubana para la producción de biogás. Tesis Doctoral, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- Contreras, L. M., Pereda-Reyes, I., Romero-Romero, O. (2012). Aprovechamiento energético de residuos arroceros por bioconversión. Caso de estudio Cuba. *Dina, Ingeniería e Industria* 2: 1-11.
- Cotta, M. A., Whitehead, T. R., Zeltwanger, R. L. (2003). Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Environmental Microbiology* 5(9): 737-745.
- Cruz, E., Martínez, V., Naranjo, R., Sosa, R. (2004). Evaluación microbiológica del efluente anaerobio de un biodigestor de cúpula fija. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 11(2): 89-95.
- Cuetos, M. J., Fernandez, C., Gomez, X., Moran, A. (2011). Anaerobic Co-digestion of Swine Manure with Energy Crop Residues. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16(5): 1044-1052.
- Culman, S. W., Bukowski, R., Gauch, H. G., Cadillo-Quiroz, H., Buckley, D. H. (2009). T-REX: Software for the Processing and Analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics* 10: 171.
- Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T. (2012). Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Review* 16: 1462-1476.
- Chao, R., Díaz, Y., Sosa, R., Pérez, A. A. (2011). Diseño y evaluación de un biodigestor tipo túnel. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 18(2): 150-153.
- Chao, R., Sosa, R., Cruz, E. (2007). Estudio del tratamiento del residual en una granja comercial de cebar cerdos *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 14(3): 245-248.
- Chellapandi, P., Prabakaran, D., Uma, L. (2010). Evaluation of Methanogenic Activity of Biogas Plant Slurry for Monitoring Codigestion of Ossein Factory Wastes and Cyanobacterial Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(2): 524-535.
- Chen, S. Y., Dong, X. Z. (2005). *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2257-2261.
- Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99(10): 4044-4064.

- Cho, K., Lee, J., Kim, W., Hwang, S. (2013). Behavior of methanogens during start-up of farm-scale anaerobic digester treating swine wastewater. *Process Biochemistry* 48: 1441-1445.
- De Vrieze, J., Hennebel, T., Boon, N., Verstraete, W. (2012). Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. *Bioresource Technology* 112: 1-9.
- Demirel, B., Scherer, P. (2011). Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass & Bioenergy* 35(3): 992-998.
- Després, V. R., Nowoisky, J. F., Klose, M., Conrad, R., Andreae, M. O., Pöschl, U. (2007). Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. *Biogeosciences* 4: 1127-1141.
- Dridi, B., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Raoult, D., Drancourt, M. (2012). Methanomassiliicoccus luminyensis gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(8): 1902-1907.
- Duran-Barrantes, M. M., Alvarez-Mateos, P., Carta-Escobar, F., Romero-Guzman, F., de Ursinos, J. A. F. R. (2008). Kinetics and Effect of Temperature in Anaerobic Fluidised Bed Reactors with Clayey Supports. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 22(4): 393-399.
- Duran-Barrantes, M. M., Alvarez-Mateos, P., Jimenez-Rodriguez, A., Romero-Guzman, F., de Ursinos, J. A. F. R. (2009). Anaerobic Treatment of Swine Wastewater in Semicontinuous Clayey Support Reactors. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 23(3): 385-391.
- Espinoza-Escalante, F. M., Pelayo-Ortiz, C., Navarro-Corona, J., Gonzalez-Garcia, Y., Borjes, A., Gutierrez-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 & Bioenergy* 33(1): 14-20.
- Fannin, K. F., Conrad, J. R., Srivastava, V. J., Chynoweth, D. P., Jerger, D. E. (1987). Anaerobic Processes. *Journal Water Pollution Control Federation* 59(6): 403-410.
- Fernández, A. S., Hashsham, S. A., Dollhopf, S. L., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F. B., Hickey, R. F., Criddle, C. S., Tiedje, J. M. (2000). Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 66(9): 4058-4067.
- Fernandez, N., Montalvo, S., Borja, R., Guerrero, L., Sanchez, E., Cortes, I., Colmenarejo, M. F., Travieso, L., Raposo, F. (2008). Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater. *Renewable Energy* 33(11): 2458-2466.
- Flotats, X., Bonmatí, A., Campos, E., Antúnez, M. (1999). Ensayos en discontinuo de codigestión anaerobia termofílica de purines de cerdo y lodos residuales. *Información Tecnológica* 10(1): 79-85.
- Freitag, T. E., Prosser, J. I. (2009). Correlation of Methane Production and Functional Gene Transcriptional Activity in a Peat Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 75(21): 6679-6687.
- Fujishima, S., Miyahara, T., Noike, T. (2000). Effect of moisture content on anaerobic digestion of dewatered sludge: ammonia inhibition to carbohydrate removal and methane production. *Water Science and Technology* 41(3): 119-127.
- Fukuzaki, S., Nishio, N., Shobayashi, M., Nagai, S. (1990). Inhibition of fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate and propionate. *Applied and environmental Microbiology Reports* 56(3): 719-723.

- Gallert, C., Bauer, S., Winter, J. (1998). Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50(4): 495-501.
- García-Rivero, A. (2010). Mejoramiento de la eficiencia energética y económica del CAI Arroceros Sur del Jíbaro mediante estudio de potenciales de ahorro por aprovechamiento energético de residuos. Tesis de Maestría, Universidad de Sancti Spiritus Jose Martí Pérez.
- Gavala, H. N., Yenal, U., Skiadas, I. V., Westermann, P., Ahring, B. K. (2003). Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. *Water Research* 37(19): 4561-4572.
- González-Fernández, C., García-Encina, P. A. (2009). Impact of substrate to inoculum ratio in anaerobic digestion of swine slurry. *Biomass & Bioenergy* 33(8): 1065-1069.
- González-Fernández, C., Leon-Cofreces, C., Garcia-Encina, P. A. (2008). Different pretreatments for increasing the anaerobic biodegradability in swine manure. *Bioresource Technology* 99(18): 8710-8714.
- González, H., Fernández, E., Collazo, Y. (1995). Nueva tecnología para el tratamiento de efluentes. *Revista Ingeniería Química* 312(4): 46-49.
- Griffin, M. E., McMahon, K. D., Mackie, R. I., Raskin, L. (1998). Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnology and Bioengineering* 57(3): 342-355.
- Gronow, S., Munk, C., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J. F., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Brambilla, E., Rohde, M., Goker, M., Detter, J. C., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P. (2011). Complete genome sequence of *Paludibacter propionicigenes* type strain (WB4(T)). *Standards in Genomic Sciences* 4(1): 36-44.
- Großkopf, R., Janssen, P. H., Liesack, W. (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol* 64: 960-969.
- Guardado-Chacón, J. A. (2007). Diseño y construcción de plantas de biogás sencillas. Ciudad de La Habana, Cuba, ed. CUBASOLAR.
- Guerra, G., Casado, G., Arguelles, J., Acebal, C., Castillon, P., Torrija, E., Diez, C., Gómez, B., Sánchez, M. I., León, T., Ramos-Leal, M. (2003). Zeolite as source of saline nutrients in solid state fermentation of sugar cane straw by *Trichoderma citrinoviride*. *Sugar Tech* 5(4): 243-248.
- Hanafi, E. M., El Khadrawy, H. H., Ahmed, W. M., Zaabal, M. M. (2012). Some Observations on Rice Straw with Emphasis on Updates of its Management. *World Applied Sciences Journal* 16 (3): 354-361.
- Hansen, K. H., Angelidaki, I., Ahring, B. K. (1998). Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by ammonia. *Water Research* 32(1): 5-12.
- Hansen, K. H., Angelidaki, I., Ahring, B. K. (1999). Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Research* 33(8): 1805-1810.
- Hansson, G. Y., Molin, N. (1981). End product inhibition in methane fermentations: Effects of Carbon Dioxide on Fermentative Acetogenic Bacteria. *European Journal Applied Microbiology and Biotechnology* 13: 242-247.

- Hashimoto, A. G. (1986). Ammonia Inhibition of methanogenesis from cattle wastes. *Agricultural Wastes* 17: 241-261.
- Hawkes, F. R., Guwy, A. J., Hawks, D. L., Rozzi, A. G. (1994). Online Monitoring of Anaerobic-Digestion - Application of a Device for Continuous Measurement of Bicarbonate Alkalinity. *Water Science and Technology* 30(12): 1-10.
- Heiermann, M., Budde, J., Suárez-Quñones, T., Kausmann, R., Pätzolt, K., Plöchl, M. (2011). Anaerobic digestion fundamentals and implementation in Germany. 1ra Conferencia Científica Internacional de la UNISS, YAYABOCIENCIA 2011. Universidad de Sancti Spíritus, Cuba.
- Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T. W., Chokhawala, H., Schroth, G., Luo, S., Clark, D. S., Chen, F., Zhang, T., Mackie, R. I., Pennacchio, L. A., Tringe, S. G., Visel, A., Woyke, T., Wang, Z., Rubin, E. M. (2011). Metagenomic discovery of biomass degrading genes and genomes from cow rumen. *Science* 331: 463-467.
- Hill, D. T., Cobb, S. A. (1993). Modeling Predictive Indicators in Animal Waste Methanogenesis. *Transactions of the Asae* 36(3): 879-885.
- Hinken, L., Urban, I., Haun, E., Urban, I., Weichgrebe, D., Rosenwinkel, K. H. (2008). The valuation of malnutrition in the mono-digestion of maize silage by anaerobic batch tests. *Water Science and Technology* 58(7): 1453-1459.
- Hofman-Bang, J., Zheng, D., Westermann, P., K.Ahring, B., Raskin, L. (2003). Molecular Ecology of Anaerobic Reactor Systems. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* T. Scheper. Germany Springer-Verlag Berlin Heidelberg 81.
- Holliger, C., Zehnder, A. J. B. (1996). Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 7(3): 326-330.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., Igarashi, Y. (2006). Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology* 72(2): 1623-1630.
- Hwu, C. S., Lettinga, G. (1997). Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges. *Enzyme and Microbial Technology* 21(4): 297-301.
- Hyun, S. H., Young, J. C., Kim, I. S. (1998). Inhibition kinetics for propionate degradation using propionate-enriched mixed cultures. *Water Science and Technology* 38(8-9): 443-451.
- Jaenicke, S., Ander, C., Bekel, T., Bisdorf, R., Droge, M., Gartemann, K. H., Junemann, S., Kaiser, O., Krause, L., Tille, F., Zakrzewski, M., Puhler, A., Schluter, A., Goesmann, A. (2011). Comparative and Joint Analysis of Two Metagenomic Datasets from a Biogas Fermenter Obtained by 454-Pyrosequencing. *Plos One* 6(1).
- Jarrell, K. F., Kalmok, M. L. (1988). Nutritional requirements of the methanogenic archaeobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 557-576.
- Jian Guang, L., Zhao, S. H., Zhang, L. H. (2012). Study on anaerobic digestion performance of kitchen wastes:inhibition of ammonia nitrogen and volatile acid on the anaerobic methanogenesis. *Advanced Materials Research* 347-353: 2497-2503.
- Kacprzak, A., Krzystek, L., Ledakowicz, S. (2010). Co-digestion of agricultural and industrial wastes. *Chemical Papers* 64(2): 127-131.
- Kaparaju, P., Ellegaard, L., Angelidaki, I. (2009). Optimisation of biogas production from manure through serial digestion: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology* 100(2): 701-709.

- Karakashev, D., Batstone, D. J., Angelidaki, I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1): 331-338.
- Karimi, K., Kheradmandinia, S., Taherzadeh, M. J. (2006). Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass Bioenergy* 30: 247-253.
- Kayhanian, M. (1999). Ammonia inhibition in high-solids biogasification: An overview and practical solutions. *Environmental Technology* 20(4): 355-365.
- Khalili, Z., Bonakdarpour, B. (2010). Statistical Optimization of Anaerobic Biological Processes for Dye Treatment. *Clean-Soil Air Water* 38(10): 942-950.
- Kim, M., Ahn, Y. H., Speece, R. E. (2002). Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. *Water Research* 36(17): 4369-4385.
- Kim, W., Lee, S., Shin, S. G., Lee, C., Hwang, K., Hwang, S. (2010). Methanogenic community shift in anaerobic batch digesters treating swine wastewater. *Water Research* 44(17): 4900-4907.
- Klocke, M., Mahnert, P., Mundt, K., Souidi, K., Linke, B. (2007). Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. *Systematic and Applied Microbiology* 30(2): 139-151.
- Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Souidi, K., Mumme, J., Linke, B. (2008). Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology* 31(3): 190-205.
- Kotsopoulos, T. A., Karamanlis, X., Dotas, D., Martzopoulos, G. G. (2008). The impact of different natural zeolite concentrations on the methane production in thermophilic anaerobic digestion of pig waste. *Biosystems Engineering* 99(1): 105-111.
- Krakat, N., Schmidt, S., Scherer, P. (2011). Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage. *Bioresource Technology* 102(10): 5692-5701.
- Krause, L., Diaz, N. N., Edwards, R. A., Gartemann, K. H., Kromeke, H., Neuweger, H., Puhler, A., Runte, K. J., Schluter, A., Stoye, J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Goesmann, A. (2008). Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 136(1-2): 91-101.
- Krylova, N. I., Khabibouline, R. E., Naumova, R. P., Nagel, M. A. (1997). The influence of ammonium and methods for removal during the anaerobic treatment of poultry manure. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 70(1): 99-105.
- Kugelman, I. J., Chin, K. K. (1971). Toxicity, Synergism, and Antagonism in Anaerobic Waste Treatment Processes. *Advances in Chemistry Series*(105): 55-&.
- Kumar, A., Miglani, P., Gupta, R. K., Bhattacharya, T. K. (2006). Impact of Ni(II), Zn(II) and Cd(II) on biogasification of potato waste. *Journal of Environmental Biology* 27(1): 61-66.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* G. M. Stackebrandt E. New York, Wiley: 115-147.
- Laubie, B., Buffière, P., Benbelkacem, H., Bayard, R. (2010). Anaerobic digestion in dry conditions: Influence of the moisture content on the specific methanogenic activity. 12th World Congress on Anaerobic Digestion. Guadalajara, Jalisco, Mexico, IWA.



- Lay, J. J., Li, Y. Y., Noike, T., Endo, J., Ishimoto, S. (1997). Analysis of environmental factors affecting methane production from high-solids organic waste. *Water Science and Technology* 36(6-7): 493-500.
- Leahy, J. G., Colwell, R. R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment *Microbiological reviews* 54(3): 305-315.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S. G., Hwang, S. (2008). Monitoring bacterial and archaeal community shifts in a mesophilic anaerobic batch reactor treating a high-strength organic wastewater. *Fems Microbiology Ecology* 65(3): 544-554.
- Lehtomaki, A., Huttunen, S., Rintala, J. A. (2007). Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio. *Resources Conservation and Recycling* 51(3): 591-609.
- Lei, Z. F., Chen, J. Y., Zhang, Z. Y., Sugiura, N. (2010). Methane production from rice straw with acclimated anaerobic sludge: Effect of phosphate supplementation. *Bioresource Technology* 101(12): 4343-4348.
- Leven, L., Eriksson, A. R. B., Schnurer, A. (2007). Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *Fems Microbiology Ecology* 59(3): 683-693.
- Li, L. H., Li, D., Sun, Y. M., Ma, L. L., Yuan, Z. H., Kong, X. Y. (2010). Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. *International Journal of Hydrogen Energy* 35(13): 7261-7266.
- Li, P., Wang, Y. X., Wang, Y. H., Liu, K., Tong, L. (2010). Bacterial community structure and diversity during establishment of an anaerobic bioreactor to treat swine wastewater. *Water Science and Technology* 61(1): 243-252.
- Li, Y. B., Park, S. Y., Zhu, J. Y. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 15(1): 821-826.
- Lim, J. W., Chen, C., Ho, I., Wang, J. (2013). Study of microbial community and biodegradation efficiency for single-and two-phase anaerobic co-digestion of brown water and food waste. *Bioresource Technology* 147: 193-201.
- Lindorfer, H., Corcoba, A., Vasilieva, V., Braun, R., Kirchmayr, R. (2008). Doubling the organic loading rate in the co-digestion of energy crops and manure - A full scale case study. *Bioresource Technology* 99(5): 1148-1156.
- Liu, H. L., Lan, Y. W., Cheng, Y. C. (2004). Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology *Process Biochemistry* 39: 1953-1961.
- López, M. (2000). Procedimiento de pretratamiento para mejorar la digestión anaerobia de residuos sólidos Tesis doctoral.
- López Planes, R. (1988). Diseño estadístico de experimentos, Editorial Científico Técnica.
- Lueders, T., Friedrich, M. (2000). Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol* 66: 2732-2742.
- Luo, A. C., Zhu, J., Ndegwa, P. M. (2002). Influence of anaerobic pre-conditioning on phosphorus removal in swine manure by aeration. *Water Air and Soil Pollution* 140(1-4): 219-230.
- Luostarinen, S., Luste, S., Sillanpaa, M. (2009). Increased biogas production at wastewater treatment plants through co-digestion of sewage sludge with grease trap sludge from a meat processing plant. *Bioresource Technology* 100(1): 79-85.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. Madrid, España, PEARSON Prentice Hall.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D., Clark, D. P. (2010). Brock: Biology of microorganisms San Francisco, USA, Benjamin Cummings.
- Mähnert, P. (2007). Kinetik der Biogasproduktion aus nachwachsenden Rohstoffen und Gülle. PhD, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Malin, C., Illmer, P. (2008). Ability of DNA content and DGGE analysis to reflect the performance condition of an anaerobic biowaste fermenter. *Microbiological Research* 163(5): 503-511.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol* 10: 1571-1581.
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M. S., Fonoll, X., Peces, M., Astals, S. (2014). A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 36: 412-427.
- McMahon, K. D., Stroot, P. G., Mackie, R. I., Raskin, L. (2001). Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions - II: Microbial population dynamics. *Water Research* 35(7): 1817-1827.
- McHugh, S., Carton, M., Collins, G., O'Flaherty, V. (2004). Reactor performance and microbial community dynamics during anaerobic biological treatment of wastewaters at 16-37 degrees C. *Fems Microbiology Ecology* 48(3): 369-378.
- Michaud, S., Bernet, N., Buffiere, P., Delgenes, J. P. (2005). Use of the methane yield to indicate the metabolic behaviour of methanogenic biofilms. *Process Biochemistry* 40(8): 2751-2755.
- Milan, Z., Montalvo, S., Ruiz-Tagle, N., Urrutia, H., Chamy, R., Sanchez, E., Borja, R. (2010). Influence of heavy metal supplementation on specific methanogenic activity and microbial communities detected in batch anaerobic digesters. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 45(11): 1307-1314.
- Milan, Z., Sanchez, E., Weiland, P., Borja, R., Martin, A., Ilangovan, K. (2001). Influence of different natural zeolite concentrations on the anaerobic digestion of piggery waste. *Bioresource Technology* 80(1): 37-43.
- Milan, Z., Villa, P., Sanchez, E., Montalvo, S., Borja, R., Ilangovan, K., Briones, R. (2003). Effect of natural and modified zeolite addition on anaerobic digestion of piggery waste. *Water Science and Technology* 48(6): 263-269.
- Molina-Muñoz, M. L. (2007). Estudio de los procesos microbianos implicados en el tratamiento de aguas residuales urbanas mediante biorreactores de membrana sumergida. PhD Thesis, Universidad de Granada.
- Molinuevo-Salces, B., Gonzalez-Fernandez, C., Gomez, X., Garcia-Gonzalez, M. C., Moran, A. (2012). Vegetable processing wastes addition to improve swine manure anaerobic digestion: Evaluation in terms of methane yield and SEM characterization. *Applied Energy* 91(1): 36-42.
- Moller, H. B., Sommer, S. G., Ahring, B. (2004). Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass & Bioenergy* 26(5): 485-495.
- Montalvo, S. (2012). Aplicación de las zeolitas naturales al tratamiento biológico de residuos. Congreso Latinoamericano de Prevención de Riesgos y Medio Ambiente Santiago de Chile, Chile.

- Montalvo, S., Diaz, F., Guerrero, L., Sanchez, E., Borja, R. (2005). Effect of particle size and doses of zeolite addition on anaerobic digestion processes of synthetic and piggery wastes. *Process Biochemistry* 40(3-4): 1475-1481.
- Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Travieso, L., Sanchez, E., Diaz, F. (2006). Use of natural zeolite at different doses and dosage procedures in batch and continuous anaerobic digestion of synthetic and swine wastes. *Resources Conservation and Recycling* 47(1): 26-41.
- Montgomery, D. C. (2005). *Design and Analysis of Experiments*. New Jersey, U.S.A, J. Wiley & Sons.
- Mumme, J., Linke, B., Tolle, R. (2010). Novel upflow anaerobic solid-state (UASS) reactor. *Bioresource Technology* 101(2): 592-599.
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Milagres, A. M. F., Roberto, I. C. (2008). Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain *Enzyme Microbiology and Technology* 43: 124-129.
- Myint, M., Nirmalakhandan, N., Speece, R. E. (2007). Anaerobic fermentation of cattle manure: Modeling of hydrolysis and acidogenesis. *Water Research* 41(2): 323-332.
- Narihiro, T., Sekiguchi, Y. (2007). Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. *Current Opinion in Biotechnology* 18(3): 273-278.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B., Klocke, M. (2008). Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *Journal of Applied Microbiology* 105(6): 1835-1850.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschufel, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., Klocke, M. (2010). Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76(8): 2540-2548.
- Nges, I. A., Escobar, F., Fu, X. M., Bjornsson, L. (2012). Benefits of supplementing an industrial waste anaerobic digester with energy crops for increased biogas production. *Waste Management* 32(1): 53-59.
- Nielsen, H. B., Mladenovska, Z., Westermann, P., Ahring, B. K. (2004). Comparison of two-stage thermophilic (68 degrees C/55 degrees C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55 degrees C) digestion of cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering* 86(3): 291-300.
- Niu, L. L., Song, L., Dong, X. Z. (2008). *Proteiniborus ethanoliaenes* gen. nov., sp nov., an anaerobic protein-utilizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 12-16.
- O'Flaherty, V., Collins, G., Kavanagh, S., McHugh, S., Connaughton, S., Kearney, A., Rice, O., Carrigg, C., Scully, C., Bhreathnach, N., Mahony, T., Madden, P., Enright, A. M. (2006). Accessing the black box of microbial diversity and ecophysiology: recent advances through poliphase experiments. *J. Environ. Sci. Health Tox Hazard Subst Environ Eng* 41: 897-922.
- Obaya-Abreu, M. C., Valdés-Jiménez, E., Valencia-Rodríguez, R., León-Pérez, O. L., Morales-Carmouse, M., Pérez-Bonachea, O., Díaz-Llanes, S., Valdivia-Roja, O. (2004). Tratamiento combinado de las vinazas de destilería y residuales azucareros en reactores UASB *Tecnología del Agua* 249: 78-85.
- Padmasiri, S. I., Zhang, J. Z., Fitch, M., Norddahl, B., Morgenroth, E., Raskin, L. (2007). Methanogenic population dynamics and performance of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water Research* 41(1): 134-144.
- Panichnumsin, P., Ahring, B., Nopharatana, A., Chaiprasert, P. (2012). Microbial community structure and performance of an anaerobic reactor digesting cassava pulp and pig manure. *Water Science & Technology* 66(7 ): 1590-1600.

- Panichnumsin, P., Nopharatana, A., Ahring, B., Chaiprasert, P. (2010). Production of methane by co-digestion of cassava pulp with various concentrations of pig manure. *Biomass & Bioenergy* 34(8): 1117-1124.
- Patil, S. S., Kumar, M. S., Ball, A. S. (2010). Microbial community dynamics in anaerobic bioreactors and algal tanks treating piggery wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(1): 353-363.
- Patterson, J. A., Hespell, R. B. (1985). Glutamine Synthetase Activity in the Ruminant Bacterium *Succinivibrio dextrinosolvens*. *Applied and Environmental Microbiology Reports* 50(4): 1014-1020.
- Pauss, A., Andre, G., Perrier, M., Guiot, S. R. (1990). Liquid-to-Gas Mass-Transfer in Anaerobic Processes - Inevitable Transfer Limitations of Methane and Hydrogen in the Biomethanation Process. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6): 1636-1644.
- Pavlostathis, S. G., Giraldo-Gómez, E. (1991). Kinetics of Anaerobic Treatment - a Critical-Review. *Critical Reviews in Environmental Control* 21(5-6): 411-490.
- Pereda, I., Irusta, R., Montalvo, S., del Valle, J. L. (2006). Solid mining residues from Ni extraction applied as nutrients supplier to anaerobic process: optimal dose approach through Taguchi's methodology. *Water Science and Technology* 54(9): 209-219.
- Peu, P., Brugere, H., Pourcher, A. M., Kerouredan, M., Godon, J. J., Delgenes, J. P., Dabert, P. (2006). Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5): 3578-3585.
- Pielou, E. C. (1966). The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Biol* 13: 131-144.
- Pobeheim, H., Munk, B., Johansson, J., Guebitz, G. M. (2010). Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage. *Bioresource Technology* 101(2): 836-839.
- Pobeheim, H., Munk, B., Lindorfer, H., Guebitz, G. M. (2011). Impact of nickel and cobalt on biogas production and process stability during semi-continuous anaerobic fermentation of a model substrate for maize silage. *Water Research* 45(2): 781-787.
- Prince, R. C., Ed. (2005). *Petroleum Microbiology* Washington DC, American Society of Microbiology Press.
- Pryde, S. E., Richardson, A. J., Stewart, C. S., Flint, H. J. (1999). Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12): 5372-5377.
- Pycke, B. F. G., Etchebehere, C., Van de Caveye, P., Negroni, A., Verstraete, W., Boon, N. (2011). A time-course analysis of four full-scale anaerobic digesters in relation to the dynamics of change of their microbial communities. *Water Science and Technology* 63(4): 769-775.
- Rademacher, A., Nolte, C., Schönberg, M., Klocke, M. (2012). Temperature increases from 55 to 75 °C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure. *Appl. Microbiol. Biotech* 96: 565-576.
- Rademacher, A., Zakrzewski, M., Schluter, A., Schonberg, M., Szczepanowski, R., Goesmann, A., Puhler, A., Klocke, M. (2012). Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* 79: 785-799.
- Ren, J., Yuan, X., Li, J., Ma, X., Zhao, Y., Zhu, W., Wang, X., Cui, Z. (2014). Performance and microbial community dynamics in a two-phase anaerobic co-digestion system using cassava dregs and pig manure. *Bioresource Technology* 155: 342-351.

- Riffat, R., Krongthamchat, K. (2007). Anaerobic treatment of high-saline wastewater using halophilic methanogens in laboratory-scale anaerobic filters. *Water Environment Research* 79(2): 191-198.
- Rincon, B., Borja, R., Gonzalez, J. M., Portillo, M. C., Saiz-Jimenez, C. (2008). Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue. *Biochemical Engineering Journal* 40(2): 253-261.
- Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., Li, T., Camacho, P., Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *Isme Journal* 3(6): 700-714.
- Robert, C., Chassard, C., Lawson, P. A., Bernalier-Donadille, A. (2007). *Bacteroides cellulosilyticus* sp nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1516-1520.
- Rodríguez, D. C., Belmonte, M., Peñuela, G., Campos, J. L., Vidal, G. (2011). Behavior of molecular weight distribution for the pig slurry liquid fraction treated by anaerobic digestion *Environmental Technology Letters* 32(4): 419-425.
- Romanenko, L. A., Lysenko, A. M., Rohde, M., Mikhailov, V. V., Stackebrandt, E. (2004). *Psychrobacter maritimus* sp. nov. and *Psychrobacter arenosus* sp. nov., isolated from coastal sea ice and sediments of the Sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1741-1745.
- Sanchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L., Martin, A. (2001). Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate. *Process Biochemistry* 37(5): 483-489.
- Sanz, J. L., Kochling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* 42(2): 119-133.
- Sasaki, K., Morita, M., Hirano, S., Ohmura, N., Igarashi, Y. (2011). Decreasing ammonia inhibition in thermophilic methanogenic bioreactors using carbon fiber textiles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(4): 1555-1561.
- Schnurer, A., Nordberg, A. (2008). Ammonia, a selective agent for methane production by syntrophic acetate oxidation at mesophilic temperature. *Water Science and Technology* 57(5): 735-740.
- Schütte, U. M. E., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D., Forney, L. J. (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 365-380.
- Sekiguchi, Y., Imachi, H., Susilorukmi, A., Muramatsu, M., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y. (2006). *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1621-1629.
- Shannon, C. E., Weaver, W., Eds. (1963). *The mathematical theory of communication*. Urbana, IL, University of Illinois Press.
- Shima, S., Krueger, M., Weinert, T., Demmer, U., Kahnt, J., Thauer, R. K., Ermler, U. (2012). Structure of a methyl-coenzyme M reductase from Black Sea mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* 481(7379): 98-101.

- Sipos, R., Szekely, A. J., Palatinszky, M., Revesz, S., Marialigeti, K., Nikolausz, M. (2007). Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol. Ecol* 60: 341-350.
- Smith, C. J., Danilowicz, B. S., Clear, A. K. F., Costello, J., Wilson, B., Meijer, W. G. (2005). T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiol. Ecol* 54: 375-380.
- Smitha, K. S., Ingram-Smitha, C. (2007). Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol* 15: 150-155.
- Snell-Castro, R., Godon, J. J., Delgenes, J. P., Dabert, P. (2005). Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. *Fems Microbiology Ecology* 52(2): 229-242.
- Solera, R., Romero, L. I., Sales, D. (2002). The evolution of Biomass in a two-phase anaerobic treatment process during start-up. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 16(1): 25-29.
- Song, M., Shin, S. G., Hwang, S. (2010). Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Bioresource Technology* 101: S23-S28.
- Sosa, R., Sánchez, E., Montalvo, S., Chao, R., Sáez, Y. (2005). Gas production in tubular biodigesters. Effect of dimensions at 25 days of hydraulic retention time. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 12(3): 219-222.
- Soto, M., Mendez, R., Lema, J. M. (1993). Methanogenic and Non-Methanogenic Activity Tests - Theoretical Basis and Experimental Set-Up. *Water Research* 27(8): 1361-1376.
- Souto, T. F., Aquino, S. F., Silva, S. Q., Chernicharo, C. A. L. (2010). Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation* 21(3): 411-424.
- St-Pierre, B., Wright, A. D. G. (2014). Comparative metagenomic analysis of bacterial populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 2709-2717.
- Stams, A. J. M. (1994). Metabolic Interactions between Anaerobic-Bacteria in Methanogenic Environments. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 66(1-3): 271-294.
- Stams, A. J. M., Oude-Elferink, S. J. W. H., Westermann, P. (2003). Metabolic Interactions Between Methanogenic Consortia and Anaerobic Respiring Bacteria. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. Springer. Berlin, Germany, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Biomethanation I: 32.
- Strik, D. P. B. T. B., Domnanovich, A. M., Holubar, P. (2006). A pH-based control of ammonia in biogas during anaerobic digestion of artificial pig manure and maize silage. *Process Biochemistry* 41(6): 1235-1238.
- Sung, S. W., Liu, T. (2003). Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere* 53(1): 43-52.
- Supaphol, S., Jenkins, S. N., Intomo, P., Waite, I. S., O'Donnell, A. G. (2011). Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresource Technology* 102(5): 4021-4027.
- Suryawanshi, P. C., Chaudhari, A. B., Kothari, R. M. (2010). Mesophilic anaerobic digestion: first option for waste treatment in tropical regions. *Critical Reviews in Biotechnology* 30(4): 259-282.

- Tabatabaei, M., Rahim, R. A., Abdullah, N., Wright, A. D. G., Shirai, Y., Sakai, K., Sulaiman, A., Hassan, M. A. (2010). Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. *Process Biochemistry* 45(8): 1214-1225.
- Tada, C., Yang, Y., Hanaoka, T., Sonoda, A., Ooi, K., Sawayama, S. (2005). Effect of natural zeolite on methane production for anaerobic digestion of ammonium rich organic sludge. *Bioresource Technology* 96(4): 459-464.
- Takashima, M., Shimada, K., Speece, R. E. (2011). Minimum Requirements for Trace Metals (Iron, Nickel, Cobalt, and Zinc) in Thermophilic and Mesophilic Methane Fermentation from Glucose. *Water Environment Research* 83(4): 339-346.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M. F., Masse, D. I. (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research* 42(3): 513-537.
- Tang, Y. Q., Shigematsu, T., Morimura, S., Kida, K. (2005). Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(2): 150-164.
- Trzcinski, A. P., Ray, M. J., Stuckey, D. C. (2010). Performance of a three-stage membrane bioprocess treating the Organic Fraction of Municipal Solid Waste and evolution of its archaeal and bacterial ecology. *Bioresource Technology* 101(6): 1652-1661.
- Ueki, A., Akasaka, H., Suzuki, D., Ueki, K. (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: 39-44.
- Ulmanu, M., Maranon, E., Fernandez, Y., Castrillon, L., Anger, I., Dumitriu, D. (2003). Removal of copper and cadmium ions from diluted aqueous solutions by low cost and waste material adsorbents. *Water Air and Soil Pollution* 142(1-4): 357-373.
- Ungerfeld, E. M., Rust, S. R., Boone, D. R., Liu, Y. (2004). Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens *Journal of Applied Microbiology* 97: 520-526.
- Vallero, M. V. G., Lettinga, G., Lens, P. N. L. (2003). Long-term adaptation of methanol-fed thermophilic (55 degrees C) sulfate-reducing reactors to NaCl. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30(6): 375-382.
- Van Lier, J. B., Hulsbeek, J., Stams, A. J. M., Lettinga, G. (1993). Temperature Susceptibility of Thermophilic Methanogenic Sludge - Implications for Reactor Start-up and Operation. *Bioresource Technology* 43(3): 227-235.
- Vanotti, M. B., Szogi, A. A., Hunt, P. G., Millner, P. D., Humenik, F. J. (2007). Development of environmentally superior treatment system to replace anaerobic swine lagoons in the USA. *Bioresource Technology* 98(17): 3184-3194.
- Vavilin, V. A., Fernandez, B., Palatsi, J., Flotats, X. (2008). Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management* 28(6): 941-953.
- VDI-4630 (2006). *Vergärung organischer Stoffe; Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche* (Fermentation of organic materials; Characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests). *Fermentation Tests*. Berlin Beuth Verlag.
- VDI-4631 (2011). *Gütekriterien für Biogasanlagen* (Quality criteria for biogas plants). Berlin Beuth Verlag.

- Verstraete, W., Morgan-Sagastume, F., Aiyuk, S., Waweru, M., Rabaey, K., Lissens, G. (2005). Anaerobic digestion as a core technology in sustainable management of organic matter. *Water Science and Technology* 52(1-2): 59-66.
- Vigneron, V., Bureau, C., Bernet, N., Bouchez, T. (2007). Effect of ammonia on the methanogenic diversity and activity in simulated MSW bioreactor landfills. *Proceedings Sardinia 2007, Eleventh International Waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy.*
- Wang, G., Gavala, H. N., Skiadas, I. V., Ahring, B. K. (2009). Wet explosion of wheat straw and codigestion with swine manure: Effect on the methane productivity. *Waste Management* 29(11): 2830-2835.
- Wang, H., Tolvanen, K., Lehtomaki, A., Puhakka, J., Rintala, J. (2010). Microbial community structure in anaerobic co-digestion of grass silage and cow manure in a laboratory continuously stirred tank reactor. *Biodegradation* 21(1): 135-146.
- Wang, J. L., Wan, W. (2008). Optimization of fermentative hydrogen production process by response surface methodology. *International Journal of Hydrogen Energy* 33(23): 6976-6984.
- Wang, Q. H., Yang, Y. N., Yu, C., Huang, H., Kim, M., Feng, C. P., Zhang, Z. Y. (2011). Study on a fixed zeolite bioreactor for anaerobic digestion of ammonium-rich swine wastes. *Bioresource Technology* 102(14): 7064-7068.
- Wang, X., Niu, D. J., Yang, X. S., Zhao, Y. C. (2008). Optimization of methane fermentation from effluent of bio-hydrogen fermentation process using response surface methodology. *Bioresource Technology* 99(10): 4292-4299.
- Wang, Y., Lin, F., Pang, W. (2008). Ion exchange of ammonium in natural and synthesized zeolites *Journal of Hazardous Materials* 160: 371-375.
- Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J., Jones, D. L. (2008). Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology* 99(17): 7928-7940.
- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(4): 849-860.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol* 173: 697-703.
- Whitehead, T. R., Cotta, M. A. (1999). Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits. *Fems Microbiology Letters* 179(2): 223-226.
- Whitehead, T. R., Cotta, M. A. (2001). Characterisation and comparison of microbial populations in swine faeces and manure storage pits by 16S rDNA gene sequence analyses. *Anaerobe* 7(4): 181-187.
- Whitehead, T. R., Cotta, M. A. (2001). Sequence analyses of a broad host-range plasmid containing *ermT* from a tylosin-resistant *Lactobacillus* sp isolated from swine feces. *Current Microbiology* 43(1): 17-20.
- Whittmann, C., Zeng, A. P., Deckwer, W. D. (1995). Growth inhibition by ammonia and use of pH-controlled feeding strategy for the effective cultivation of *Mycobacterium chlorophenicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44: 519-525.
- Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K. L. (2012). Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol. Biofuels* 5: 41.



- Wittebolle, L., Marzorati, M., Clement, L., Balloi, A., Heylen, K., De Vos, P., Daffonchio, D., Verstraete, W., Boon, N. (2009). Initial species evenness favours functionality under selective stress *Nature* 458: 623-626.
- Wu, D., Zhou, J., Li, Y. (2009). Effect of the sulfidation process on the mechanical properties of a CoMoP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> hydrotreating catalyst. *Chemical Engineer Science* 64: 198-206.
- Wu, X., Yao, W. Y., Zhu, J., Miller, C. (2010). Biogas and CH<sub>4</sub> productivity by co-digesting swine manure with three crop residues as an external carbon source. *Bioresource Technology* 101(11): 4042-4047.
- Xia, Y., Masse, D. I., McAllister, T. A., Beaulieu, C., Ungerfeld, E. (2012). Anaerobic digestion of chicken feather with swine manure or slaughterhouse sludge for biogas production. *Waste Management* 32(3): 404-409.
- Xia, Y., Masse, D. I., McAllister, T. A., Kong, Y., Seviour, R., Beaulieu, C. (2012). Identity and diversity of archaeal communities during anaerobic co-digestion of chicken feathers and other animal wastes. *Bioresource Technology* 110: 111-119.
- Xing, W., Dong-Jie, N., Xiao-Shuang, Y., You-Cai, Z. (2008). Optimization of methane fermentation from effluent of bio-hydrogen fermentation process using response surface methodology. *Bioresource Technology* 99: 4292-4299.
- Yan, L., Gao, Y., Wang, Y., Liu, Q., Sun, Z., Fu, B., Wen, X., Cui, Z., Wang, W. (2012). Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. *Bioresource Technology* 111: 49-54.
- Yanfeng, H., Pang, Y. Z., Liu, Y. P., Li, X. J., Wang, K. S. (2008). Physicochemical characterization of rice straw pretreated with sodium hydroxide in the solid state for enhancing biogas production. *Energy & Fuels* 22(4): 2775-2781.
- Yeritsyan, H. N., Nickoghosyan, S. K., Sahakyan, A. A., Harutunyan, V. V., Hakhverdyan, E. A., Grigoryan, N. E. (2008). Comparative analyses of physical properties of natural zeolites from Armenia and USA *Studies in Surface Science and Catalysis* 174: 529-532.
- Yetilmezsoy, K., Demirel, S., Vanderbei, R. J. (2009). Response surface modeling of Pb(II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera L.*: Box-Behnken experimental design. *Journal of Hazardous Materials* 171: 551-562.
- Yu, Y., Kim, J., Hwang, S. (2006). Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: Population dynamics and community structures. *Biotechnology and Bioengineering* 93(3): 424-433.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89(6): 670-679.
- Yu, Y., Park, B., Hwang, S. (2004). Co-digestion of lignocellulosics with glucose using thermophilic acidogens. *Biochemical Engineering Journal* 18(3): 225-229.
- Zhang, B., Zhe, C., Qiu, Z. G., Jin, M., Chen, Z. Q., Chen, Z. L., Li, J. W., Wang, X., Wang, J. F. (2011). Dynamic and distribution of ammonia-oxidizing bacteria communities during sludge granulation in an anaerobic-aerobic sequencing batch reactor. *Water Research* 45(18): 6207-6216.
- Zhang, D. D., Li, J., Guo, P., Li, P. P., Suo, Y. L., Wang, X. F., Cui, Z. J. (2011). Dynamic transition of microbial communities in response to acidification in fixed-bed anaerobic baffled reactors (FABR) of two different flow directions. *Bioresource Technology* 102(7): 4703-4711.

- Zhang, R. H., Zhang, Z. Q. (1999). Biogasification of rice straw with an anaerobic-phased solids digester system. *Bioresource Technology* 68(3): 235-245.
- Zhao, R., Zhang, Z., Zhang, R., Li, M., Lei, Z., Utsumi, M., Sugiura, N. (2010). Methane production from rice straw pretreated by a mixture of acetic-propionic acid. *Bioresource Technology* 101,: 990-994.
- Zhu, C. G., Zhang, J. Y., Tang, Y. P., Xu, Z. K., Song, R. T. (2011). Diversity of methanogenic archaea in a biogas reactor fed with swine feces as the mono-substrate by *mcrA* analysis. *Microbiological Research* 166(1): 27-35.