



**DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFIA, MINERALOGIA Y QUIMICA  
AGRÍCOLA**

**TESIS DOCTORAL**

**EVALUACIÓN DE BIOINDICADORES DE CONTROL PARA POBLACIONES  
MICROBIANAS EN DIGESTORES ANAEROBIOS**

**Presentada por Ary Mauricio Burbano para optar al grado de doctor por la  
universidad de Sevilla**

**Sevilla, junio del 2020**

**EVALUACIÓN DE BIOINDICADORES DE CONTROL PARA POBLACIONES MICROBIANAS EN DIGESTORES ANAEROBIOS**

**El director**



**D. Julián Lebrato Martínez**

**El tutor**



**D. Julián Lebrato Martínez**



**Programa de doctorado Recursos Naturales y Medioambiente RD. 99/2011**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ary Burbano". The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke across the middle.

**D. Ary Mauricio Burbano**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco primero que todo a mi Madre y a mi Padre que me han dado las bases fundamentales para terminar esta meta en mi vida.

Agradezco a COLCIENCIAS, la entidad del gobierno colombiano que ha financiado mi Doctorado en Sevilla, España y que en estos años me ha respaldado completamente.

Agradezco a mi hermana que me ha apoyado en momentos difíciles en mi estancia en España y a la presencia de mis sobrinos en mi vida.

Agradezco a Julián Lebrato quien me permitió adelantar la tesis de doctorado en el laboratorio del Grupo TAR y quien fue mi director de tesis.

Le doy gracias a Dolores Garvi y Carlos Benito por su ayuda a lo largo de mi tesis en el laboratorio TAR de la escuela politécnica.

Igualmente, a Belén Fernandez quien me permitió adelantar una estancia de investigación en el IRTA por seis meses, donde realice los ensayos de biología molecular.

A EMASESA le doy gracias por permitir realizar esta investigación y permitir obtener el inóculo de la EDAR Copero. Esta investigación se enmarca en el contrato 68/83 LOU: Asistencia técnica e investigación en residuos orgánicos de alta carga mediante la codigestión de fango mixto.

## **INDICE**

AGRADECIMIENTOS.....	4
ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN .....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Enfoque de la Investigación .....	14
1.2 Fundamentos de la investigación.....	17
1.2.1 Digestión anaerobia .....	17
1.2.2 Etapas de la digestión anaerobia.....	17
1.2.2.1 Hidrólisis .....	18
1.2.2.2 Acidogénesis.....	19
1.2.2.3 Acetogénesis.....	20
1.2.2.4 Metanogénesis .....	21
1.2.3 Ecuación de la digestión anaerobia .....	22
1.2.4 Parámetros de operación de la digestión Anaerobia.....	22
1.2.4.1 Temperatura.....	22
1.2.4.2 Carga orgánica.....	23
1.2.4.3 Tiempo de Retención.....	23
1.2.4.4 Biogás .....	24
1.2.4.5 Producción teórica de biogás .....	24
1.2.4.6 Presencia de tóxicos e inhibidores.....	25
1.2.5 Codigestión Anaerobia .....	25
1.2.6. Legislación de Fangos .....	27
1.3 Hipótesis de Investigación.....	31
1.4 Objetivos.....	31
1.5 Metodología.....	32
1.5.1 Etapa 1 .....	32
1.5.2 Etapa 2 .....	32
1.5.3 Etapa 3 .....	32
2. BIOMANTENIMIENTO Y BIOCONTROL DE DIGESTORES ANAEROBIOS .....	34
2.1. Bioindicadores Anaerobios.....	37
2.1.1 Actividades Específicas .....	38
2.1.2 Actividad hidrolítica específica .....	38
2.1.3 Actividad acidogénica específica .....	39
2.1.4 Actividad Metanogénica específica.....	40
2.2 Bioindicadores Moleculares .....	41

2.2.1 Ácidos nucleicos.....	43
2.2.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	44
2.2.4 Características de la Metil-coenzima reductasa (mcrA).....	46
2.2.5 Características de la fosfosulfato reductasa (aprA).....	46
2.3.1 Huella digital molecular de microbiomas.....	47
2.3.2 Hibridación fluorescente in situ (FISH).....	47
2.3.3 Micromatrices (Microarrays).....	48
2.3.4 Sondeo de isótopos estables (SIP).....	48
2.3.5 Las tecnologías ómicas y el microbioma.....	48
2.4 Biocontrol.....	50
2.4.1 Incremento de la retención de biomasa.....	50
2.4.2 Mejorar la configuración y operación del reactor.....	50
2.4.3 Pretratamiento del sustrato.....	51
2.4.4 Eliminación del componente tóxico.....	51
2.4.5 Cambios en la Alimentación.....	52
2.4.6 Bioaumentación.....	52
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
3.1 Inóculos Anaerobios.....	56
3.1.1 Inóculo Anaerobio Etapa 1.....	56
3.1.2 Inóculo Anaerobios Etapa 2.....	56
3.1.3 Inóculos Anaerobios Etapa 3.....	57
3.2 Reactores anaerobios.....	57
3.2.1 Reactor Macondo III- Mezcla completa.....	57
3.2.2 Reactor FM – Mezcla completa.....	58
3.2.3 Reactor Metanogénico (RM) y reactor AD –Mezcla completa.....	59
3.2.4 Planta piloto en EDAR Tablada de 1 m <sup>3</sup> .....	60
3.2.5 Equipos laboratorio TAR.....	61
3.2.6 Equipos laboratorio Microbiología IRTA.....	62
3.3 Métodos Fisicoquímicos de análisis Laboratorio TAR.....	64
3.3.1 Determinación del pH (APHA, 4500-H+,2015).....	64
3.3.2 Determinación de los Ácidos Grasos Volátiles (AGV) (APHA, 1992).....	65
3.3.3 Determinación de la Alcalinidad Total (APHA, 1992).....	66
3.3.4 Sólidos Totales (ST): Sólidos totales fijos (STF) y Sólidos totales Volátiles (STV) (APHA, 2540 A, 1992).....	67
3.3.5 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) (APHA, 5220 C, 2005).....	68
3.3.6 Determinación de Metano.....	69
3.4 Método Actividades específicas.....	70

3.4.1 Consideraciones previas .....	70
3.4.2 Cálculo Actividades Específicas .....	72
3.5 Biología Molecular .....	74
3.5.1 Extracción ADN .....	74
3.5.2 RNeasy PowerMicrobiome Kit (50), QIAGEN .....	75
3.5.3 Polimerasa chain reaction (PCR).....	77
3.6 Métodos estadísticos.....	79
3.6.1 Coeficiente de Correlación de Pearson.....	79
3.6.2 Análisis de componentes principales.....	80
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	81
4.1 Evaluación y optimización de la actividad hidrolítica, acidogénica y metanogénica en un inóculo anaerobio de una EDAR. ....	83
4.1.1 Actividad Hidrolítica .....	84
4.1.2 Actividad Acidogénica .....	85
4.1.3 Actividad Metanogénica.....	86
4.1.4 Sólidos volátiles Eliminados para todas las pruebas .....	87
4.1.6 Relación AGV/ALC para todas las pruebas .....	88
4.1.7 Cálculo valor de actividades específicas .....	89
4.1.8 Discusión .....	90
4.2 Análisis de cinco inóculos de digestión anaerobia utilizando la correlación de bioindicadores de comportamiento: Actividad hidrolítica, Actividad Acidogénica, Actividad Metanogénica y ADN. ....	91
4.2.1 Caracterización inicial del ensayo .....	92
4.2.2 Inóculo alimentado de fango mixto (Prueba A) .....	93
4.2.4 Inóculo alimentado de fango mixto en decantación (Prueba B).....	95
4.2.5 Codigestión de Inóculo alimentado con Fango Mixto + lixiviado (Prueba C).....	97
4.2.6 Codigestión de inóculo alimentado con fango mixto + detergente + aceite de motor (Prueba D) .....	99
4.2.7 Codigestión de Inóculo +fango deshidratado+ materia seca (Prueba E).....	101
4.2.8 Comparación por Actividades específicas.....	103
4.2.9 Cálculo de actividades específicas .....	105
4.2.10 Resultados ADN .....	106
4.2.11 Análisis estadístico .....	107
4.2.12 Análisis de componentes principales.....	110
4.2.13 Discusión .....	111
4.3 Análisis de digestores anaerobios termófilos y mesófilo mediante las actividades específicas, ADN, y qPCR, realizado en el IRTA.....	112
4.3.1 Características del ensayo.....	112

4.3.2 Caracterización de los inóculos.....	113
4.3.3 Inóculo reactor Metanogénico (RM) .....	114
4.3.4 Inóculo Reactor AD + agua residual de Matadero .....	117
4.3.5. Inóculo Reactor 7 litros alimentado con Fango mixto .....	120
4.3.6 Cálculo actividades específicas .....	123
4.3.7 Resultados Biología Molecular .....	124
4.3.7.1 Las bacterias y su actividad en los tres inóculos. ....	124
4.3.7.2 Las arquea metanogénicas y las sulfato reductoras .....	127
4.3.8. Tasas de actividad.....	128
4.3.8 Análisis estadístico .....	131
4.3.9. Análisis de componentes Principales .....	134
4.3.10 discusión .....	136
4.4 Biomantenimiento predictivo .....	137
4.5 Líneas de Futuro .....	142
5.CONCLUSIONES.....	143
Bibliografía.....	148



## **ABREVIATURAS**

AME	Actividad metanogénica específica
AAE	Actividad Acidogénica Específica
AHE	Actividad hidrolítica específica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
aprA	fosfosulfato reductasa alfa.
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr 16S	Ácido ribonucleico ribosomal 16S
AGV	Ácidos grasos Volátiles
BMP	Biochemical methane potencial
ALC	Alcalinidad
DQO	Demanda química de oxígeno
EDAR	Estación depuradora de agua residual
IRTA	Instituto de investigación y tecnología agroalimentaria
mcrA	Metil-coenzima reductasa
NADH	dinucleótido de adenina de nicotianamina
FM	Fango Mixto
PCR	Polimerasa chain reaction
qPCR	Quantitative Polimerasa chain reaction
SV	Sólidos volátiles
ST	Sólidos totales
RM	Reactor metanogénico
TR	Tiempo de retención
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket
EGSB	Expanded granular sludge bed

## **RESUMEN**

La aplicación de bioindicadores en el campo de la digestión anaerobia no está muy extendida y por lo general se queda en experiencias de laboratorio con objetivos meramente investigativos. En este trabajo, se ha querido llevar estos bioindicadores a otro nivel, demostrando que son útiles herramientas para la gestión de reactores anaerobios en el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales. Se han aplicado bioindicadores en diferentes inóculos para conocer su comportamiento y así poder desarrollar un protocolo de mantenimiento predictivo de anticipación a los problemas que puedan existir en digestores anaerobios. Esto tiene un contenido económico y ecológico de un gran calibre, ya que hasta ahora esto se ha hecho de manera rutinaria con indicadores físicoquímicos que no permiten prever situaciones no deseadas, cuando el problema ya ha aparecido.

Se han utilizado como bioindicadores la actividad hidrolítica específica (AHE), la actividad acidogénica específica (AAE) y actividad metanogénica específica (AME). Como bioindicadores moleculares se han utilizado la extracción de ADN, la identificación de ácido ribonucleico ribosomal 16s (ARNr 16S) la coenzima A metilo (mcrA) y la adenosina fosfosulfato reductasa alfa (aprA). La primera etapa de la investigación ha consistido en optimizar los métodos de las actividades específicas, para lo cual se experimentaron con variables como la agitación de viales, la adición de nutrientes y tiempo de medición. También se ha optimizado el método de extracción de ADN, probando diferentes vías de purificación de las muestras de inóculos anaerobios que contienen una gran concentración de impurezas.

Luego teniendo estos dos métodos a punto, se realizó la segunda etapa de la investigación que consistió en la aplicación de las actividades específicas y la extracción de ADN en cinco inóculos anaerobios, realizando paralelamente análisis físicoquímicos y mediciones periódicas de metano para cuantificar las actividades específicas y correlacionarlas con los parámetros físicoquímicos. Por su parte, en la tercera etapa de la investigación, se aplicaron todos los bioindicadores en tres inóculos diferentes del laboratorio del IRTA (Instituto de investigación y tecnología agroalimentaria) con el objetivo de obtener una muestra representativa para obtener información genética. En esta última etapa, primero se realizó el ensayo de actividades específicas, luego de un tiempo de medición de metano se tomaron las muestras para la extracción del ADN, para finalmente realizar el análisis genético por medio de la Quantitative Polimerasa chain reaction (qPCR).

Se ha encontrado que la fase limitante para los inóculos estudiados fue la metanogénica, la actividad hidrolítica y la actividad acidogénica obtuvieron mejores resultados. Se han obtenido correlaciones positivas entre las actividades específicas y los parámetros físicoquímicos y entre las actividades específicas y los bioindicadores moleculares. Se evidenció también como la producción de metano esta correlacionada con los bioindicadores moleculares, ya que los inóculos que tenían más producción de metano eran los que tenían más concentración de ADN. Estas correlaciones nos han ayudado a establecer que estos bioindicadores pueden complementarse con los parámetros físicoquímicos para entender mejor el estado y la actividad del inóculo. Se ha comprobado que los bioindicadores moleculares son herramientas muy interesantes que permiten saber de la abundancia relativa y la actividad de las poblaciones microbianas en inóculos anaerobios. Finalmente, se desarrolla una guía de cómo utilizar estos bioindicadores en un biomantenimiento y biocontrol, que exponen soluciones prácticas y biológicas en los reactores anaerobios.



## **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1 Enfoque de la Investigación**

Recientemente, la digestión anaerobia se hace más interesante en varios sectores de la economía debido principalmente al biogás que se obtiene generalmente de residuos líquidos y sólidos. Esta tecnología tiene la gran ventaja de ser sencilla y trabajar muy bien a pequeña y gran escala. Cada día es más usual, que las grandes estaciones depuradora de aguas residuales (EDARs) utilicen la digestión anaerobia para obtener beneficios energéticos del biogás, pero si algún digestor llegara a fallar la reducción de beneficios económicos sería significativa.

Los substratos que alimentan los reactores anaerobios en la mayoría de los casos son residuos sólidos que tienen un alto contenido de materia orgánica, sus características son variadas lo que hace más fácil su mezcla para acelerar y aumentar la producción de biogás. Mezclar substratos provenientes de diferentes fuentes se denomina codigestión, que no es más que la generación de biogás mediante la digestión de varios residuos. La codigestión anaerobia permite la gestión de residuos orgánicos de alta carga, como residuos agroalimentarios, lo que conlleva a que los reactores anaerobios sean más vulnerables y requieran de un mejor mantenimiento predictivo y de averías. Últimamente, se utilizan digestores de alta velocidad algunos en régimen termófilo, para obtener una mayor producción de biogás, lo que conlleva a necesitar mantenimientos más completos con una mejor rapidez de predicción.

Existe una gran variedad de estas mezclas que se han probado e investigado alrededor del planeta. La codigestión ha sido una herramienta muy importante en la valorización de la digestión anaerobia como fuente de energía, ya que con estas mezclas de residuos se logran mayores volúmenes de biogás, comparadas con las que se realizan con un solo substrato. Por ejemplo, las empresas que trabajan en la agroindustria, la agricultura, la producción de alimentos y bebidas utilizan la digestión anaerobia de residuos menos usuales, de alta carga, los cuales producen grandes volúmenes de biogás. Varios estudios demuestran que la generación de biogás ofrece ventajas significativas sobre otros tipos de bioenergía, calificándola como una de las tecnologías más eficientes y beneficiosa para el medio ambiente (Lozanovski et al., 2014). Cuando se usa un residuo para producir energía, se está agregándole un valor y eliminando un pasivo ambiental, que de forma incontrolada podría estar contaminando o contribuyendo al cambio climático. Además de esto, la legislación de fangos actual es mucho más exigente y su disposición final requiere un tratamiento más complejo.

La digestión anaerobia de residuos genera grandes cantidades de biogás necesarias para producir importantes volúmenes de energía. Como dice Weiland, la digestión anaerobia para la producción de biogás a gran escala ha estado en funcionamiento durante muchos años, pero muchas cuestiones a nivel tecnológico y microbiológico han sido obstáculos para lograr un proceso económicamente viable (Weiland et al., 2010). Sin embargo, las EDARs encargadas del tratamiento de los vertimientos urbanos y la del manejo del biogás y su conversión a energía eléctrica han encontrado en el tratamiento de residuos agroindustriales una alternativa de sostenimiento económico. En estas depuradoras, el biogás es almacenado en un gasómetro para luego suministrarlo en motores de cogeneración que convierten la combustión del biogás en energía térmica y eléctrica. Estos sistemas de cogeneración aportan energía eléctrica a la depuradora y si existe exceso de biogás, pueden alimentar la red de energía eléctrica.

Alrededor del mundo, se ha investigado el comportamiento de los digestores anaeróbicos para adelantarse a situaciones críticas debido a la alta expansión de esta tecnología. La respuesta temprana a fallas en el sistema puede ser muy útil para mantener el sistema en buenas condiciones y anticipar posibles adiciones de sustratos externos. Sin embargo, para los operadores de las plantas de aguas residuales, es difícil saber el comportamiento de los sustratos en el inóculo. A veces la proporción de sustratos de la codigestión no es buena y podría causar la inhibición en el reactor. En estos casos, los bioindicadores podrían proporcionar información sobre la compatibilidad de los sustratos y la actividad del inóculo, evitando posibles episodios de inhibición que pueden generar una disminución de la producción de biogás.

La producción de biogás, por ejemplo, es un parámetro importante, ya que indica el rendimiento general del proceso. Sin embargo, como expone Boe, no puede usarse para indicar un desequilibrio del proceso, ya que los cambios en la tasa de producción de biogás dependen de la composición del alimento. Además, tiene una baja sensibilidad a la sobrecarga en comparación con otros indicadores del proceso, con una disminución en la producción de biogás que a menudo ocurre después de que el proceso se inhibe severamente o se descompone. Por lo tanto, no es un indicador efectivo de alerta temprana (Boe, 2006). La mayoría de los parámetros habitualmente utilizados, solo pueden revelar el estado actual del reactor, pero a menudo es demasiado tarde para un control efectivo del proceso una vez que se alcanzan estados de emergencia. Por ejemplo, las mediciones de sólidos suspendidos volátiles (SSV) no diferencian entre la biomasa microbiana y cualquier otro material orgánico particulado (Hussain, 2015). Tampoco proporciona ninguna información sobre la posible actividad metanogénica de los microorganismos. Varios parámetros han sido adoptados frecuentemente en el monitoreo del proceso, incluyendo pH, potencial redox, amoníaco, alcalinidad, ácidos grasos volátiles (AGV), demanda química de oxígeno (DQO) y la tasa de producción de biogás.

Se necesita entonces una herramienta que prevenga inhibiciones de los inóculos y que posibilite también la toma de decisiones rápidamente. Los bioindicadores pueden ser el instrumento que logre tomar una radiografía de los inóculos anaerobios, que sea confiable y disponible para operadores de planta. Cuando nos referimos a bioindicadores se habla de indicadores de origen biológico que representan de forma acertada el comportamiento molecular y/o microbiológico de un inóculo. Esta información podrá ser útil si existe, por ejemplo, una sospecha de inhibición por presencia de sustancias agresivas a los microorganismos, y además para determinar la carga orgánica que puede soportar un digestor anaerobio.

Existen también bioindicadores ambientales, que indican en ciertos ecosistemas la presencia de oxígeno como lo líquenes o la presencia de especies acuáticas, que dan idea de la calidad del agua. Por ejemplo, Pérez et al, encontraron en procesos de eliminación de nitrógeno, que existen importantes poblaciones de flagelados y amebas, los cuales terminan por reducir su abundancia a medida que disminuye el rendimiento de eliminación del nitrógeno (Pérez et al., 2010). En sistema aerobios como el anterior existe bastante investigación y aplicación a nivel industrial del uso de los microorganismos como indicadores en el tratamiento de agua residual, sin embargo, en sistemas anaerobios existen pocos estudios similares ya que sus procesos bioquímicos son más complejos.

De forma paralela a estos estudios de bioindicación, se ha realizado esta investigación novedosa, utilizando varios tipos de bioindicadores para definir el estado de un digestor anaerobio. Para la presente investigación, se utilizó inicialmente las actividades específicas utilizando ensayos Bach en los cuales se suministra una alimentación específica para alentar el crecimiento de un cierto tipo de microorganismo, midiendo diariamente la producción de biogás obtenida. Estas actividades específicas, señalan la cantidad de materia orgánica degradada en términos de producción de metano siendo una herramienta de análisis de comportamiento conocida.

Se han utilizado también bioindicadores moleculares como la extracción de ADN que indica la cantidad total de material genético en el inóculo, se utilizaron también, la ARNr 16S que describe la abundancia relativa y actividad de bacteria y arquea, así como la mcrA que describe la abundancia relativa y actividad de las metanogénicas y la aprA que describe la abundancia relativa y actividad de las sulfatoredutoras. Los ensayos de la investigación se llevaron a cabo en el laboratorio del TAR en la Escuela politécnica de la Universidad de Sevilla y en el laboratorio del IRTA en Caldas de Montbui.



## 1.2 Fundamentos de la investigación

### 1.2.1 Digestión anaerobia

Por definición, la digestión anaerobia es la utilización de microorganismos, en ausencia de oxígeno, para estabilizar la materia orgánica por conversión a metano y otros productos inorgánicos incluyendo dióxido de carbono. Inicialmente los componentes de alto peso molecular, tales como las proteínas y los polisacáridos, son degradados en sustancias solubles de bajo peso molecular tales como aminoácidos y azúcares, esta etapa es a veces llamada "fase de licuefacción". Seguidamente, los nutrientes orgánicos son convertidos en ácidos menos grasos en una fase de "fermentación ácida", la cual baja el pH del sistema.

Finalmente, en la fase de "fermentación de metano" o "metanogénica", los ácidos orgánicos son convertidos en metano, dióxido de carbono y una pequeña cantidad de hidrógeno. En el proceso de biodegradación puede dividirse en cuatro pasos principales; hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, las cuales se llevan a cabo por la acción combinada de tres grupos fisiológicos de microorganismos: bacterias hidrolíticas-acidogénicas, bacterias acidogénicas sintróficas y arqueas metanogénicas (Schnürer, 2016).

### 1.2.2 Etapas de la digestión anaerobia

Para entender más el proceso se debe enfatizar en cuatro etapas del metabolismo necesarias para la producción de biogás a partir de residuos orgánicos (Kiely, 1999). A continuación, se explican las cuatro etapas de la digestión anaerobia por rompimiento de macromoléculas, dando como producto metano como se puede observar en la siguiente figura.

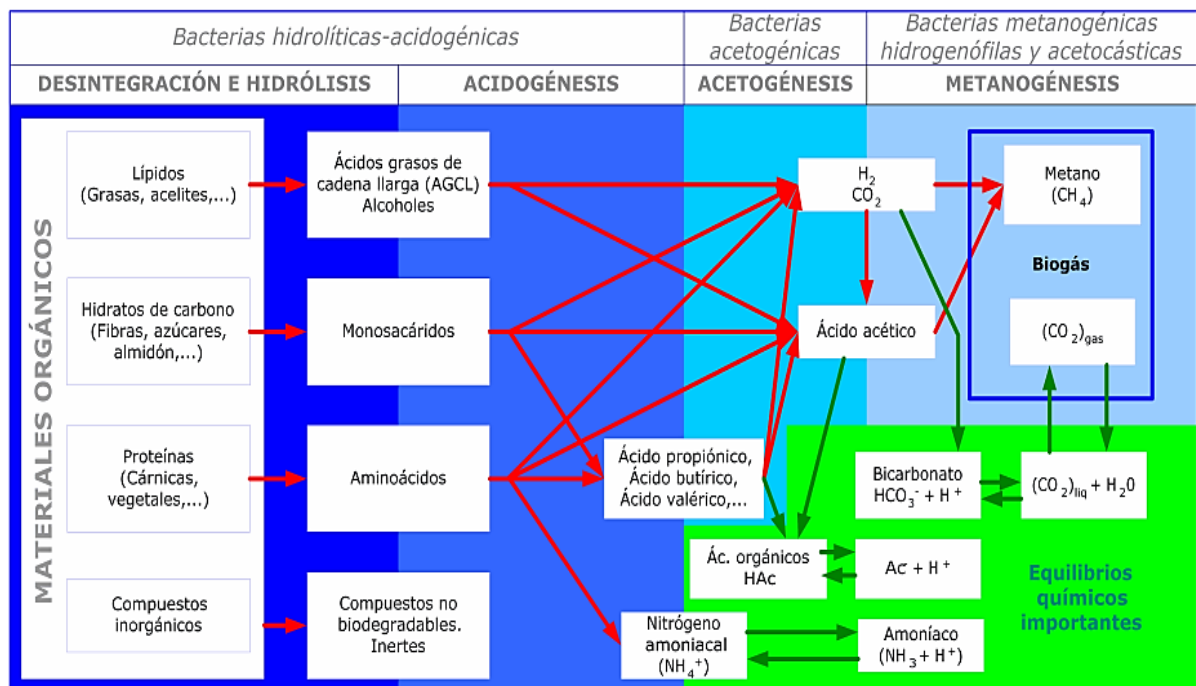


Figura 1. Fases de la Digestión Anaerobia. Fuente: Flotats et al., (2005).

### **1.2.2.1 Hidrólisis**

La hidrólisis es un proceso extracelular en el cual la materia orgánica es degradada a monómeros y oligómeros solubles. El proceso requiere la participación de las llamadas exoenzimas unidas a la pared celular que son secretadas por las bacterias fermentativas y permiten el desdoblamiento de la materia orgánica. La velocidad de la hidrólisis varía según el carácter del compuesto polimérico al que se descompone, por lo que este paso a menudo se considera limitante, específicamente cuando los materiales lignocelulósicos de plantas o fangos de las EDARs se utilizan con materia prima para producir biogás (Azam et al., 2015).

Los microorganismos responsables de la degradación de estos compuestos como la lignocelulosa utilizan sistemas enzimáticos extracelulares libres o sistemas enzimáticos anclados a las células (Lynd et al., 2002). Son bacterias típicas de este grupo las anaerobias estrictas (*Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus* y *Bacillus* sp.) y las facultativas (*Esterichia Coli* y *Bacilus* sp.), (Lebrato, 1990).

Las proteínas y los lípidos, que a menudo se encuentran juntos en los desechos animales, se transforman mediante proteasas y lipasas, donde la tasa de degradación depende de la estructura química, pero también de la solubilidad. Por otro lado, las vías bioquímicas de la formación del azúcar son diversas, pero en la mayoría de los casos terminan con el piruvato como un intermediario clave. En el siguiente paso, el piruvato se puede usar como un aceptor interno de electrones para la reoxidación de Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), lo que produce moléculas de carbón como acetato, propionato, butirato, lactato, valerato, caproato y un poco de hidrógeno. Si existe un agente que elimine el hidrógeno, como los metanogénicos, algunas bacterias también pueden reoxidar el NADH mediante la formación de hidrógeno, redirigiendo la fermentación hacia la producción de productos finales (Angelidaki et al., 2011).

La hidrólisis es, por lo tanto, una función de la concentración de biomasa y el sustrato. Batstone et al, seleccionaron un modelo dependiente del área de la superficie para permitir limitaciones de hidrólisis, cuando se esperaba una variación en el tamaño de partícula. Sin embargo, la mayoría de los autores explican la hidrólisis como un proceso agrupado utilizando una cinética de primer orden basada en el sustrato. Se ha demostrado que la hidrólisis es un paso limitante para la digestión de sustratos altamente particulados como desechos porcinos, estiércol de ganado y lodos de depuradora (Batstone et al., 2002).

### **1.2.2.2 Acidogénesis**

La acidogénesis también conocida como fermentación en este caso anaerobia, se define como un proceso microbiológico en el que parte de la molécula orgánica a oxidar actúa como aceptor de electrones exógenos. Los compuestos disueltos, generados en el proceso de hidrólisis, son absorbidos en las células de las bacterias fermentativas y después por las acidogénicas, excretados como sustancias orgánicas simples como ácidos grasos volátiles, alcoholes, ácido láctico y compuestos minerales como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, etc. Los azúcares obtenidos de la etapa de hidrólisis pueden degradarse fácilmente mediante el proceso de fermentación.

Los aminoácidos, por ejemplo, pueden degradarse a través de reacciones de Stickland, donde un aminoácido actúa como donador de electrones y otro actúa como receptor (Ramsay et al, 2001). Aquí los pares de aminoácidos se degradan por reacciones acopladas de oxidación/reducción. Un aminoácido se usa como donador de electrones y el otro como aceptor de electrones. El aminoácido que actúa como donante de electrones se oxida a un ácido carboxilo volátil que es un átomo de carbono más corto que el aminoácido original. Si la presión parcial de hidrógeno es suficientemente baja, la fermentación de aminoácido también puede proceder a través de una vía alternativa que implica la oxidación desacoplada y la liberación de electrones como hidrógeno. El flujo de hidrógeno máximo posible siempre fue mayor que la tasa de formación y consumo de hidrógeno, lo que indica que es ventajoso reducir la distancia entre especies por agregación. Zwiarello et al, demostraron que una disminución en la distancia interbacteriana entre los degradadores de propionato y los metanogénicos de 5,3 a 0,29 µm causó un aumento en el flujo de hidrógeno máximo posible de 1,1 a 10,3 nmol/ml min (Zwiarello et al, 2013).

La transferencia de hidrógeno se considera un factor clave para la sintrofia, porque muchas relaciones sintróficas dependen del hidrógeno como lanzaderas de electrones. También se ha demostrado que el acetato, un intermediario clave en los procesos de biogás, actúa como un portador de electrones para los socios sintróficos (Morris et al., 2013). Los microorganismos fermentativos de glucosa, por ejemplo, tiene metabolismos ramificados, lo que significa que pueden metabolizar el sustrato en diferentes vías que dan diferente cantidad de energía y producen diferentes productos de fermentación (Dolfing, 1988).

Las bacterias fermentativas pueden funcionar a altas concentraciones de hidrógeno y formiato (Batstone et al., 2002a). Sin embargo, con esta condición, la bacteria usará una vía metabólica en la cual se producen metabolitos más reducidos, como AGV, lactato y etanol (Angelidaki et al., 2002). La vía dominante depende de varios factores, como la concentración del sustrato, el pH y las concentraciones de hidrógeno disuelto (Rodríguez et al., 2006).

### **1.2.2.3 Acetogénesis**

Algunos productos de fermentación como los ácidos grasos de más de dos átomos de carbono, los alcoholes de más de un átomo de carbono y los ácidos grasos aromáticos y de cadena ramificada no pueden usarse directamente en la metanogénesis. En el proceso de acetogénesis, estos productos son oxidados a acetato y  $H_2$  por bacterias estrictas reductoras de protones en relación sintrófica con arqueas metanogénicas, ya que la presión parcial de  $H_2$  baja es esencial para que las reacciones acetogénicas sean termodinámicamente favorables (Schink, 1997; Stams et al., 2005). Entre los productos de fermentación, los ácidos grasos volátiles (AGV) son los intermediarios más comunes que se encuentran en un digestor anaerobio (Pind et al., 2003b).

La acetogénesis es realizada por un grupo bacteriano filogenéticamente diverso (acetógenos) y se caracteriza por la reducción del dióxido de carbono a acetilo de la acetilcoenzima A (CoA) por medio de la vía acetil-CoA, también llamada Wood-Ljungdahl (W-L) (drake et al., 2008). Esta vía cumple dos funciones: como vía de aceptación de electrones y de conservación de energía y como vía de asimilación de carbono. Los acetogénicos pueden usar una amplia variedad de fuentes de carbono, donantes y aceptores de electrones logrando crecer como autótrofos y heterótrofos. Entre algunos compuestos de carbono utilizados para el crecimiento están el  $CO$ ,  $H_2 + CO_2$ , formiato, metanol y grupos metilo de muchos compuestos aromáticos metoxidados. Estas reacciones solo pueden realizarse si la presión parcial de estos productos mantiene niveles bajos, por ejemplo, mediante su consumo por las metanogénicas.

Para algunos ácidos como el propionato, la eliminación del acetato también puede ser de importancia crucial (Drake et al., 2002). Las bacterias acetogénicas no solo se benefician de los metanógenos hidrogenotróficos, sino también de los metanogénicos acetoclásticos, ya que la eliminación del acetato influye en la energía de las reacciones oxidantes de AGV, especialmente en la degradación donde se forman tres moléculas de acetato y solo una molécula de  $H_2$  (Schink, 2002). Además, la acumulación de acetato puede tener un efecto inhibitorio bioquímico sobre la acetogénesis (Kuninobu et al., 1999).

La temperatura también afecta la termodinámica de las reacciones acetogénicas. La formación de  $H_2$  a partir de la oxidación de ácidos orgánicos se vuelve más energética a temperaturas más altas, mientras que el consumo de  $H_2$  por parte de los metanógenos se vuelve menos energético. Sin embargo, dado que los coeficientes de difusión se vuelven más altos y los gradientes de difusión más pronunciados, se espera que la degradación de los ácidos orgánicos sea más rápida a altas temperaturas (De Bok et al., 2004).

#### **1.2.2.4 Metanogénesis**

En general, es el paso que limita la velocidad del proceso de digestión. El metano es producido por las bacterias acetotróficas a partir de la reducción del ácido acético o por las bacterias hidrogenotróficas a partir de la reducción del  $\text{CO}_2$ . Los metanogénicos catalizan el paso final en la cadena de la digestión anaerobia. Si las metanogénicas mantienen una baja concentración de productos como el hidrógeno y el acetato, varias fermentaciones primarias clásicas se desplazan a la formación de hidrógeno,  $\text{CO}_2$  y acetato, produciendo muchos menos productos secundarios reducidos, como los ácidos grasos. Según el sustrato y la vía utilizada, los metanogénicos se clasifican generalmente en dos grupos: hidrogenotróficos y los metilotróficos (Costa et al, 2014). Los hidrogenotróficos utilizan formiato o hidrógeno como fuente de energía y el  $\text{CO}_2$  se reduce a metano. Algunas metanogénicas dentro de este grupo también pueden usar ciertos alcoholes como donadores de electrones.

Además, este grupo contiene metanogénicos con la capacidad de usar hidrógeno obligatoriamente y reducir el metanol y las metilaminas en lugar de  $\text{CO}_2$ . La capacidad de usar hidrógeno y formiato es común entre las metanogénicas, pero la capacidad de utilizar alcoholes es menos común. Las metanogénicas hidrogenotróficas usan exclusivamente hidrógeno o formiato como donador de electrones. Las metanogénicas metilotróficas son más versátiles y los sustratos para su metanogénesis incluyen hidrógeno y  $\text{CO}_2$ , acetato, compuestos de metilo como metanol y metilaminas. Aquí el grupo metilo se reduce a metano. Los metanogénicos tienen un metabolismo que involucra enzimas y coenzimas únicas (Ferry et al, 2011). Además, las arquea que producen metano a partir del hidrógeno crecen más rápidamente que aquellas que usan ácido acético, de modo que las metanogénicas acetotróficas generalmente limitan la tasa de transformación del material orgánico complejo presente en el agua residual y en biogás.

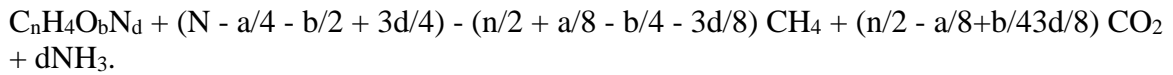
La metanogénesis elimina el hidrógeno y el acetato del sistema y, por lo tanto, tiene una fuerte influencia tanto en la acetogénesis como en la fermentación. La metanogénesis hidrogenotrófica ocurre simultáneamente con la acetogénesis sintrófica. La metanogénesis hidrogenotrófica es un regulador primario en el proceso anaeróbico y su falla en la función afectará fuertemente las bacterias acetogénicas sintróficas y el proceso de fermentación en su conjunto (Schink, 1997). La acumulación de productos de fermentación reducidos en el digestor anaeróbico se debe principalmente a la eliminación inadecuada de hidrógeno y acetato.

Estas cuatro etapas de la digestión anaerobia se dividen a su vez en seis subprocesos que se detallan a continuación:

- Hidrólisis de la materia orgánica particulada compleja.
- Fermentación de los aminoácidos y azúcares.
- Oxidación anaerobia de los ácidos grasos de cadena larga y alcoholes.
- Oxidación anaerobia de los productos intermedios.
- Producción de acetato a partir de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ .
- Conversión del acetato a metano por medio de los metanogénicas

### **1.2.3 Ecuación de la digestión anaerobia**

La producción de metano depende principalmente del estado de oxidación carbono en la materia orgánica. Si la composición del sustrato es conocida y es completamente convertido a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (y NH<sub>3</sub> en el caso que el sustrato contenga nitrógeno), la producción teórica de metano puede ser calculada de acuerdo con la siguiente ecuación.



Generalmente el biogás obtenido contiene mucho menos CO<sub>2</sub> que el calculado con la ecuación anterior, debido a la alta solubilidad del CO<sub>2</sub> en el agua (Molano, 2002).

### **1.2.4 Parámetros de operación de la digestión Anaerobia**

Se consideran parámetros de operación los que actúan directamente en el reactor anaerobio y que dependen de las características de los residuos que se tratan y del desarrollo del proceso. Para mantener un proceso estable, es necesario asegurar que estos parámetros mantienen unos valores adecuados. A continuación, se describen brevemente los distintos parámetros para tener en cuenta en un proceso básico de digestión anaerobia.

#### **1.2.4.1 Temperatura**

La digestión anaeróbica se puede aplicar en un amplio rango de temperaturas desde psicrófila <20 °C, mesofílica de 25-40 °C, termofílica de 45-60 °C e incluso condiciones termofílicas extremas > 60 °C (Kashyap et al., 2003). La temperatura tiene un efecto directo sobre las propiedades fisicoquímicas de todos los componentes del digestor y también afecta la termodinámica y la cinética de los procesos biológicos. La temperatura determina si la reacción específica es favorable y, por lo tanto, también influye en la metanogénesis. El aumento de la temperatura tiene varias ventajas (Van Lier, 1995):

Aumenta la solubilidad de los compuestos orgánicos, lo que los hace más accesibles a los microorganismos, así mismo aumenta las velocidades de reacción química y biológica, por lo tanto, acelera el proceso de conversión para que el reactor pueda ser más pequeño y pueda funcionar con tiempos de retención más cortos. Mejora varias propiedades fisicoquímicas, la difusividad del sustrato soluble, aumenta la velocidad de transferencia de líquido a gas debido a una menor solubilidad del gas, disminuye la viscosidad del líquido, lo que hace que se requiera menos energía para la mezcla y también mejorar la separación de biomasa líquido-sólido. También, aumenta la tasa de mortalidad de bacterias patógenas, especialmente en condiciones termofílicas, lo que disminuye el tiempo de retención requerido para la reducción de patógenos (Bendixen, 1994; Smith et al., 2005).

Además, las reacciones de oxidación de ácidos orgánicos se vuelven más enérgicas a temperaturas más altas, lo cual es una ventaja para la degradación de AGV y otros productos intermedios (Van Lier, 1995). Sin embargo, la alta temperatura puede tener algún efecto negativo. El aumento de la temperatura aumenta la fracción de amoníaco libre (NH<sub>3</sub>) que inhibe los microorganismos. Además, aumenta la fracción no disociada de AGV, especialmente a pH bajo (4-5) como en un reactor acidogénico (Van Lier, 1995).

Esto hace que el proceso termofílico sea más sensible a la inhibición. Sin embargo, debido a muchas ventajas de alta temperatura, la operación termofílica es popular en aplicaciones anaeróbicas donde la inhibición de amoníaco no es una consideración importante.

La digestión anaerobia termofílica puede convertirse en una alternativa atractiva a la digestión mesofílica, debido a la mayor tasa de crecimiento de las bacterias implicadas y, por lo tanto, una alta actividad por unidad de biomasa, y una mayor velocidad de carga de materiales orgánicos que puede ser empleados. (Dugba, 1999). Si es económico de operar un digestor a elevadas temperaturas es una cuestión de diseño, porque la eficiencia de la operación debe ser compensado con los costos de calefacción.

#### **1.2.4.2 Carga orgánica.**

La cantidad de residuo alimentado diariamente es otro de los puntos para tener en cuenta con respecto al modo de operar un digestor anaerobio. La alimentación o carga orgánica con la que se trabaja, concretamente la carga orgánica volumétrica (COV), se puede expresar tanto en kilogramos de sólidos volátiles como en términos de DQO ( $\text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ ), respectivamente. La cantidad de alimentación empleada depende del diseño del reactor, de la tecnología empleada y de las características del residuo a tratar. Hay que prestar atención a los distintos parámetros para utilizar una cantidad de alimentación adecuada, ya que una elevada carga puede provocar la inhibición del proceso por la gran cantidad de AGV producidos (Alonzo A, 2017).

#### **1.2.4.3 Tiempo de Retención**

Este parámetro afecta a la eficiencia del digestor con respecto a la eliminación de materia orgánica y la producción específica de biogás y metano. Trabajando en el campo del tratamiento de aguas residuales, podemos hablar de tiempo de retención de sólidos (TRS), parámetro que hace referencia al tiempo de residencia del substrato en el reactor, directamente relacionado con el tiempo que la biomasa es retenida en el mismo; y de tiempo de retención hidráulico (TRH), parámetro referido al tiempo de residencia del agua o fase líquida.

#### 1.2.4.4 Biogás

Se llama biogás al gas que se produce mediante un proceso metabólico de descomposición de la materia orgánica sin la presencia del oxígeno del aire. La generación natural de biogás es una parte importante del ciclo biogeoquímico del carbono.



**Figura 2.** Quema de Biogás

El Biogás es una forma biológica de energía que puede ser sintetizada. De modo natural se produce en la putrefacción de la materia orgánica y se llama gas de los pantanos o gas natural. También hay diferente material en descomposición de donde se puede extraer el biogás; estiércol animal y humano, lagos, grasas, residuos sólidos municipales y agrícolas que tengan un contenido alto en materia orgánica (U. Habana, 2002). El principal componente del biogás es el metano que es el último eslabón en una cadena de microorganismos que degradan material orgánico y devuelven los productos de la descomposición al medio ambiente.

#### 1.2.4.5 Producción teórica de biogás

Para estimar la producción de biogás con todos sus componentes se debe primero saber la producción de metano, la cual, se puede hallar con la carga orgánica removida en la planta de tratamiento de agua residual. Para esto se encontraron dos relaciones entre la DQO removida y el volumen de metano producido. La producción de biogás en un reactor anaerobio que trata agua residual es pequeña porque la concentración de materia orgánica biodegradable es baja y una considerable parte de la producción de biogás se disuelve en la fase líquida. Esta es una particularidad en el caso del dióxido de carbono: el biogás de digestores de agua residual siempre tiene un alto contenido de metano.

La solubilidad del metano a presión atmosférica es cerca de 20 mg/L, aunque esté en un digestor de agua residual ( $\text{CH}_4$  presión parcial de 0.8 Atm), la concentración de metano disuelto está en el rango de  $0,8 \cdot 20 = 16$  mg/L o 1 mol/L  $\text{CH}_4$  aproximadamente. La producción teórica de metano por unidad de volumen de agua residual o per cápita puede ser fácilmente calculada. La digestión de 1 kg DQO resulta en masa de  $\frac{1}{4}$  kg = 250 kg  $\text{CH}_4$ . Conociendo esto, 1 mol  $\text{CH}_4$  (16 g) tiene un volumen de 22,4 T/273 en 1 presión atmosférica, el volumen de gas metano es calculado como sigue (Lettinga, 1994):

$$250 \times \frac{22.4T}{273 \times 16} = \frac{1,28 T \text{ CH}_4}{\text{Kg DQO}}$$



#### **1.2.4.6 Presencia de tóxicos e inhibidores**

Además de diversas formas químicas en exceso, problemas físicos que puedan ocurrir y contaminaciones biológicas en el medio, la presencia de desinfectantes en los sustratos y, en menor medida, de antibióticos, puede provocar problemas en el desarrollo de los microorganismos. Uno de los inhibidores más importante en los reactores anaerobios es el amoníaco, el cual aumenta a una concentración determinada de nitrógeno amoniacal en medida que sube el pH. No suelen producirse problemas relevantes en concentraciones de nitrógeno amoniacal de menos de 3 g /L (Institut Catalá d'Energía, 2007).

Otro compuesto problemático en la operación de digestores anaerobios es el sulfato. En el momento en que las bacterias sulfatoreductoras compiten con las especies que intervienen en el proceso, la reducción de sulfato a sulfuro de hierro puede provocar toxicidad. Por otro lado, algunos metales pesados como Cobre, Zinc y Cadmio etc., en concentraciones pequeñas son necesarios para sostener la actividad de numerosas enzimas o coenzimas, pero pueden resultar tóxicos por encima de determinados niveles. Por ejemplo, para el Zn el límite de toxicidad es de 600 mg/L y para el Cd es de 20 mg/L (Angelidaki et al., 1997). Adicionalmente, las formas no ionizadas de los AGV y el ácido sulfhídrico son inhibidores de las bacterias metanogénicas (Flotats et al., 2005).

La disminución del pH en la acumulación de acompañamiento de AGV es la principal causa de la toxicidad y el fracaso del reactor en el proceso de digestión anaerobia (Ahring, 1995). Esto se debe a que la toxicidad de los AGV depende del pH, ya que sólo la forma no ionizada es tóxica para los microorganismos. Los AGV son tóxicos al pH cuando existen en formas protónicas a valores bajos de pH, ya que pueden penetrar la membrana celular. Cuando están dentro de la célula, donde el pH es de alrededor de 7, se ionizan y los iones de hidrógeno se liberan causando una disminución en el pH intracelular (Björnsson et al., 2000).

#### **1.2.5 Codigestión Anaerobia**

El término codigestión se utiliza para expresar la digestión anaerobia conjunta de dos o más sustratos de diferente origen. La ventaja principal radica en el aprovechamiento de la sinergia de las mezclas, compensando las carencias de cada uno de los sustratos por separado. La codigestión de residuos orgánicos de diferente origen ha resultado una metodología exitosa tanto en régimen termofílico como mesofílico (UPC, 2007).

El cotratamiento consiste en el tratamiento conjunto de residuos orgánicos diferentes, con el objetivo de:

1. Aprovechar la complementariedad de las composiciones para permitir perfiles de proceso más eficaces.
2. Compartir instalaciones de tratamiento.
3. Unificar metodologías de gestión.
4. Amortiguar las variaciones temporales en composición y producción de cada residuo por separado.
5. Reducir costes de inversión y explotación

Con esta tecnología se consigue una operatividad muy buena generando mayor cantidad de energía sin aumentar la tasa de CO<sub>2</sub>, aprovechando los residuos sólidos y reduciendo el coste asociado. Asimismo, se obtiene un inóculo digerido, estabilizado y se disminuyen los requerimientos de espacio para el almacenamiento o los gastos derivados del transporte, abaratando los costes de gestión. Con estas características la codigestión anaerobia se ha convertido en una de las tecnologías de producción de bioenergía muy eficientes desde el punto de vista energético, y una de las más beneficiosas para el medio ambiente. Investigar esta tecnología es muy positivo para la EDAR, ya que puede convertirse en gestora de residuos, generando un plus de energía y mejorando las emisiones de CO<sub>2</sub>.

Por otro lado, el uso de un cosustrato en ocasiones resulta ventajoso en términos económicos, ya que implica la combinación de flujos de residuos distintos en una única instalación y permite tratar mayores cantidades de residuos en instalaciones centralizadas a gran escala. Una revisión publicada recientemente sobre procesos de digestión anaerobia revela que los principales residuos utilizados son: fango de depuradora (27%), estiércol de distinto origen (25%), FORSU (Fracción Orgánica de Residuos Sólidos Urbanos) (21%), residuos orgánicos industriales (13%), cultivos (5%), residuos de actividades agrícolas (4%) y residuos de animales y de industrias cárnicas (4%) (Mata-Álvarez et al., 2011).

Sin embargo, la proporción más baja puede ser suficiente si hay desechos concentrados disponibles (Gregersen, 2003). Otra ventaja de la codigestión es que el alto contenido de agua en el estiércol ayuda a diluir los desechos orgánicos concentrados que serían inhibitorios y difíciles de tratar por separado. Además, la alta capacidad de amortiguación en el estiércol hace que el proceso sea más resistente al efecto de la acumulación de AGV. (Angelidaki y Ellegaard, 2002).

Se han conseguido buenos resultados con la codigestión de lodos de depuradora y la fracción orgánica de residuos municipales, la mezcla de estos últimos con aguas residuales urbanas, y la codigestión de fangos de depuradora y residuos de frutas y verduras. El mezclar un residuo sólido con otro más diluido como un fango, permite un mejor manejo y degradabilidad, además de diluir y contrarrestar el efecto de inhibidores y también aportar nutrientes específicos que puedan estar ausentes (Schmidt, 1999).

La codigestión de residuos agropecuarios y de la industria alimentaria es en la actualidad el método en el que se basan las plantas que presentan balances económicos equilibrados o favorables en los países de la UE, lo cual permite abordar la gestión posterior del material digerido con menores costes que la vía usual de compostaje aerobio. Esto es posible por las primas a la producción eléctrica a partir del biogás que la mayoría de los países tiene aprobadas. En España, estas primas se rigen por el Real Decreto 661/2007 (EurObserver, 2019).

Sin embargo, la falta de estudio sobre los sustratos y el análisis de las distintas mezclas en la codigestión es un punto en el cual hay que trabajar, ya que un asunto débil de este tratamiento es la mezcla indebida de dos o más sustratos. También hay que prestar atención en los posibles inhibidores que puedan tener estos sustratos, para lo cual, lo mejor es realizar ensayos de BMP (biochemical methane potencial) o AME para saber su compatibilidad y evitar sustratos inhibitorios.

## **1.2.6. Legislación de Fangos**

A nivel nacional y europeo existe normatividad acerca de los residuos sólidos y su debida disposición final, a continuación, se expone la Orden de la junta de Andalucía y la directiva 86 de la unión europea.

### **1.2.6.1 Orden de 6 de agosto de 2018**

Orden de 6 de agosto de 2018 conjunta de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural y de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, por la que se regula la utilización de lodos tratados de depuradora en el sector agrario. En el apartado otros tratamientos, se expone: Se incluyen en este apartado distintas metodologías para el tratamiento de lodos, distintas del compostaje, que permiten obtener un lodo tratado mediante la reducción de su poder de fermentación y de su potencial para causar molestias y daños para la salud y el medio ambiente.

Digestión anaerobia termófila, a una temperatura mínima de 55 °C con un tiempo de retención media de 15 días, o bien a la temperatura mínima de 53° durante 24 horas en «batch», es decir, sin alimentación ni purgas del digestor durante el método de tratamiento.

Digestión anaerobia mesófila, a una temperatura mínima de 35 °C, con un tiempo de retención medio de 12 días, siempre que a los lodos se le haya sometido a un tratamiento térmico inmediatamente anterior de, al menos, 70 °C durante 30 minutos (Boja, 2018).

### **1.2.6.2 Directiva 86/278**

Por la cual se dispone la protección de los suelos en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura.

La presente Directiva establece las normas que regulan el uso de lodos de depuradora como fertilizante por parte de los agricultores, para evitar los efectos nocivos para el medio ambiente y el ser humano al poner en peligro la calidad de los suelos o de las aguas superficiales y subterráneas. Normalmente, los lodos deben tratarse antes de utilizarse para la agricultura. Sin embargo, algunos países de la Unión Europea (UE) pueden permitir que los agricultores utilicen lodos no tratados cuando se inyecten o entierren en el suelo. En ciertas situaciones, queda totalmente prohibida la utilización de lodos para la agricultura:

En pastos o en cultivos para pienso que van a ser objeto de pastoreo y durante un mínimo de tres semanas antes de la cosecha de los cultivos. En cultivos hortícolas y frutícolas durante el período de vegetación, con la excepción de los cultivos de árboles frutales En suelos destinados a cultivos hortícolas o frutícolas que estén normalmente en contacto directo con el suelo y que se consuman normalmente en estado crudo. Esta prohibición se aplica durante un período de diez meses antes de la cosecha y durante la propia cosecha Las autoridades nacionales deben velar por que los agricultores no superen los límites legales al utilizar lodos, obtener muestras y analizar los lodos y los suelos en que se usan, y mantener un registro de las cantidades de lodo producidas y las que se dedican a la agricultura; la composición y las características de los lodos; el tipo de tratamiento realizado; dónde y quién los utiliza. La Comisión Europea publica un informe periódico sobre la utilización de los lodos en la agricultura de la UE, en el que se recopila la información facilitada por cada país sobre esta cuestión (UE, 1986).

### 1.2.7 Residuos orgánicos de alta Carga

El carácter que define a un material como residual no es tanto el interés o no de su generación, sino el hecho de que se forma como subproducto sobrante de una operación o actividad, tanto en los procesos intermedios como por el uso o consumo final. Así, se entiende por residuo todo material o sustancia inútil, o no deseado, que es abandonado por quien lo genera, y que es susceptible de aprovechamiento o transformación en un nuevo bien, con valor económico o para disposición final.

Los residuos industriales son residuos resultantes de los procesos de fabricación, de transformación, de utilización, de consumo, de limpieza o mantenimiento generados por la actividad industrial. Algunos ejemplos de industrias con residuos adecuados para la generación de biogás son: Industria cervecera, industria láctea, industria panadera, frigoríficos, procesamiento de frutas, vegetales, cereales., producción de conservas; de levaduras, preparación de melazas. También, se incluyen los residuos de producción de bebidas alcohólicas y no alcohólicas; residuos de la industria de cuero y pieles y residuos de procesamiento de azúcar (Hernández, 2015). A continuación, se muestra en la tabla 1 algunos residuos industriales y su potencial de producción de metano.

Clase de residuo	Contenido orgánico	Sólidos volátiles %	Producción de biogás m <sup>3</sup> /tonelada
Aceites de pescado	30-50% lípidos	80-85	350-600
Suero	75-80% lactosa	7-10	40-55
Hidrolizado de carne y huesos	70 % proteína – 30 % lípidos	10-15	70-100
Aceite soja/margarinas	90% aceites vegetales	90	800-1000
Bebidas alcohólicas	40 % alcohol	40	240
Tierras filtrantes de aceites	80 % lípidos	40-45	350-450
Lodos de flotación	70 % proteínas 30 % lípidos	13-18	90-130

**Tabla 1.** Potenciales de producción de biogás de algunos residuos orgánicos de la industria alimentaria. Fuente: Angelidaki, I., Ahring, B.K. (1997).

La alta carga orgánica que convierte residuos industriales en residuos contaminantes favorece la utilización como insumo para la generación de biogás. Los componentes de residuos orgánicos que presenta una excelente biodegradabilidad, favoreciendo una mejor producción de biogás, son los azúcares, el almidón y las proteínas. Otros componentes orgánicos como las grasas, aceites y la celulosa tienen una buena biodegradabilidad.

Como se ha visto, el sector industrial genera una gran cantidad de residuos que son susceptibles de ser tratados con la digestión anaerobia, aunque se debe evitar exceso en la alimentación ya que la abundancia del sustrato puede interferir con el buen funcionamiento del reactor. Unos años atrás, la industria disponía estos residuos en vertederos o celdas de seguridad para evitar la contaminación del suelo y las aguas subterráneas, lo que incrementaba el costo de disposición de estos residuos. Sin embargo, recientemente el sector industrial ha visto en las EDARs un sitio donde se puede disponer de manera controlada los residuos, a un menor costo y con un valor agregado que es la producción de energía eléctrica que beneficia a todos los sectores económicos.

### 1.2.8 Digestores de alta Velocidad

El tratamiento anaeróbico de alta velocidad se ha convertido en una alternativa viable para el tratamiento de muchas aguas residuales industriales y municipales, debido a su capacidad para separar los tiempos de retención hidráulica y sólida de manera efectiva. Dado que se puede acumular una alta concentración de biomasa en el sistema, se permiten tiempos de retención hidráulica relativamente bajos en los procesos de tratamiento anaeróbico de alta velocidad. La retención de una alta concentración de lodo activo asegura un buen rendimiento del tratamiento, por ejemplo, se informan reducciones totales de DQO de hasta 80-90% (Leitao et al., 2006).

Incluso a temperaturas inferiores a 20°C, se puede esperar una eliminación total promedio de DQO del 70%. El bajo costo de construcción, los pequeños requisitos de terreno y las altas tasas de carga son otros beneficios de estos sistemas. Los costos de operación y mantenimiento son más bajos, así como el consumo de energía y los requisitos de equipo. En comparación con los procesos de tratamiento aeróbico y fisicoquímico, se produce una menor producción de lodo y el biogás producido, se puede utilizar para la producción de energía (Kujawa-Roeleveld y Zeeman, 2006; Leitao et al., 2006).

Los reactores anaeróbicos de alta velocidad típicos se clasifican como proceso de contacto anaeróbico, película fija o reactor de filtro anaeróbico (AF), reactor de película fija estacionaria de flujo descendente, reactor de lecho fluidizado, reactor de lecho de lodo granular expandido (EGSB), reactor de circulación interna, reactor anaeróbico deflector (ABR), reactor de capa de lodo de flujo ascendente hidrolítico (HUSB), reactor de lecho de lodo anaeróbico de flujo ascendente (UASB) y el reactor híbrido anaerobio (AH) (Aiyuk et al., 2006). De acuerdo con Leitao et al. (2006), existen cuatro indicaciones para evaluar la robustez y la estabilidad de un UASB y, por lo tanto, de otros reactores anaeróbicos: eficiencia de eliminación de DQO, variabilidad del efluente, estabilidad del pH y tiempo de recuperación. En la siguiente tabla se exponen residuos industriales tratados con algunos de los reactores mencionados.

Residuo	Reactor	T <sup>a</sup> (°C)	Carga (kg DQO/m <sup>3</sup> d)	TRH (h)	Degradación DQO %
Grasas	EGSB	10-12	10-12	1,6-2,5	90
Maltería	EGSB	16	4,4-8,8	2,4	56
Frigorífico	FA		4,2	12,5	80-85
Conservas	UASB		0,5-1,2	12-18	80
Aceite de palma	FH	38	3-23	1,5-3	89-97
Destilería whisky	UASB	35	30-39	20	90-96
Lácteas	UASB	35	4-20	2	72-90
Patata	UASB	35	2,5-10	0,75	85-95
Papel	UASB	40	17-20	6-24	60-80

**Tabla 2.** Referencias de sistemas anaerobios de alta carga. Fuente: Xavier Flotats, Belén Fernández, (2008).

Estos reactores de alta velocidad requieren de más vigilancia debido a que se incrementa la presencia de microorganismos anaerobios y también existe una mayor probabilidad de inhibición.

Los procesos termodinámicos más veloces por lo general requieren de más atención debido a que la actividad del inóculo es más alta y los microorganismos requieren una atención adicional. La necesidad de mantenimiento en esta clase de sistemas es más recurrente lo que puede llevar a subir los costos de operación. Según Iza, tres aspectos fundamentales en los que se basa el concepto de reactores anaeróbicos de alta velocidad son: que la biomasa puede acumularse dentro del reactor por medio de sedimentación, fijación de sólidos (fijos o móviles) o por recirculación, que se mejora el contacto entre la biomasa y las aguas residuales que supera los problemas de difusión de sustratos y productos de biopelículas o gránulos y finalmente, debido a la adaptación y al crecimiento, que se mejora la actividad de la biomasa (Iza, 1991).

Además, la operación eficiente se puede determinar principalmente por la separación efectiva de la biomasa de la fase líquida. Los microorganismos de crecimiento lento se pueden retener asegurando que el tiempo medio de retención de sólidos sea mucho más largo mientras se mantienen cortos los tiempos medios de retención hidráulica. Por lo tanto, estas configuraciones permiten altas cargas orgánicas en tamaños de reactores pequeños, y los largos tiempos de retención de sólidos proporcionan generalmente una buena estabilidad del proceso (Aiyuk et al., 2006).

El UASB es uno de los reactores anaerobios de alta velocidad más expandidos alrededor del mundo, sobre todo en países tropicales, ya que en estas zonas la temperatura se mantiene constante todo el año. Son utilizados para la industria alimentaria, en la industria de bebidas gaseosas, cerveceras, fabricación de zumos, tratamiento de residuos de matadero, residuos porcinos y residuos de alta carga orgánica. En estos reactores generalmente se forman gránulos en los cuales los microorganismos conforman consorcios y permiten una alta velocidad de degradación, la formación de gránulos como se observa en la figura 3 es un indicador de que el UASB está operando de forma correcta.



**Figura 3.** Reactor UASB y gránulos anaerobios, laboratorio TAR

### **1.3 Hipótesis de Investigación**

Los bioindicadores estudiados son indicadores representativos del estado y actividad de un inóculo anaerobio.

Es posible gestionar los digestores anaerobios con bioindicadores para conocer el comportamiento interno de estos, mejorando con anticipación las evidencias que resultan del uso de parámetros fisicoquímicos.

Con la utilización de bioindicadores se hace más rápido y exacto el mantenimiento y control de digestores anaerobios en planta donde las respuestas tempranas son fundamentales para evitar la inhibición de estos sistemas.

En el laboratorio de la EDAR, estos bioindicadores pueden utilizarse para realizar un histórico y utilizarlos como herramientas de seguimiento que permitan observar el comportamiento de los microorganismos en un determinado control. Estos procesos de toma de datos históricos puede ser un paso determinante a nivel operacional y un plus en las depuradoras municipales. Además, pueden usarse para una gestión preventiva aplicándolos cada cierto tiempo y para la solución de averías en el momento en que se produzcan.

La aplicación de los bioindicadores como las actividades específicas y el ADN se pueden realizar en primera instancia en el laboratorio de la EDAR y luego con una asistencia técnica externa se realicen el análisis de otros bioindicadores moleculares que requieran de equipamiento más especializado.

### **1.4 Objetivos**

Ensayar diferentes métodos analíticos para validar la técnica de los diferentes bioindicadores.

Evaluar el uso de bioindicadores como herramientas de predicción en digestores y reactores de laboratorio.

Determinar si los resultados de los bioindicadores se correlacionan con los parámetros fisicoquímicos en su aplicación a inóculos anaerobios en sistemas estables e inestables.

Determinar el mantenimiento y control necesarios para trabajar con bioindicadores tanto en las estaciones de depuradoras urbanas e industriales como en asistencias técnicas que puedan realizar un control externo.

## **1.5 Metodología**

En esta investigación utilizamos la metodología de la investigación para plantear los objetivos e hipótesis de investigación. Así mismo, trabajamos con diseños experimentales que se aplicaron a los ensayos realizados en cada etapa de la investigación. A continuación, se explica el propósito y la metodología de cada etapa.

### **1.5.1 Etapa 1**

En esta etapa de la investigación, se quería optimizar el método de las actividades específicas ya que no se encuentra un método estandarizado. Existen varias referencias en bibliografía como la de Soto et al, de donde se obtuvo información importante además de otras referencias que se enuncian en la introducción (Soto et al,1993). El experimento se realizó con tres réplicas para cada actividad específica y para el control. Al inicio y el final del experimento se midió los parámetros fisicoquímicos. Lo mismo se realizó con el método de la extracción de ADN, el cual se optimizó y adecuó a las características de muestras de fangos anaerobios. El resultado de esta etapa fue la obtención de estos dos métodos.

### **1.5.2 Etapa 2**

Esta etapa de la investigación consistió en la aplicación de los dos bioindicadores optimizados en la primera etapa. Para esto, se realizaron ensayos de actividades específicas en cinco inóculos diferentes, algunos de ellos con codigestión. El objetivo principal de la etapa dos, es observar el comportamiento de los inóculos mediante el uso de actividades específicas y la extracción de ADN, además de realizar correlaciones entre los bioindicadores y los parámetros fisicoquímicos. Con los resultados en esta etapa, se podría obtener información como: ¿Cuál inóculo tuvo mejor rendimiento y por qué? ¿Qué parámetros se correlacionan fuertemente con los bioindicadores? y definir si estos bioindicadores son representativos en el diagnóstico de digestores anaerobios. El experimento se realizó con tres réplicas para cada actividad específica y para el control. Al inicio y el final del experimento se midió los parámetros fisicoquímicos y se midió el metano producido todos los días del ensayo.

### **1.5.3 Etapa 3**

En la etapa tres, se quiso utilizar los bioindicadores con el fin de obtener información genética de tres reactores anaerobios. Se quería conocer la abundancia relativa y la actividad de las bacterias, las arquea metanogénicas y las sulfatoreductoras presentes en los inóculos. La metodología utilizada consistió en aplicar primero las actividades específicas para realizar un seguimiento a la producción de metano de cada reactor y en el momento en que la producción de metano se estabilizaba, se realizó una segunda alimentación para favorecer la especialidad de los microorganismos. La muestra para la extracción de ADN y para la qPCR se tomó un día antes de la estabilización de la curva de crecimiento. Esto se puede hacer, si la primera curva de producción de metano tiene una tendencia exponencial.





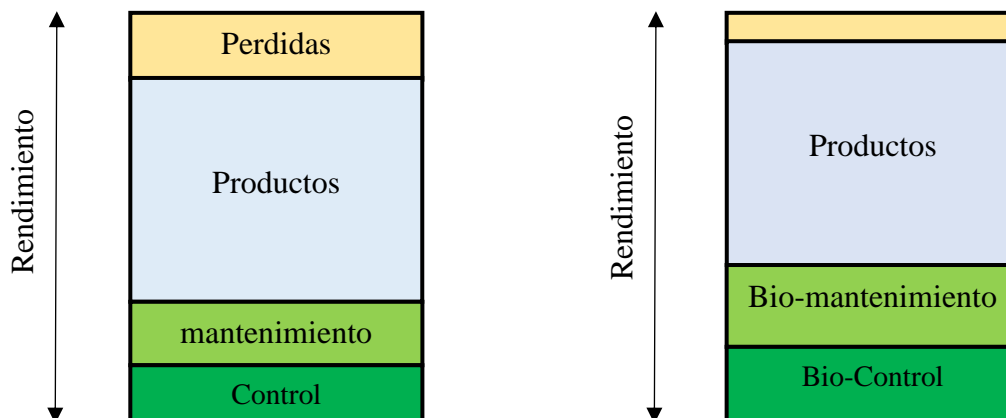
## **2. BIOMANTENIMIENTO Y BIOCONTROL DE DIGESTORES ANAEROBIOS**



## 2.1 Biomantenimiento

En este capítulo se hablará de los diferentes bioindicadores, las técnicas y métodos microbiológicos y genéticos que se han utilizado hasta ahora en el mejoramiento de la digestión anaerobia. Posteriormente se expondrán diferentes vías biológicas para remediar problemas ocasionados en los reactores, medidas que están ligadas a los parámetros de operación de los digestores anaerobios.

En la figura 4 se observa cómo se puede reducir las pérdidas energéticas aplicando el Biomantenimiento. Estos indicadores al ser biológicos permiten obtener una foto más realista de lo que está sucediendo con las comunidades microbianas y por ello los diagnósticos pueden ser más efectivos.



**Figura 4.** Mantenimiento vs Biomantenimiento de la digestión anaerobia. Adaptada de Fernandez Polanco.

El Biomantenimiento consiste en realizar un diagnóstico del inóculo utilizando bioindicadores, con los cuales se puede realizar un histórico que nos facilitaría una radiografía más precisa del metabolismo de los microorganismos. Las medidas correctivas y preventivas del biocontrol se realizarán por medio de medidas biológicas, es decir, la manipulación sintrófica y metabólica de los microorganismos.

La mayoría de los biorreactores de digestión anaerobia funcionan de manera conservadora al limitar la velocidad de carga orgánica porque una falla de la operación no solo es costosa y lleva mucho tiempo (hasta varios meses) reiniciar o restablecer los consorcios microbianos y el proceso, sino que también afecta o interrumpe la energía producida (Zhang, 2010). En este sentido, los bioindicadores serían una herramienta útil para lograr aumentar velocidades de carga sin miedo a excesos en el sistema.

Los esfuerzos combinados de los microbiólogos ambientales, que trabajan en investigaciones fundamentales y los ingenieros ambientales, que tienen experiencia en el trabajo práctico, siguen siendo muy esenciales para garantizar que se pueda incorporar un mayor avance de la microbiología molecular ambiental en el diseño y operación de reactores anaerobios. Esta es una gran oportunidad, pero también un gran desafío, para el desarrollo posterior de la tecnología anaeróbica.

## **2.1. Bioindicadores Anaerobios**

Los bioindicadores proporcionan información determinante acerca de estado y la actividad de los microorganismos y se ha comprobado su correlación con parámetros fisicoquímicos comúnmente utilizados en las depuradoras. Los estudios de comunidades microbianas, por ejemplo, en el tratamiento anaeróbico han avanzado significativamente con la aplicación de diversas técnicas moleculares. Las referencias acerca de bioindicadores como indicadores de comportamiento en la digestión anaerobia son variadas en literatura. Por ejemplo, se han investigado los efectos interactivos sobre la AME en mesófilos y termofílicos y se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para optimizar la producción de metano. Los resultados de estas investigaciones muestran una interacción significativa entre los sustratos y una mejora de la producción de metano y la AME, e hicieron posible identificar los efectos de interacción del sustrato en un rango de concentración con un número reducido de experimentos (Jiménez et al., 2015).

La coenzima  $F_{420}$  ha sido estudiada como indicador del potencial de un inóculo en producir metano, es rápida su extracción y fácil determinar por espectrofluorimetría. Este factor, actúa como cofactor de varias enzimas por la incorporación de  $CO_2$  en un carbono orgánico. Este factor tiene un rol principal en la producción de metano como donador de electrones en el sistema reductasa en el paso final de la reducción de  $CO_2$  en metano. Se ha encontrado una alta correlación entre la  $F_{420}$  y la biomasa microbiana. Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre la  $F_{420}$  y la producción de metano, por lo que los resultados de este factor y el potencial de producción de metano son contradictorios (Koorneef et al., 1990).

Por su parte, Min Zhang descubrió que la dinámica del nivel de dinucleótido de adenina de nicotianamina (NADH) durante la codigestión anaeróbica era un indicador válido de la producción de VFA, especialmente en la etapa más temprana de fermentación (Min Zhang, 2019). Dong Lin y sus colaboradores recomendaron como indicadores de calentamiento temprano las proporciones de  $CH_4/CO_2$ , AGV/ALC, propionato, n-butilato e iso-valerato (Dong Lin, 2017).

Se ha utilizado una población de metanógenos para encontrar un bioindicador que represente una forma de conocer el comportamiento del reactor para el diagnóstico temprano de un desequilibrio o una situación de estrés en la comunidad microbiana (Traversi et al., 2011). Rosenblum et al, trabajaron con indicadores microbianos y químicos que sugieren que puede existir una relación entre un ambiente de digestor ideal y el pH (Rosenblum et al., 2015). Campaña et al, estudiaron la actividad enzimática como indicador de la evolución de procesos anaerobios, considerando que, en la hidrólisis, las enzimas son las encargadas de reducir moléculas de gran tamaño. Fueron determinadas la actividad de celulasas y glucosidasas utilizando como sustrato estiércol vacuno y pasta de cebolla. Las variaciones encontradas en las actividades enzimáticas específicas y su relación con las condiciones operativas serian indicadores tempranos de cambios en la producción de biogás (H. Campaña et al., 2015).

Estos bioindicadores descritos serán alternativas para realizar un diagnóstico efectivo. Como argumenta Dong, el monitoreo y diagnóstico efectivo de los procesos es un gran desafío para los reactores de digestión anaeróbica, lo que limita su funcionamiento estable. Estos bioindicadores deberían ser idealmente precisos y sensibles a las fluctuaciones ambientales y revelar la dinámica de cambio del estado de un reactor (Dong et al., 2017).

### 2.1.1 Actividades Específicas

Algunos investigadores han trabajado con la actividad metanogénica específica, pero no lo utilizan como bioindicador sino la utilizan como herramienta para analizar reactores pilotos antes de poder utilizar el método en estaciones depuradoras. Por ejemplo, Ince y Anderson trabajaron con AME para el control de la carga orgánica en el sistema anaeróbico (Ince et al, 1995). Can Liu, caracterizó la digestión anaeróbica con alto contenido de sólidos utilizando acetato, glucosa, celulosa microcristalina, hidrógeno y dióxido de carbono como sustratos (Can Liu, 2016). También, Jiménez optimizó la AME en codigestión de estiércol de cerdo y paja de arroz, corroborando un efecto positivo de la arcilla como aditivo inorgánico para estimular la digestión anaeróbica de estiércol de cerdo, encontrando que en el rango termófilo el comportamiento de la AME es mejor (Jiménez et al., 2015).

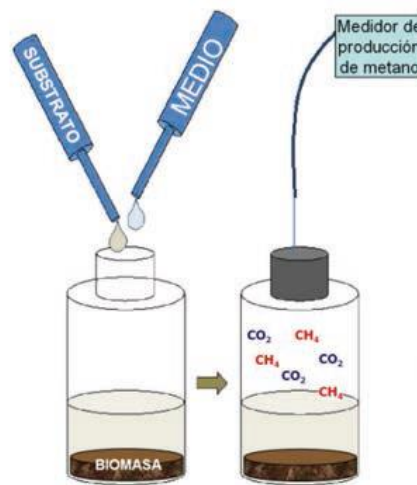


Figura 5. Elaboración actividades específicas

### 2.1.2 Actividad hidrolítica específica

La hidrólisis de algunas moléculas complejas es un paso limitante en los digestores anaeróbicos, por esto, la determinación de la actividad hidrolítica del lodo anaeróbico y un sustrato específico podría ser importante en la selección del mejor equipo para el control de las condiciones del proceso (Soto et al., 1993). Para llevar a cabo la actividad hidrolítica generalmente se utilizan como sustrato moléculas complejas como un azúcar, proteína o algún lípido. Normalmente se utiliza la celulosa, un azúcar que se encuentra en gran variedad de residuos lignocelulosos, como podas de jardines, árboles o residuos de cosechas. También se puede utilizar la peptona, una proteína que se encuentra de manera abundante en residuos de origen animal.

Una de las razones por las cuales se realiza esta actividad, es debido a que es considerada una fase limitante en la digestión anaerobia, también es usada para saber si la actividad hidrolítica es la causa de una baja producción de biogás o de alguna falla en el sistema. Si en el ensayo la curva de la AHE es menor que la del control, quiere decir que las bacterias hidrolíticas tienen problemas para degradar la materia orgánica. Para este tipo de inconvenientes, se puede tomar medidas en el reactor para facilitarle el trabajo a las bacterias hidrolíticas. Por ejemplo, se puede realizar un pretratamiento de trituración, para eliminar los grandes sólidos de residuos vegetales y dárselos más desmenuzados a las bacterias. También suele utilizarse una degradación aerobia, como pretratamiento para que la alimentación este más digerida.

### **2.1.3 Actividad acidogénica específica**

En la fase acidogénica, los monosacáridos y los aminoácidos se degradan por la acción de las enzimas secretadas por las bacterias acidogénicas obteniendo nutrientes y la energía necesaria para sobrevivir. Como "subproductos" se generan ácidos butíricos, propiónico y valérico y, en pocas proporciones, acetatos. Esta fase no limita la reacción anaeróbica, pero es importante para las bacterias acetogénicas.

La evaluación de la actividad acidogénica puede proporcionar información importante sobre el desarrollo de la biomasa y el comportamiento dinámico en los digestores anaerobios (Soto et al., 1993). Para realizar el ensayo de la AAE, se utiliza generalmente Glucosa que es un azúcar abundante en el mundo vegetal y que estas bacterias pueden digerir directamente para producir ácidos.

Uno de los objetivos para realizar este ensayo, es conocer el estado de las bacterias fermentativas y si existe un equilibrio del Hidrógeno para todo el proceso. Recordemos que en esta fase se produce mucho del  $H_2$  que las metanogénicas toman para producir biogás. Si las bacterias acidogénicas están fallando, no habrá muchos AGV para convertirlos en acetato. Sin embargo, esto es poco común y en general esta fase se comporta de manera efectiva.

Otro escenario que se puede observar es cuando la AAE es más alta que las otras actividades, generalmente es debido a la abundancia de AGV que las acetogénicas no pueden transformar en acetato e hidrógeno, por lo cual, el nivel de pH puede bajar drásticamente. En estos casos, se debe adicionar alguna base o cambiar la alimentación del reactor para bajar el nivel de AGV y por consiguiente subir el pH. No es muy conveniente utilizar bases para alcalinizar el inóculo, una mejor técnica es adicionar algún sustrato a la alimentación como sueros de leche o agua residual alcalina en tratamiento de codigestión para equilibrar los niveles de ácidos.

#### **2.1.4 Actividad Metanogénica específica**

La AME se utiliza para conocer la calidad del inóculo en los reactores anaerobios, que evalúa el comportamiento de la biomasa contaminada y determina el máximo material orgánico que se puede ingresar a un reactor anaerobio. El principal objetivo de este análisis es obtener la capacidad del tratamiento de un inóculo, la toxicidad del sustrato determinado y la posibilidad de elegir un inóculo (Ortiz et al, 2011). Según Hussain, la AME, determina la capacidad de producción de metano del inóculo para un sustrato específico en el nivel de concentración donde la disponibilidad del sustrato no es un factor limitante (Hussain y Dubey, 2013).

Javed por su parte, enuncia que la prueba de la AME también permite la evaluación de lodos anaeróbicos para niveles de microorganismos metanogénicos y relativos en diferentes condiciones. El uso de la AME podría ser posible para determinar la capacidad de carga potencial de los sistemas de tratamiento anaeróbico, permitiendo así aplicar las tasas de carga orgánica apropiadas (Javed y tare, 1999). Cuando se conoce la AME de un inóculo, también es posible establecer la capacidad máxima de eliminación de la DQO de la fase líquida, permitiendo una carga orgánica máxima estimada que es posible aplicar a un reactor anaeróbico evitando su desestabilización.

Cuando se realiza este ensayo por lo general se utiliza acetato de sodio como sustrato, aunque algunas investigaciones utilizan ácidos butíricos, propiónico, valérico, etc. Sin embargo, en esta investigación se probó con estos ácidos sin encontrar buenos resultados. La fase metanogénica es clave en el proceso, por esto, si la curva del AME es más baja que la del grupo control, quiere decir que las metanogénicas no están cómodas en el medio. En este caso se debe revisar los análisis fisicoquímicos y en base a ello, tomar decisiones de cambio de alimentación, adición de nutrientes, o suministro de enzimas o microorganismos metanogénicos. Es posible que las arquea se vean afectadas por la saturación de AGV, debido, por ejemplo, a un desequilibrio debido de hidrógeno o acetato.

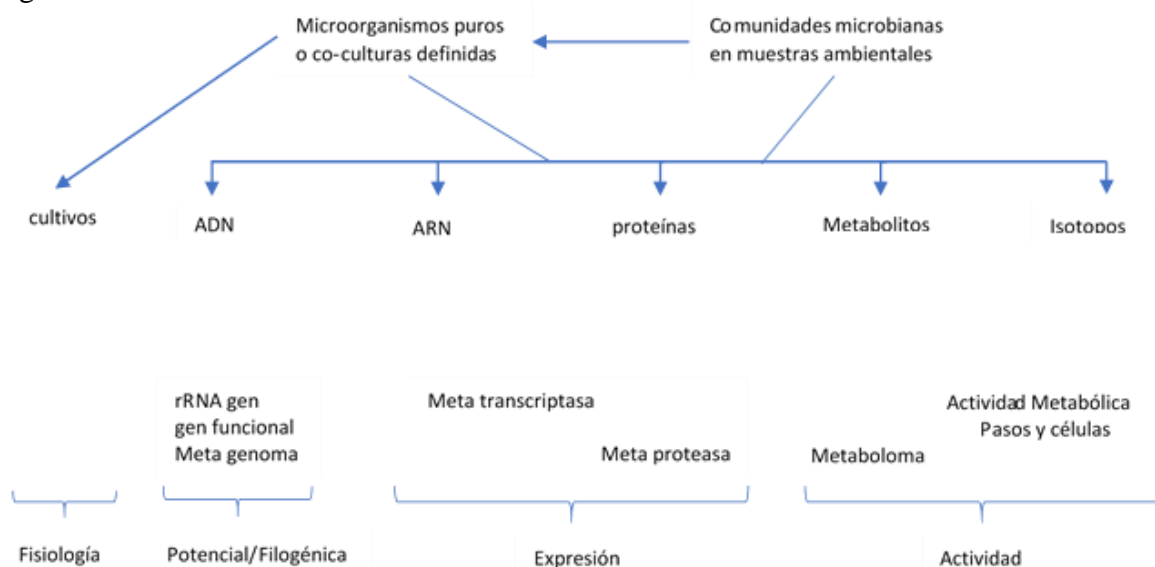


## 2.2 Bioindicadores Moleculares

Las comunidades microbianas involucradas en la digestión anaerobia han sido investigadas principalmente a través del trabajo de aislamiento y cultivo, pero en los últimos años también se han utilizado diversas técnicas moleculares para determinar la abundancia relativa y la dinámica de la comunidad microbiana y el nivel de actividad extracelular (Cabezas et al., 2015).

El conocimiento que tenemos hoy sobre las capacidades fisiológicas de los microorganismos involucrados en el proceso de biogás deriva en gran medida de las metodologías microbiológicas tradicionales, es decir, del aislamiento y el cultivo de cepas y especies puras. La invención de técnicas para el cultivo de anaerobios estrictos puede considerarse un avance en el área de la digestión anaerobia. Durante muchos años, estos métodos representaron las principales herramientas para generar conocimiento sobre los organismos que participan en la producción de metano (Schnürer, 2015).

Sin embargo, con las poderosas herramientas disponibles en la actualidad, el conocimiento de estos organismos aislados se ha expandido para incluir información detallada sobre su estructura genómica y expresión génica, así como información valiosa sobre mecanismos dentro del metabolismo microbiano. Para generar información con respecto a la fisiología, la filogenia, la expresión y la actividad, se puede utilizar una variedad de enfoques diferentes, tanto métodos de cultivo como moleculares, así como técnicas de etiquetado, utilizando muestras ambientales, cocultivos definidos o cepas microbianas puras como se aprecia en la figura 6.



**Figura 6.** Técnicas de estudio microbiológicas de la digestión anaerobia. Figura adoptada de Vanwonterghem et al.

El aislamiento y el cultivo se pueden utilizar para estudiar la fisiología y generar información con respecto a la utilización del sustrato, etc. El análisis del ADN revela información con respecto a la filogenia y muestra el potencial genético de cepas puras y comunidades enteras, y el análisis del ARN (transcriptoma) muestra datos reales y expresión de diferentes genes. Tanto el ADN como el ARN también se pueden usar para apuntar y cuantificar genes específicos, ya sea ARNr o genes funcionales.

La proteómica y la metabolómica reflejan la expresión y la actividad de las proteínas funcionales. Por su parte, las técnicas de marcado como sondas de fluorescencia e isótopos estables o radiactivos se pueden utilizar para generar información sobre rutas específicas, para mostrar la correlación entre la actividad y las células y para visualizar las células. El uso de una combinación de estos enfoques puede generar información valiosa necesaria para vincular la estructura de la comunidad con la función de los digestores anaeróbicos (Schnürer, 2015).

Por otro lado, la identificación de microorganismos anaeróbicos estrictos es un gran desafío, debido al requerimiento de bajas concentraciones de oxígeno y el alto grado de comensalismo y mutualismo en las comunidades, lo que dificulta su aislamiento y cultivo (Mori et al., 2014). Se ha introducido un número significativo de nuevos métodos de cultivo en los últimos 10 años, lo que ha llevado a un aumento significativo en la recuperación microbiana. Las estrategias que han tenido éxito incluyen el uso de metabolitos / sustancias señal en los medios, tiempos de incubación prolongados y cocultivo (Epstein., 2013).

Además, para facilitar y simplificar su aislamiento, métodos menos laboriosos para cultivar y aislar microorganismos anaerobios, como un sistema de placa de seis partes, se han desarrollado (Nakamura et al, 2011). Esta técnica se ha utilizado con éxito para aislar una serie de anaerobios estrictos, incluido el primer representante metanogénico de la clase Thermoplasmata, *Methanomassilicoccus* (Narihiro, 2013). Este organismo se aisló por primera vez de las heces humanas, pero últimamente también se ha observado en diferentes procesos de biogás y se sugiere que es importante para mantener la producción de metano a altas cargas orgánicas (Westerholm et al, 2015).

La identificación y cuantificación de especies microbianas involucradas en la degradación anaeróbica son esenciales para el estudio de la tecnología anaeróbica y para la optimización de las condiciones operativas de los reactores. Convencionalmente, los microorganismos se identifican aislando cultivos puros y luego caracterizando sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y morfológicas (Rao et al. 2000). Sin embargo, estos métodos tradicionales tienen sesgos serios. Primero, muchos microorganismos pueden no estar adecuadamente aislados, porque los medios de crecimiento artificiales pueden no simular exactamente el ambiente en los reactores anaerobios. Segundo, muchos microorganismos requieren interacción sintrófica con otros, especialmente para la degradación de contaminantes refractarios, y por lo tanto no pueden ser cultivados individualmente (Wagner et al. 1993). En tercer lugar, algunos microorganismos comparten características fisiológicas, bioquímicas y / o morfológicas similares y, por lo tanto, no se pueden distinguir entre sí. Como resultado, muchos estimaron que no más del 1% de las bacterias existentes habían sido aisladas y caracterizadas (Amann 1995).

Actualmente, los microorganismos pueden distinguirse sin ambigüedades por las secuencias de ADN de sus genes, por ejemplo, genes de ARN ribosómico (ARNr), que se usan como biomarcadores. Con la aplicación de técnicas moleculares basadas en ácidos nucleicos, se ha descubierto que las comunidades microbianas en el proceso anaeróbico son muy diversas, y las interacciones entre las diferentes especies y la regulación de las funciones metabólicas siguen siendo desconocidas. Otros estudios sobre los efectos de los factores operativos (incluida la temperatura, el pH, la velocidad de carga, etc.) en las comunidades microbianas utilizando técnicas moleculares ayudarán a la optimización del proceso anaeróbico, en un aumento de la estabilidad del reactor y la maximización del rendimiento de metano.

### **2.2.1 Ácidos nucleicos**

La fiabilidad de las técnicas moleculares depende de la calidad y la representación del ARN/ADN extraído de las muestras del inóculo en reactores anaerobios. La cantidad inicial de muestras para la extracción de ácido nucleico debe cuantificarse en términos de número de células, masa seca del inóculo o su volumen. Dicha información es importante para la cuantificación absoluta de microorganismos específicos. Los ácidos nucleicos en muestras ambientales se degradan fácilmente debido a la actividad de las nucleasas endógenas. Para los análisis de ARN, la actividad nucleasa debe inhibirse congelando la muestra inmediatamente usando nitrógeno líquido y luego almacenarla a  $-80^{\circ}\text{C}$ , mientras que para el ADN las muestras pueden almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-80^{\circ}\text{C}$  (Schnürer, 2016).

El proceso de extracción de ADN se compone de lisis celular, eliminación de contaminación, extracción con solventes, precipitación y purificación (Miller et al., 1999). Se han publicado algunos protocolos para la extracción de ADN o ARN de varias muestras ambientales (Griffiths et al., 2000). Los métodos de extracción deben optimizarse de acuerdo con el tipo de muestras. Para irrumpir eficazmente la pared de células que son difíciles de romper, como las metanogénicas y las bacterias Grampositivas, el método que se puede usar es el de extracciones de fenol y cloroformo con bajo pH y tampón con citrato (Libonati y Sorrentino, 2001). Adicionalmente, deben eliminarse los materiales que interfieren con la extracción de ácido nucleico o la manipulación al final de la prueba.

La aplicación de diferentes técnicas para el análisis del genoma depende de la capacidad de extraer ADN. La concentración y la pureza de una muestra de ADN pueden determinarse por espectrofotometría en función de la capacidad de absorbancia obtenida a una longitud de onda de 260 nm, mientras que la relación de absorbancia a 260/280 se utiliza para evaluar la pureza de las muestras. La relación 260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1,8 -2,0. Una relación de menos de 1,8 indicará la presencia de contaminantes en la muestra.

En general, el ADN se considera puro cuando la relación 260/230 es de alrededor de 1,5-2,2. Sin embargo, esta relación es mucho más variable que la relación A260/280 dependiendo de factores como la concentración de ADN o la composición del tampón de resuspensión de muestra. Una absorbancia de 1 a 260 nm corresponde a una concentración de 50 mg/mL de ADN. Para evitar interferencias, se deben usar Rnasa y DNasa, si es necesario, para eliminar el ARN y el ADN, respectivamente, aunque se debe considerar la degradación parcial de los ácidos nucleicos debido a las impurezas de la ARNasa y la ADNasa. La cantidad de ácido nucleico, según expresado por las proporciones A260/A280 se mide espectrofotométricamente usando un espectrofotómetro convencional de UV-visible o con un Nanodrop.

### **2.2.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Con la intención de tener una herramienta estandarizada para la identificación de los organismos existentes en los diversos ambientes se ha propuesto el código de barras del ADN, que proyectaba su utilidad en estudios de sistemática, ecología y biología evolutiva (Herber et al., 2003). Estos autores pretendieron generar un método rápido, confiable y reproducible, basado en la amplificación de una región estandarizada del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), y la región propuesta fue un fragmento de 600 pares de bases del ADN mitocondrial, que codifica la subunidad I del citocromo *c* oxidasa (COI). El uso de la región COI fue excelente herramienta para la clasificación taxonómica de muchos animales, incluso para distinguir entre especies; sin embargo, su utilidad para estudios taxonómicos y/o filogenéticos en plantas, hongos y microorganismos estuvo limitada y fue necesario buscar otras secuencias o genes candidatos que pudieran usarse como marcadores (Lebonah et al., 2014).

En general, para que sea considerada como un marcador molecular para estudios de código de barra y/o en cualquier estudio taxonómico o de evolución, una región de ADN deberá cumplir con las siguientes características:

- a. Contener una variabilidad y una divergencia genética significativa a nivel de especie.
- b. Poseer sitios conservados adyacentes, que permitan el diseño de iniciadores universales, para su amplificación por PCR.
- c. Tener una longitud adecuada que permita la extracción y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa (Kress y Erickson, 2012).

Aunque se sugirieron varias regiones o genes, el ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr 16S), originalmente propuesto por Pace et al, fue presentado como una buena opción para la clasificación de bacterias (Pace et al., 1986). La idea fue rápidamente adoptada por la comunidad científica y la secuencia del ARNr 16S se ha utilizado para conformar bases de datos especializadas. Lo anterior ha permitido que las secuencias del ARNr 16S sean utilizadas como una herramienta importante en la reconstrucción de relaciones filogenéticas.

Además, el uso de secuencias del ARNr 16S facilitó el establecimiento del proyecto árbol de la vida universal, el cual se ha constituido como una referencia de relación de procariotas fácilmente organizada en bases de datos dinámicas que compilan y curan los datos de todas las secuencias accesibles del gen ARNr 16S (Yarza et al. 2008, 2010). Pese a algunas controversias y dificultades técnicas, el ARNr 16S se sigue utilizando como un excelente marcador molecular y se han planteado nuevas estrategias de estudio, aprovechando las bondades de las nuevas técnicas genómicas (Savolainen et al. 2005, Tanabe y Toju 2013). Para la cuantificación de microorganismos y la aclaración de la expresión génica asociada con actividades específicas, la PCR cuantitativa (qPCR) es casi siempre la primera opción debido a su alta confiabilidad y amplios rangos dinámicos (Zhang y Fang 2006).

### **2.2.3 Características del ARNr 16S**

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S. Como cualquier secuencia nucleotídica de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega y adquiere una estructura secundaria que se caracteriza por tener segmentos de doble cadena que permiten la formación de asas y hélices (Rodicio y Mendoza 2004). Esta molécula ha sido reconocida como un poderoso marcador universal debido a que se encuentra en todos los organismos conocidos. Su estructura parece mantenerse por largos periodos de tiempo y, como su función no ha cambiado, los cambios en la secuencia probablemente son aleatorios.

En su contraparte eucariota, el ARNr 18S, las mutaciones son adquiridas lentamente, y es posible obtener información acerca de todos los organismos en una escala evolutiva. Sin embargo, los ARNr poseen suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos, y es posible diferenciar especies, cepas o variedades. Además, el tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas, y la conservación de su estructura secundaria favorece el alineamiento preciso durante la comparación de secuencias (Rodicio y Mendoza 2004).

El ARNr 16S contiene nueve regiones (V1-V9) menos conservadas o hipervariables (Baker *et al.* 2003), que son las que aportan la mayor información útil para estudios de filogenética y taxonomía. Las regiones conservadas son de gran ayuda para diseñar iniciadores universales que permitan la amplificación de las diversas regiones hipervariables de la gran mayoría de los ARNr 16S de los microorganismos presentes en una comunidad. Según el análisis del ARNr 16S, toda la vida celular se divide en tres dominios, es decir, Archaea, Bacteria y Eukarya (Woese *et al.* 1990).

Aunque las propiedades filogenéticas del ARNr 16S y la gran cantidad de secuencias disponibles ofrecen una ventaja considerable, las técnicas moleculares basadas en el gen ARNr 16S todavía tienen algunas desventajas. Por ejemplo, la heterogeneidad de ARNr 16S entre copias múltiples en una especie (Klappenbach *et al.* 2001) dificulta el análisis de patrones y puede confundir la interpretación de la abundancia relativa microbiana obtenida de las bibliotecas de clones o secuencias de las bandas DGGE cortadas.

Además, la secuencia de ARNr 16S puede carecer de resolución a nivel de especie para algunos grupos microbianos. Otra limitación del uso de ARNr 16S para la cuantificación de microbios es que hay poca información disponible sobre el número de copias de ARNr en genomas microbianos. Ueno y Tatara, investigaron la comunidad microbiana en la producción de metano termofílico a partir de ácidos orgánicos en un reactor de lecho empacado utilizando un análisis de clones de ADNr 16S que mostró que las poblaciones microbianas cambiaron con el tiempo de retención hidráulica (Ueno y Tatara, 2008).

#### **2.2.4 Características de la Metil-coenzima reductasa (mcrA)**

El gen *mcrA* codifica la subunidad  $\alpha$  de Metil enzima M reductasa, la enzima que cataliza el paso final en la metanogénesis (Ferry, 1999), este gen es exclusivo de los metanógenos. Dada esta exclusividad, es posible detectar la presencia y abundancia de arqueas metanogénicas en muestras ambientales (Gagnon et al., 2011).

La secuencia de la enzima Metil coenzima M reductasa es otro marcador genético que ha sido empleado para establecer relaciones filogenéticas en arque metanogénicas (Luton et al., 2002). Esta enzima está compuesta por dos subunidades alfa (*mcrA*), dos beta (*mcrB*), y dos gama (*mcrG*). Las subunidades son filogenéticamente conservadas (Hallam et al., 2003). El gen *mcrA* ha sido utilizado como marcador genético alternativo, mostrando relaciones filogenéticas similares como aquellas encontradas por el ARNr 16S (Luton et al., 2002).

Las comunidades con funciones específicas también se han estudiado apuntando a diferentes genes funcionales, como Metil coenzima A (*mcrA*), una enzima clave para la metanogénesis (Dziewit et al., 2015).

#### **2.2.5 Características de la fosfosulfato reductasa (aprA)**

El *aprA* es un gen marcador funcional útil utilizado para detectar el ciclo microbiano de azufre es el gen de la subunidad alfa reductasa (*aprA*) de adenosina-5'-fosfosulfato (APS), que codifica una enzima clave para la reducción disimiladora de sulfato y la oxidación de azufre (Meyer et al., 2007).

Un enfoque molecular alternativo para superar estos problemas es el uso de genes funcionales. Un gen marcador funcional candidato es el *aprA* que codifica la subunidad alfa reductasa adenosina-5'-fosfosulfato (APS). La reductasa de APS que consta de dos subunidades (*AprB* y *AprA*) convierte APS en sulfito y monofosfato de adenosina (AMP) en el proceso de reducción de sulfato disimilatorio, y también se postula para operar en la dirección inversa en el proceso de oxidación de azufre disimilatorio (B. Meyer, J Kuever, 2007). El gen *aprA* se empleó originalmente para evaluar la diversidad de los procariontes sulfato reductores (M.W. Friedrich, 2002).

## **2.3 Nuevas tecnologías moleculares**

En los últimos años la tecnología en el ámbito molecular ha avanzado a pasos gigantes, y ahora podemos obtener más información metabólica, por ejemplo, teniendo como punto de partida la PCR. Se han inventado técnicas novedosas que permiten observar las especies de microorganismos y su actividad por medio de microscopios de última tecnología y electroforesis. A continuación, exponemos algunas de estas tecnologías que serán cada día más comunes en el campo de la digestión anaerobia.

### **2.3.1 Huella digital molecular de microbiomas**

En la era de la técnica de biología molecular, las huellas digitales de microbiomas también se usan con frecuencia para evaluar y comparar diferentes microbiomas, incluidos los microbiomas productores de biogás. Los que se han utilizado incluyen polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (T-RFLP), polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP), electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) y análisis de espaciador intergénico ribosómico automatizado (ARISA) (Jun Wey et al., 2020). Todos estos métodos de huellas dactilares de microbioma implican la amplificación por PCR de una región hipervariable del gen ARNr 16S utilizando cebadores universales o específicos de taxones y la separación, detección y cuantificación de individuos.

Las principales limitaciones de SSCP, T-RFLP, ARISA y DGGE incluyen baja resolución y la incapacidad de identificar de manera confiable los microorganismos representados por los picos de banda o cromatograma, porque es difícil obtener información de secuencia de los fragmentos del gen ARNr 16S. Para identificar supuestamente las bandas en geles SSCP o DGGE, un conjunto de amplicones de especies conocidas puede servir como referencias, pero dicha identificación no es confiable (Zhang, 2010).

### **2.3.2 Hibridación fluorescente in situ (FISH)**

FISH es una técnica de visualización basada en el examen microscópico de una especie o grupo de bacterias o arqueas después de teñir sus células con sondas oligonucleotídicas fluorogénicas específicas que unen las moléculas de ARN dentro de sus células. Las sondas FISH son secuencias cortas de ADN monocatenario (aproximadamente 16-20 nucleótidos) marcadas con uno o dos colorantes fluorescentes. La sonda hibrida específicamente in situ con ARNr 16S, 23S ARNr o ARNm dentro de las células microbianas de acuerdo con la combinación complementaria de ADN-ARN (Zhang, 2010).

Para visualizar las diferentes células en el lodo anaeróbico, la FISH es el método básico y se puede mejorar para generar muchas variantes mediante la combinación con otras técnicas, incluyendo CLSM (microscopía de escaneo láser cofocal) FISH (Zhang et al. 2005), MAR-FISH (microautoradiografía-FISH) (Lee et al. 1999), CARD-FISH (deposición de reportero catalizado - FISH) (Pernthaler et al. 2002), etc. Aunque no se usa tan comúnmente como FISH, la PCR in situ también es una alternativa para visualizar células (Hodson et al. 1995).

### **2.3.3 Micromatrices (Microarrays)**

Las Micromatrices son una herramienta poderosa y de alto rendimiento que permite la detección y cuantificación de miles de genes o transcripciones de ARN simultáneamente. La innovación central de la técnica de microarrays es la capacidad de unir sondas de oligonucleótidos en una matriz sólida para crear una matriz densamente empaquetada. Las Micromatrices de ADN ofrecen la posibilidad de determinar la aparición de una serie completa de microorganismos en un microbioma, incluyendo eso en biorreactores. Se han desarrollado varios tipos de micromatrices para el análisis de microbiomas en diferentes entornos. Las matrices filogenéticas tienen sondas específicas para los genes de ARNr 16S o 18S u otros genes funcionales conservados y se utilizan para examinar la abundancia relativa de especies y la composición de los microbiomas (Zhang, 2010).

### **2.3.4 Sondeo de isótopos estables (SIP)**

El acoplamiento de técnicas de biología molecular con sondeo de isótopos estables (SIP) de biomarcadores ha proporcionado un enfoque *in vitro* independiente del cultivo para vincular la identidad de los microorganismos con sus funciones en los microbiomas. En SIP, un sustrato marcado con un isótopo pesado, como <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N o <sup>18</sup>O, se agrega a los cultivos *in vitro* de interés que se incuban (Zhang, 2010). Los genomas (ADN), los transcriptomas (ARN) y los proteomas (proteínas) de microorganismos en crecimiento activo que pueden utilizar el sustrato están marcados con el isótopo. En combinación con otras técnicas, como el sondeo de isótopos estables (SIP) (Hori et al. 2007), la selectividad y la eficacia de los métodos de caracterización anteriores podrían mejorarse aún más.

La hibridación (Raskin et al. 1995), el método de la ARNasa H (Ueno et al. 2004), etc., también son útiles para cuantificar microorganismos. Para lograr un vínculo directo de la función del metabolismo y la clasificación filogenética, la tecnología de isótopos es esencial mediante el uso de isótopos radioactivos (Lee et al. 1999) o isótopos estables e (Hori et al. 2007).

### **2.3.5 Las tecnologías ómicas y el microbioma.**

El rápido avance y la mejora de las tecnologías ómicas, especialmente en la última década, han brindado oportunidades sin precedentes para caracterizar la abundancia relativa, composición, expresión génica y metabolismo de varios microbiomas, incluidos los de los biorreactores AD, de manera integral. Estas tecnologías ómicas incluyen metataxonomía, metagenómica, metatranscriptomía, metaproteómica y metametabolómica. La metataxonomía puede ayudar a identificar las bacterias, arqueas, hongos y protozoos al secuenciar una biblioteca de amplicones de un gen marcador (principalmente un gen marcador). Por lo tanto, es una herramienta poderosa para examinar exhaustivamente la diversidad, composición y estructura de los microbiomas productores de biogás (Zhang, 2010). La metagenómica, o metagenómica de escopeta, puede revelar potencialmente todos los genes presentes en un microbioma mediante la secuenciación del ADN extraído de una muestra de microbioma.

La Metatranscriptomía analiza el ARN (ARN total o ARNm) transcrito en un microbioma y, por lo tanto, proporciona una instantánea de la expresión del gen en el momento del muestreo. Todas estas tres tecnologías ómicas basadas en secuenciación están potenciadas por las tecnologías NGS, que incluyen 454 pirosecuenciación (ya no se usa), secuenciación



Ilumina y secuenciación Ion Torrent, todas las cuales permiten una secuenciación de alto rendimiento de manera rentable (Zhang, 2010).

Las tecnologías ómicas han reemplazado la mayoría de las técnicas de biología molecular en estudios sobre microbiomas productores de biogás. Sin embargo, las micromatrices de alta densidad, qPCR, incluida la PCR digital de gotas, y SIP pueden ser muy útiles porque pueden complementar las tecnologías ómicas cuantificando con precisión los taxones o gremios de microorganismos importantes para ciertos aspectos de la producción de biogás, como la tasa y la estabilidad del proceso, o desenterrando el metabolismo de sustratos o intermedios importantes durante la digestión anaerobia. El uso de las huellas digitales de microbiomas también ha permitido evaluar y examinar rápidamente la dinámica y las respuestas de los taxones individuales a las condiciones cambiantes, incluidos el inicio, la velocidad de carga, el cambio de materia prima y la temperatura y pH de operación (Zhang, 2010).

Aunque tales correlaciones no pueden identificar directamente los impulsores o las barreras de la digestión anaerobia, pueden fomentar investigaciones futuras hacia el monitoreo y control racional del sistema. De hecho, varios estudios encontraron respuestas distintas de ciertas bacterias y metanógenos a la acumulación de amoníaco (Peng et al., 2018), temperatura de operación (Kim et al., 2017) y pH (Zhang et al., 2019b). Algunos de los grupos de microorganismos sensibles pueden servir como indicadores durante el monitoreo del proceso de digestión anaerobia (Sun et al., 2019), mientras que otros pueden usarse en bioaugmentación para ayudar a restaurar el proceso normal y ayudar con un manejo efectivo de disfunción de los biorreactores de AD (Onwosi et al., 2019).

Las investigaciones futuras sobre microbiomas productores de biogás ayudarán aún más a mejorar la eficiencia y la estabilidad de la digestión anaerobia. Dicha investigación se beneficiará enormemente de la mejora continua de las tecnologías ómicas, particularmente la metaproteómica y la metametabolómica. Además, se necesitan métodos y análisis estandarizados para producir datos que se puedan comparar en el desarrollo y la mejora de los modelos de digestión anaeróbica.

## **2.4 Biocontrol**

Con las herramientas antes expuestas, podemos realizar un seguimiento de los inóculos y con ello estar preparados para cualquier anomalía que disminuya la producción de biogás. En las grandes plantas de biogás la maximización del rendimiento energético en relación con los costos de tratamiento es una prioridad. (Angelikadi et al., 2005). Sin embargo, este paso está lleno de retos, ya que las soluciones biológicas han sido relegadas por las soluciones químicas y mecánicas que en muchas ocasiones no son efectivas. La aplicación de bioindicadores logrará una respuesta más temprana a averías y optaremos por aplicar medidas Bio, ya que sabremos el orden o la especie de microorganismo que podremos alentar, o que tipo de compuesto está afectando las poblaciones microbianas y poder retirarlo de la alimentación. Así mismo, la utilización de estas nuevas tecnologías nos dará una visión más amplia de lo que ocurre en un inóculo y con esto optimizar el proceso del biogás. A continuación, se detallan algunas medidas que se pueden adoptar en caso de fallos de reactores, así como biosoluciones.

### **2.4.1 Incremento de la retención de biomasa**

Realizando este incremento, se mejora la eficiencia del proceso y su estabilidad y es la llave de los sistemas de alta carga (Bjorsson, 2000). Un medio denso de microorganismos es esencial para una transferencia eficiente de hidrógeno entre especies, un proceso que juega un papel clave en la metanogénesis (Stams et al., 2005). Por ejemplo, en los sistemas CSTR, el método tradicional para la retención de biomasa es tener una unidad de sedimentación de lodo y recircular la biomasa de regreso al reactor. Otros métodos incluyen aumentar el tiempo de retención hidráulica o mejorar el patrón de mezcla, por ejemplo, apagando el agitador media hora antes y después de la adición del sustrato para aumentar la retención de biomasa debido a una mayor sedimentación (Hansen et al., 1999b).

### **2.4.2 Mejorar la configuración y operación del reactor**

El aumento de la temperatura puede permitir una mejora significativa en la producción de biogás. Para sustratos degradados lentamente, la aplicación de sistemas de dos fases donde el paso de acidogénesis termofílica con tiempo de retención hidráulico corto es seguido por el paso de metanogénesis mesofílica con tiempo de retención hidráulico prolongado, puede aumentar la producción de biogás debido a la mejora de la hidrólisis y también a la reducción de patógenos (Huyard y col.2000). También se ha demostrado que la configuración de dos fases de termofílica extrema (68 °C) seguida de termofílica (55 °C) mejora la producción de biogás en comparación con una sola unidad termofílica para la digestión del estiércol de ganado (Nielsen et al., 2004).

El aumento de la carga en el reactor también aumenta las actividades microbianas según la cinética de Monod. Esto se demostró utilizando un modelo de computadora que mostró que el aumento de la concentración de sustrato resulta en una mejora en la tasa de producción de biogás. Además, en la operación de biogás a gran escala con almacenamiento de efluentes, el rendimiento extra de biogás también se puede recuperar del almacenamiento de efluentes y al aumentar la temperatura del almacenamiento a 55 °C, se puede recuperar biogás extra en más del 10%.

### **2.4.3 Pretratamiento del sustrato**

Otra forma de aumentar la producción de biogás es aumentar la biodegradabilidad mediante pretratamiento del sustrato, tales como lodos domésticos, desechos sólidos y la mayoría de los productos agrícolas con alto contenido de celulosa y hemicelulosa (Ahring y Angelidaki, 2000). La disminución del tamaño de partícula del material de celulosa ayuda a aumentar la velocidad de hidrólisis y fermentación (Hu et al., 2005). Para los desechos orgánicos sólidos, el método común de pretratamiento es usar un reactor de hidrólisis para licuar el sustrato antes de alimentarlo al reactor metanogénico (Scherer et al., 2000; Pavan et al., 2000). También se ha informado el pretratamiento del estiércol por condición aeróbica termofílica (Pagilla et al., 2000).

La separación de la lignina y la celulosa de los desechos del estiércol también puede obtener un mayor rendimiento de biogás por volumen de entrada de alimentación (Møller et al., 2004), o el uso de la etapa acidogénica anaeróbica en el sistema de dos fases también puede aplicarse como una etapa de pretratamiento.

### **2.4.4 Eliminación del componente tóxico.**

En muchos casos donde los compuestos tóxicos están presentes en la alimentación, el proceso puede funcionar en un estado de equilibrio inhibido, lo que significa un funcionamiento estable, pero con bajo rendimiento de biogás. La producción de biogás se puede mejorar eliminando los compuestos tóxicos e inhibidores. Por ejemplo, el nivel de sulfato/ sulfuro se puede disminuir con cloruro férrico ( $\text{Fe}_2\text{Cl}_3$ ) o cloruro ferroso ( $\text{FeCl}$ ) para precipitar sulfato/ sulfuro en forma de sulfuro ferroso (Hansen et al., 1999b). Yamaguchi et al, informaron el uso de un dispositivo de separación de sulfuro incorporado a un reactor UASB para aliviar la inhibición de sulfuro en tratamiento de aguas residuales ricas en sulfato (Yamaguchi et al., 1990).

El nivel de amoníaco puede disminuirse mediante la eliminación de amoníaco libre (Siegrist et al., 2005). El efecto de la inhibición del amoníaco puede contrarrestarse disminuyendo el pH o mediante la codigestión con otros compuestos. Se informó que la adición de bentonita que contiene  $\text{Ca}_2+$  y  $\text{Na}+$ , o aceite unido a bentonita, ayuda a la estabilización del proceso con alta concentración de amoníaco (Angelidaki y Ahring, 1993). También se ha informado que la adsorción del compuesto LCFA en la bentonita o el carbón activado disminuye el problema de la inhibición de LCFA (Angelidaki et al., 1990). Además, Los antibióticos se pueden eliminar por floculación antes de ingresar a un reactor UASB (Deng et al., 1998).

La temperatura, junto con el sustrato, es el parámetro más determinante para la estabilidad y el rendimiento del proceso. Como se mencionó anteriormente, la temperatura impacta fuertemente en la estructura de la comunidad, pero también en la diversidad microbiana, las vías de degradación y la tasa de degradación (McGenity, 201) En general, la digestión anaeróbica a temperaturas termofílicas da mayores tasas de producción de metano y mayor rendimiento de metano, pero este no es siempre el caso (labatut et al., 2014). Además, la digestión termofílica da como resultado una reducción comparativamente mayor de los patógenos (Sahlstrom, 2003) y proporciona una viscosidad más baja, lo que resulta en un menor consumo de energía para la agitación (Bambrilla et al., 2013) Las desventajas con temperaturas más altas incluyen una menor diversidad microbiana, con el consiguiente riesgo de un proceso menos estable y una degradación menos eficiente de ciertos compuestos químicos, como los fenoles.

Experiencias en el funcionamiento a gran escala, muestra que las fluctuaciones de temperatura no deben exceder 2–3 °C para obtener mejores resultados y evitar la inestabilidad (Dros B, 2013).

#### **2.4.5 Cambios en la Alimentación**

Se ha demostrado que la alimentación repetida por pulsos con la adición de sustrato cada dos días, en comparación con la alimentación diaria, da como resultado una comunidad bacteriana que es más tolerante a la carga de choque orgánico y al alto amoníaco (De Vrieze et al., 2013). La alimentación dinámica también se ha sugerido últimamente como un enfoque para permitir el suministro de electricidad flexible a partir del biogás (Mauki et al., 2015). Un aumento en la tasa de carga orgánica generalmente resulta en una disminución en el tiempo de retención que, si es demasiado corto, podría causar el lavado de microorganismos y una degradación ineficiente.

Los sustratos ricos en azúcar y almidón generalmente se descomponen fácilmente y requieren tiempos de retención más cortos. Para la degradación de estos materiales, no es necesaria la hidrólisis y la degradación comienza directamente en la segunda etapa de degradación, la fermentación. Sin embargo, se requieren tiempos mucho más largos para la degradación microbiana de la materia vegetal rica en fibra y celulosa. Para tales materiales, a menudo es el paso de hidrólisis y no la metanogénesis lo que limita la velocidad de descomposición. Un signo típico de una tasa de carga orgánica demasiado baja es la acumulación de intermedios de degradación o un bajo grado de degradación.

La composición del gas es de gran interés para el monitoreo, ya que un cambio en la composición del gas, es decir, el aumento de los niveles de dióxido de carbono, puede ser un signo de inestabilidad del proceso. Sin embargo, si el material de entrada varía con el tiempo, un cambio en la composición del gas también puede reflejar el carácter del sustrato. Para detectar una desviación de la variación "normal", es importante tener en cuenta la composición del gas y el contenido de dióxido de carbono durante un período más largo y buscar tendencias de aumento / disminución.

#### **2.4.6 Bioaumentación**

Recientemente, se han realizado diferentes intentos para mejorar el proceso de biogás mediante la adición directa de microorganismos o enzimas, algunos con resultados exitosos (Romero et al., 2016). La bioaumentación se ha realizado principalmente para mejorar el paso hidrolítico del proceso de biogás y mejorar la degradación de la lignocelulosa. Por ejemplo, recientemente se demostró que la adición de la bacteria que degrada la celulosa *Clostridium cellulolyticum* aumenta la eficiencia de degradación de la paja de trigo (Peng X et al., 2014).

La bioaumentación con el objetivo de mejorar la hidrólisis también demostró ser exitosa utilizando un hongo anaeróbico, *Piromyces rhizinflata*, en un proceso de dos etapas para la producción de biohidrógeno y biogás utilizando ensilaje de maíz y con la bacteria fermentativa *Acetobacteroides hydrogenigenes* para la producción de metano a partir de paja de maíz (Zhang J et al., 2015).

Además, se demostró que la adición de un consorcio compuesto por 16 cepas aisladas de bacterias que degradan la celulosa mejora el rendimiento de metano del ensilaje de maíz con hasta un 38% (Poszytek et al., 2016) También se han realizado intentos para mejorar la estabilidad y la eficiencia de la producción de metano a niveles altos de amoníaco y aquí se propuso la adición de un cultivo metanogénico puro (*Methanoculleus bourgensis*, cepa MS2T) para mejorar con éxito el rendimiento de metano en un digestor de régimen continuo estresado con amoníaco (Fotidis, 2014). También se obtuvo un rendimiento de metano mejorado después de la adición del acetógeno productor de hidrógeno *Enterobacter cloacae* (Acs N et al., 2015) y se obtuvo una degradación lipídica mejorada con la bacteria lipolítica *Clostridium lundense* (Cirne et al., 2006).

La mayoría de los estudios que utilizan la adición directa de enzimas al proceso de biogás han mostrado resultados negativos. Sin embargo, se demostró que la adición de proteasas aumenta el rendimiento de metano en las pruebas por lotes con ensilaje de maíz, estiércol de pollo y estiércol de vaca, pero no se observó ningún efecto durante las operaciones semicontinuas (Hanrekih et al., 2013). La aplicación de una mezcla enzimática disponible en el mercado, preparada por fermentación fúngica, dio como resultado un mayor rendimiento de producción de biogás (10–15%) y un mayor contenido de metano del biogás (5–10%) en un proceso semicontinuo utilizando ensilado de grano y maíz. ensilaje como sustrato (Quiñones et al., 2011).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. Materiales y Métodos

En este capítulo se realiza una explicación detallada del material empleado para llevar a cabo los ensayos experimentales, incluyendo una descripción tanto de los diferentes equipos y reactores utilizados, como del procedimiento seguido en los análisis de laboratorio.

A continuación, se detallan los materiales utilizados en todas las etapas de la investigación

#### 3.1 Inóculos Anaerobios

A lo largo de la investigación se utilizaron varios inóculos anaerobios para la aplicación y evaluación de los bioindicadores estudiados en esta investigación, a continuación, se detalla cada uno de ellos.

##### 3.1.1 Inóculo Anaerobio Etapa 1

Para esta etapa de la investigación, se utilizó un inóculo en digestión de un digestor de la EDAR Copero para todas las pruebas, ya que en esta prueba lo que se quería era afinar el método de las actividades específicas.

##### 3.1.2 Inóculo Anaerobios Etapa 2

Los Inóculo de las pruebas A y B fueron obtenidos del reactor Macondo III alimentado de fango mixto (FM), el cual es la mezcla de fangos procedente del tratamiento primario y secundario de la EDAR Copero. En la segunda prueba se utilizó el mismo inóculo utilizado en la primera prueba, pero con tratamiento de decantación. Para las demás pruebas, se tomaron las muestras del reactor FM, el cual es alimentado con fango mixto también, pero con codigestión. En la prueba C se ha analizado la codigestión de lixiviado, procedente de una estación de transferencia de residuos sólidos urbanos como se parecía en la tabla 3.

Para la prueba D, se ha analizado la codigestión de detergente y aceite de motor. Finalmente, para la prueba E, se analizó la codigestión de materia seca y fango deshidratado en un momento en que el reactor no estaba operando de forma óptima. El ensayo de la AME también puede usarse para evaluar el rendimiento del lodo en presencia de compuestos inhibidores (McHugh et al., 2004). El inóculo del último ensayo se deshidrató con materia seca y agua industrial. El pH era muy ácido y la producción de biogás era casi nula, síntomas típicos de un digestor en inhibición, el cual puede ser optimizado mediante el seguimiento de bioindicadores.

Prueba	Inóculo	Alimentación	Pretratamiento
A	Macondo III	Fango Mixto	
B	Macondo III	Fango Mixto	Decantación
C	FM	Lixiviado	
D	FM	Detergente + aceite de motor	
E	FM	Fango deshidratado + materia seca	Dilución

**Tabla 3.** Características de los inóculos utilizados en la etapa 2.



### 3.1.3 Inóculos Anaerobios Etapa 3

Los Inóculos utilizados en esta etapa fueron tomados de un reactor anaerobio de mezcla completa llamado reactor de digestión anaerobia (AD), de un Inóculo de un reactor metanogénico (RM), estos dos en rango termófilo y el tercero fue tomado del reactor FM el cual opera en régimen mesófilo 35°C. Ninguno de estos Inóculos tenía algún pretratamiento, pero el reactor AD se alimentaba con codigestión como se observa en la siguiente tabla.

Inóculo	Alimentación	Rango térmico
RM	Efluente reactor hidrolítico	Termófilo
AD	Residuos de matadero esterilizados + agua residual de matadero	Termófilo
FM	Fango Mixto	Mesófilo

**Tabla 4.** Características de los Inóculos utilizados en la etapa 3.

### 3.2 Reactores anaerobios

Se utilizaron varios reactores anaerobios de donde se extrajo el inóculo para su análisis por medio de los bioindicadores, a continuación, se describe cada uno de ellos.

#### 3.2.1 Reactor Macondo III- Mezcla completa

Es un reactor anaerobio de mezcla completa de 6 litros que operaba en régimen mesófilo (37°C), con un inóculo procedente de un digestor anaerobio de la planta COPER y como alimentación fango mixto de la misma EDAR. Como se aprecia en la siguiente figura, el reactor tiene su cabeza en vidrio, una bomba de recirculación, dos bombas peristálticas una para el efluente y otra para el afluente. En la cabeza del reactor se ubica la entrada de alimentación, la recirculación y la salida de biogás. El biogás se medía mediante un medidor magnético el cual daba el volumen en litros. La alimentación se mezclaba con un agitador magnético diez minutos antes de cada alimentación.



**Figura 7.** Reactor Macondo III

A continuación, se expone los datos operacionales y la caracterización de la alimentación del reactor.

Parámetros operacionales					Alimentación				
Prueba	TR días	Carga (g/L*d)	Biogás (L/día)	DQO d %	Fango mixto				
					DQO (g/L)	SV (g/L)	ST (g/L)	AGV/ALC	pH
A-B	24	1,17	2,8	51,3	17	12,1	21,5	0,45	8,7

**Tabla 5.** Parámetros de operación y de alimentación Reactor Macondo III

### 3.2.2 Reactor FM – Mezcla completa

Es un reactor anaerobio de mezcla completa alimentado con fango mixto, el cual trabajaba en régimen mesófilo (37°C) y en el cual se experimentan varios tipos de codigestión en el laboratorio TAR. Consta de una bomba de recirculación y dos bombas peristálticas una para la entrada de la alimentación y otra para el efluente, como se aprecia en la figura 8.



**Figura 8.** Reactor 7 litros

Generalmente en este digestor se probaba diferentes combinaciones de sustratos. Para esta investigación trabajamos con la codigestión de fango mixto y otros residuos de diferentes sectores agroindustriales. A continuación, en la tabla 6, se muestra los datos de operación del reactor en la codigestión y la caracterización de las alimentaciones para este reactor.

Parámetros operacionales					Alimentación				
Prueba	TR días	Carga (g/L*d)	Biogás (L/día)	DQO d %	DQO (g/L)	SV d* (g/L)	ST (g/L)	AGV/ALC	pH
C	18,8	1,27	0,29	58,3	23,9	17,2	25	0,29	5,95
D	24	1,41	0,47	18,9	33,9	32,1	41,4	0,47	8,4
E	21,5	1,82	0,66	53,2	47,5	2,9	35,9	0,4	6,1
FM	21	1,75	2,2	56	36,7	23,1	33,5	0,29	8

**Tabla 6.** Parámetros de operación y de alimentación reactor 7 litros. \*d: degradado

### 3.2.3 Reactor Metanogénico (RM) y reactor AD –Mezcla completa

El reactor metanogénico (RM) era un reactor anaerobio especializado en la fase metanogénica de la digestión anaerobia con el cual se quería investigar la capacidad de respuesta a sobre cargas y su evolución en estas contingencias. Constaba de un cuerpo en cristal con una cabeza metálica hermética. Un agitador mecánico mezclaba el sustrato y el inóculo y una bomba peristáltica realizaba la alimentación. La alimentación del reactor RM era el efluente de un reactor que trabajaba en fase hidrolítica.



**Figura 9.** Reactor RM y reactor AD de izquierda a derecha

El reactor AD era un reactor con todas las fases de la digestión anaerobia el cual era utilizado para realizar ensayos de codigestión. Ambos reactores trabajaban en rango termófilo y el inóculo de ambos provenía de la depuradora la Llagosta. La alimentación el reactor AD era residuos esterilizados y agua residual de matadero. Para la extracción del efluente se utilizaba un balón aforado el cual se llenaba del efluente por el impulso de nitrógeno gaseoso. La medición de biogás se realizaba en cromatógrafo de gases, tomando la muestra en la cabeza del digestor.

A continuación, se puede apreciar los parámetros operacionales y la caracterización de cada uno de los dos reactores.

Reactor	Parámetros operacionales				Alimentación			
	TR días	Carga g/L*d	Biogás (L/día)	DQO d (g/L)	DQO (g/L)	SVd* (g/L)	AGV mg/L	pH
<b>RM</b>	24	2,1	2,5	60	34,6	13,3	41893	8,1
<b>AD</b>	24	1,8	2,3	40	18,7	4,6	1289	7,7

**Tabla 7.** Parámetros de operación y de alimentación reactor RM y AD. \*d: degradado

### **3.2.4 Planta piloto en EDAR Tablada de 1 m<sup>3</sup>**





Es una planta piloto de la depuradora Tablada, EMASESA en Sevilla, consta de un tanque de alimentación que tiene forma cilíndrica y de un agitador para mantener homogéneos los sustratos. El digester de 1 m<sup>3</sup> de volumen útil fue alimentado mediante una bomba Mono, tipo CGG de 1". La temperatura de funcionamiento fue de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , mesofílica y se mantuvo en el digester durante el periodo de ensayo utilizando un elemento calefactor (Camisa de calentamiento de 500 mm de ancho con aislamiento de lana de roca de 50 mm de espesor y chapa de recubrimiento soldada y pulida). El biogás producido se mide con un contador de membrana Elster, modelo BK G4. Volumen cíclico de 1,2 litros o 2,0 litros, Rango 0,04-6 m<sup>3</sup>/h. En la figura siguiente se puede ver la planta piloto.



**Figura10.** Planta Piloto

### 3.2.5 Equipos laboratorio TAR

A continuación, se detallan equipos de laboratorio utilizados en el laboratorio TAR para esta investigación




Equipo	Imagen	Uso
<b>Centrífuga</b>		<p>Esta centrífuga fue utilizada para realizar la extracción de ADN.</p>
<b>Medidor presión</b>		<p>Con este equipo se realizaba la verificación de presión en mbar en los viales de las actividades específicas.</p>
<b>Viales de vidrio</b>		<p>Estos viales de 250 mL cada uno tenían un tapón de caucho y tapa plástica, fueron los que se utilizaron para realizar las actividades específicas.</p>
<b>Shaker</b>		<p>Este agitador mecánico fue utilizado en la primera etapa experimental de las actividades específicas para agitar los viales, los cuales se agitaban a 100 rpm y se calentaban a 37°C.</p>




**Tabla 8.** Equipos utilizados en el laboratorio TAR



### 3.2.6 Equipos laboratorio Microbiología IRTA

A continuación, se detallan equipos de laboratorio utilizados en el laboratorio del IRTA para esta investigación

Equipo	Imagen	Uso
Vortex		<p>Este equipo fue utilizado para la agitación de los ependorf utilizados en la extracción de ADN</p>
Mastercycler gradient		<p>Este equipo fue usado para la transformación del ADN en ADNc</p>
NanoDrop 1000		<p>Este equipo fue utilizado para cuantificar el ADN de las muestras de los inóculos estudiados.</p>

Equipo	Imagen	Uso
qPCR		<p>Este equipo del laboratorio de biología molecular fue utilizado para la generación de copias genéticas y para la lectura del ARN.</p>
Kit micro		<p>Kit para realizar extracciones de ADN y ARN</p>
Viales de 100 mL		<p>Viales de 100 mL utilizados en la tercera parte de la investigación en el laboratorio del IRTA</p>

**Tabla 9.** Equipos utilizados en el laboratorio del IRTA

### **3.3 Métodos Físicoquímicos de análisis Laboratorio TAR**

Para realizar las analíticas de los ensayos realizados, se utilizaron los siguientes métodos en el laboratorio TAR.

#### **3.3.1 Determinación del pH (APHA, 4500-H+,2015)**

El pH óptimo se encuentra en torno a la neutralidad, entre 6,5 y 8. La alcalinidad debe ser suficiente para mantener la regulación del pH. El potencial redox: debe ser lo suficientemente bajo para poder asegurar el desarrollo de poblaciones metanogénicas estrictas. Para ello es necesario que el medio de digestión no tenga oxidantes, como el oxígeno (libre de aire), nitratos o sulfatos.

Los ácidos grasos volátiles y el acetato tienden a disminuir el pH del sustrato. Si las bacterias metanogénicas no alcanzan a convertir rápidamente los AGV a medida que lo producen las bacterias acetogénicas, estos se acumulan y disminuyen el pH en el digestor. Sin embargo, el equilibrio CO<sub>2</sub>-bicarbonato opone resistencia al cambio de pH.

La determinación electrométrica del pH se basa en la medida de la actividad de los iones de H<sup>+</sup> por mediciones potenciométricas utilizando, un electrodo indicador de vidrio, otro de referencia y tampones de pH 4 y 7. La fuerza electromotriz (fem) producida en el sistema de electrodo de vidrio, varía linealmente con el pH y esta relación se describe comparando la fem medida con el pH de diferentes tampones. El pH de la muestra se determina por extrapolación.

La temperatura afecta a la medida del pH de dos formas, efectos mecánicos producidos por cambios en las propiedades de los electrodos y efectos químicos causados por cambio de equilibrio. De esta forma, es conveniente proceder a la medida del pH de la muestra siempre a la temperatura ambiente. Un pH elevado indica una baja concentración de iones H<sup>+</sup>, y por tanto un medio alcalino. Por el contrario, un pH bajo indica la acidificación del medio. Dado que los principales microorganismos involucrados en este proceso trabajan de forma óptima en un rango de pH de 7-8, éste debe mantenerse cercano a la neutralidad.



### 3.3.2 Determinación de los Ácidos Grasos Volátiles (AGV) (APHA, 1992)

La concentración de AGV es uno de los parámetros más importantes en el control del proceso de digestión anaerobia. Es comúnmente aceptado que la acumulación de ácidos grasos volátiles es el resultado del desequilibrio en condiciones de digestión.

1. Para realizar el análisis más rápidamente se debe aprovechar el proceso anterior donde se calculaba la alcalinidad. Una vez terminado el análisis se recoge el erlenmeyer y, se pone a calentar en la placa calefactora. Cuando llegue al punto de ebullición y comience a hervir, se debe dejar durante tres minutos de reloj y, una vez pasados se retira el erlenmeyer de la placa y se deja enfriar a temperatura ambiente.

Una vez frío se realiza una valoración de la misma forma que en el análisis de alcalinidad, empleando esta vez una base fuerte, como es el hidróxido sódico (NaOH). Se mide el pH, bajo en sus inicios debido al ácido clorhídrico añadido en el proceso anterior, hasta llevarlo a pH 7 con la adición de la base fuerte. Tal y como se realiza en el análisis de alcalinidad, se anota el dato de volumen de base gastado en el proceso (Benito, 2016).

Los AGV se calculan con la siguiente fórmula:

$$AGV (mg CaCO_3 L) = Vt * N * 50000 ml \text{ de muestra}$$

Donde,

**Vt:** Volumen de disolución de NaOH gastado en la valoración (mL)

**N:** Normalidad de la base estándar utilizada, ml de muestra: Volumen de muestra utilizado (mL) 50.000: Es una constante de equivalencia.

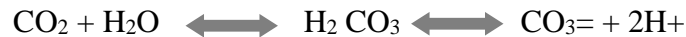
2. También se utilizó el procedimiento APHA, WPCF and AWWA, 2005. Estándar Methods for the Examination of wáter and wastewater para Hallar los AGV en el laboratorio del IRTA.

Se toma 1.5 mL de la muestra en un ependorf, luego se centrifuga a 13 mil rpm por 10 minutos. Se añade en otro ependorf 300 µL del sobrenadante, 600 µL de agua y 100 µL de ácido fórmico (esto es según la dilución que depende de la carga orgánica de la muestra). Luego se centrifuga a 13 mil rpm por 5 minutos. Finalmente, se toman 1 mL de la última centrifuga y se encapsula en los viales de cristal para luego llevarlo al cromatógrafo de gases, donde se observan en el software el resultado.

### 3.3.3 Determinación de la Alcalinidad Total (APHA, 1992)

La alcalinidad es uno de los parámetros de control de los procesos anaerobios, ya que el sistema  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$  es el mejor tampón para el rango de operación de los digestores, se considera como suficiente para funcionar como tampón una cantidad de alcalinidad mayor de 1000 mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , aunque para más seguridad se trabaja con valores de 2000-5000 mg/L.

Variaciones en la alcalinidad se visualizan en el biogás, ya que si el ion bicarbonato reacciona con los cationes  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , la concentración de  $\text{CO}_2$  disminuirá, debido a que la reacción siguiente se desplazará hacia la derecha:



Un descenso en la alcalinidad puede ser reflejo de un aumento en los ácidos grasos volátiles, producto del metabolismo de las bacterias hidrolíticas que son las primeras en actuar en el proceso degradativo anaerobio.

Para su análisis se recogen 25 mL de la muestra, a los que se le añade 100 mL de agua destilada en un Erlenmeyer. Se realiza una valoración de ácido clorhídrico 0,1N. Se mide el pH de la muestra en un inicio, debiendo estar cercano a la neutralidad. A medida que se añade el ácido fuerte el pH va bajando hasta que llega a pH 4, donde se para la valoración y se anota el volumen de ácido utilizado indicado en la bureta desde la que se añade el ácido.

La alcalinidad se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Alcalinidad (mg CaCO}_3 \text{ L)} = V_t * N * 50000 / \text{ml de muestra}$$

Donde:

**V<sub>t</sub>**: Volumen de disolución de HCl gastado en la valoración (mL).

**N**: Normalidad del ácido estándar utilizado, ml de muestra: Volumen de muestra utilizado (mL) 50000: Es una constante de equivalencia. Los resultados son expresados como mg.1 L de  $\text{CaCO}_3$  o acético.



**Figura 11.** Adición de ácido para hallar la alcalinidad

### **3.3.4 Sólidos Totales (ST): Sólidos totales fijos (STF) y Sólidos totales Volátiles (STV) (APHA, 2540 A, 1992).**

El término engloba la materia en suspensión, la materia sedimentable, la materia coloidal y la materia disuelta. Es un parámetro bastante importante en el control de procesos físicos y biológicos. El contenido en materia sólida del agua residual está formado por varias fracciones que engloban tanto los sólidos orgánicos como inorgánicos. Con la medida de los sólidos totales fijos y volátiles, es posible determinar la cantidad de materia sólida inerte y la cantidad de materia orgánica o biomasa existente en la muestra.

Previamente, se debe preparar la cápsula donde se va a proceder al análisis de la muestra. Si en la medición se pretende analizar SV, se debe incinerar la capsula a  $550 \pm 50^\circ\text{C}$  durante al menos 1 hora en una mufla. Si, por lo contrario, solamente se pretende hacer el análisis de los ST, se debe calentar la cápsula a  $103\text{-}105^\circ\text{C}$  durante al menos 1 hora en una estufa. Después de preparar la cápsula, se debe conservar en un desecador y pesar inmediatamente antes de usar. Lo más cómodo es realizar primero los sólidos totales y después de pesarlo, llevarlo a la mufla y obtener así los volátiles. Para realizar el análisis de los Sólidos totales se vierten 25 mililitros en una cápsula, la cual se ha pesado con antelación. Posteriormente, se introduce en la estufa durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se debe dejar en el desecador unos 20 minutos y pesarla en la balanza analítica.

Para determinar los sólidos volátiles, la misma muestra con la que se ha medido los sólidos totales se llevan a la mufla a  $550^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Al sacar la cápsula trascurridos los 20 minutos, se lleva a la estufa para suavizar la temperatura con la intención de no producir un cambio brusco de temperatura y producir un error de pesado. Se repite el proceso y, en este caso se lleva el recipiente al desecador durante 10 minutos. Por último, se vuelve a pesar la cápsula y se anota el valor añadido. Equipos necesarios: Balanza analítica, estufa y mufla, Crisol, espátula.

$$ST=B-AV*1000$$

$$SV=B-CV*1000$$

Siendo:

**ST:** Sólidos totales (g.L-1).

**SV:** Sólidos volátiles (g.L-1).

**A:** Tara de la cápsula vacía (g).

**B:** Peso de cápsula + muestra tras 24 horas a  $105^\circ\text{C}$ .

**C:** Peso de cápsula + muestra tras 20 minutos a  $550^\circ\text{C}$ .

**V:** Volumen de muestra (L).



**Figura 12.** Muestras puestas en crisoles

### 3.3.5 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) (APHA, 5220 C, 2005)

La DQO representa la cantidad de oxígeno necesario para oxidar por vía química la totalidad de la materia orgánica. El requerimiento de oxígeno químico se utiliza como una medida del equivalente de oxígeno del contenido de materia orgánica de una muestra susceptible de oxidación por un oxidante químico fuerte. Para las muestras de una fuente específica, la DQO puede relacionarse empíricamente con la demanda biológica de oxígeno (DBO5).

La DQO se determina valorando la oxidación con dicromato potásico, según el método de reflujo cerrado. Tras haber tomado 10 mL de la muestra y enrasar hasta 2 litros, se procede a tomar 5 mililitros, introduciéndolo en un tubo de ensayo. A continuación, se añaden 3mL de disolución de digestión de dicromato potásico 0,066N y 7 mL de reactivo ácido sulfúrico de plata (catalizador) de forma que se cree una capa de ácido debajo de la disolución de digestión de la muestra.

Colocar los tubos en el termoreactor, previamente calentado, a 150°C y mantener la digestión durante 2 horas. Una vez transcurridas las dos horas, se enfría a temperatura ambiente. Una vez enfriadas las muestras, se procederá a su valoración y para ello, se abre el tubo, se añaden tres gotas de indicador de ferroina, un imán de agitación y se valora con una disolución sulfato de hierro y amonio (sal de Möhr, 0,025N).

El punto final de la valoración se observa con un marcado cambio de color de azul verdoso a marrón rojizo, aunque el azul verdoso puede volver a aparecer pasados unos minutos.

El volumen obtenido en la valoración con la sal de Möhr se introduce en la siguiente fórmula para calcular el dato de DQO. Se expresan en mg de O<sub>2</sub>, necesarios para oxidar un litro de muestra (mg. L<sup>-1</sup>).

*DQO en mg de O<sub>2</sub>/L=(A-B) \*M\*8000\*Fdml de muestra*

Donde:

**A:** Volumen de sal de Möhr utilizados para el Blanco

**B:** Volumen de sal de Möhr obtenido en la valoración de la muestra

**M:** La molaridad de la sal de Möhr, 8000: La constante de equivalencia mL de muestra: Volumen de muestra analizada.

**Fd:** Factor de dilución



**Figura 13.** Valoración de DQO

### **3.3.6 Determinación de Metano**

Para medir el metano contenido en los viales de las actividades específicas, se utilizó un transductor de presión (IFM PN 5007) y el método de desplazamiento de una solución alcalina para medir volumétricamente el metano. En la medición de metano, el dióxido de carbono disuelto es separado antes de ejecutar la medición; cualquier otro gas presente corresponderá a trazas proporcionalmente insignificantes. Este proceso de selección es implementado mediante una trampa de CO<sub>2</sub>, en una solución acuosa de hidróxido de sodio.

Cuando se emplea el método volumétrico, se usa una solución alcalina desplazante, siendo la más común el hidróxido de sodio (NaOH) con una concentración de 1N (Cárdenas et al., 2016), cuyo pH debe ser superior a 12 unidades para garantizar la captura del CO<sub>2</sub> producido. A continuación, se describe el procedimiento a seguir del método:

1. Se llena un recipiente de vidrio con solución de NaOH a 1N de concentración.
2. Se coloca una entrada y una salida del biogás, sellando bien el recipiente para evitar que se generen fugas.
3. Se conecta el transductor de presión y se instala en un soporte universal, con una goma a la salida de este y una aguja médica.
4. Se coloca una aguja en la goma de entrada del biogás y se coloca una probeta para recolectar la solución desplazada.
5. Se coloca el vial debajo del medidor de presión, luego se introduce la jeringa en tapón del vial esperando que la presión quede constante en la pantalla del transductor.
6. Se introduce la goma de entrada en el vial para que se desplace la solución alcalina y se deposite en la probeta. Es importante que la presión en el vial quede en cero para saber que todo el biogás ha sido capturado como se observa en la siguiente figura:



**Figura 14.** Medición de metano

### **3.4 Método Actividades específicas**

No existe un método estándar de la actividad metanogénica específica (AME), actividad acidogénica específica (AAE) y actividad hidrolítica específica (AHE) para lodos anaeróbicos. Existen varios métodos encontrados en literatura como el realizado por Soto et al, quienes realizaron la aplicación de las tres actividades específicas y da una guía de cómo llevar a cabo el procedimiento. También López et al, ensayaron la aplicación de la AME para el análisis de residuos sólidos. En general, los investigadores prueban varias concentraciones de sustratos como azúcares y proteínas para luego observar la degradación de la materia orgánica en el tiempo, y determinar la AME de varios inóculos. Normalmente, se tienen en cuenta variables como el suministro de nutrientes, mediciones de temperatura, biogás y agitación temporal o permanente de los viales.

#### **3.4.1 Consideraciones previas**

Para llevar a cabo las actividades específicas, se puede utilizar viales de cristal. Se recomienda realizar por triplicado y tener un blanco con el cual controlaremos el experimento por cada prueba. Se debe tener una caracterización del inóculo a analizar para obtener valores de ST, SV, AGV y DQO.

Para llevar a cabo el ensayo de actividad específicas se debe seguir los siguientes pasos:

##### *1. Conservación de la muestra*

Es conveniente introducir el inóculo en una incubadora (de 35 a 37 °C si está en régimen mesófilo y a 55°C si está en régimen termófilo) durante al menos tres días antes de iniciar el ensayo. Este tiempo es suficiente para que los microorganismos se adapten a la temperatura del ensayo. Los viales por utilizar pueden ser de volúmenes entre 100 y 500 mL, depende del tipo de inóculo y su disponibilidad, además Ortiz recomienda que el volumen libre en la cabeza del vial debe estar entre 20 al 25% del volumen total (Ortiz, 2011).

##### *2. Preparación de Substratos para cada actividad*

Es importante señalar que la única diferencia que existe entre las tres actividades es la adicción del sustrato, que para cada actividad es diferente:

**2.1 AHE:** para el ensayo de la actividad hidrolítica específica se utilizó **celulosa**, ya que es una molécula que comúnmente degradan las bacterias hidrolíticas.

**2.2 AAE:** para esta actividad se utilizó **glucosa**, la cual, se considera el principal intermediario en la vía de la digestión anaeróbica de los compuestos orgánicos de carbohidratos complejos.

**2.3 AME:** Para realizar la prueba del AME, se puede utilizar acetato de sodio o ácidos butírico, propiónico, valérico como sustrato, sin embargo, en literatura y en esta investigación se probaron estos ácidos sin tener un buen resultado. Dados estos resultados se ensayó con el acetato de sodio que arrojaron muy buenos resultados en la primera etapa de la investigación. Por lo cual se utilizó **acetato de sodio** como sustrato de la AME.

Para conocer la cantidad adecuada de cada sustrato, se puede añadir la cantidad necesaria para que la concentración final sea 5 g DQO/L. Sin embargo, para calcular el peso necesario de sustrato a partir de la DQO se utiliza la siguiente relación:

$$M_{\text{Sustrato}}(g) = \frac{5 \left( \frac{DQO}{L} \right) * V_{\text{medio}}(mL)}{DQO \text{ Sol sustrato} \left( \frac{g}{L} \right)}$$

Si la actividad del inóculo a estudiar se sabe que es baja o se quiere realizar un ensayo más rápido se puede utilizar una concentración de 2.5 g DQO/L.

### 3. Nutrientes y Tampón

Se debe preparar el inóculo adicionando la solución de macronutrientes y elementos traza. Por cada litro de inóculo se adicionan 2 ml de nutrientes. Para todos los viales, se ha utilizado como tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se niveló el pH a 7 antes de iniciar el experimento. Se adiciona 1.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /L de inóculo. En la tabla 2 se puede observar los micro y macronutrientes que se suministran a los viales para que las bacterias tengan elementos traza y compuestos orgánicos en abundancia y con esto, un buen metabolismo.

	Compuesto	uds.	Cantidad
Macro-nutrientes	$\text{NH}_4\text{Cl}$	g/l	85
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	g/l	18,5
	$\text{CaCl}_2$	g/l	6
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	g/l	11,5
Elementos traza	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	mg/l	2307
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	mg/l	2000
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	mg/l	500
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	mg/l	30
	$\text{ZnCl}_2$	mg/l	50
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	mg/l	50
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	mg/l	90
	$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	mg/l	100
	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	mg/l	50
	EDTA	mg/l	1000
	HCl 36%	ml/l	1

**Tabla 10.** Macro y micronutrientes utilizados en las actividades específicas. (Field et al. 1988)

### 4. Pretratamiento

Antes de adicionar los sustratos se recomienda introducir los viales llenos del inóculo en una incubadora para temperarlos a 37°C o a 55 °C según sea el caso, por 30 minutos.

## 5. Analíticas

Para realizar la analítica de los ensayos, se toma un cuarto bote aparte por cada actividad al cual se le añade el sustrato correspondiente la solución tampón y los nutrientes y el correspondiente sustrato. Con esto, tenemos la muestra para analizar la demanda química de oxígeno (DQO), ácidos grasos volátiles (AGV), alcalinidad, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y pH. El mismo día del inicio de los experimentos, se realizan los análisis fisicoquímicos. Al siguiente día del comenzar en ensayo se puede empezar a medir la producción de metano una o dos veces al día, dependiendo de la actividad del inóculo. La medición de metano se realiza durante un tiempo determinado, se puede realizar este seguimiento desde un periodo de 120 horas (5 días) hasta los 40 días si lo que se quiere es realizar una segunda alimentación para evaluar la especialización de los microorganismos.

## 6. Puesta en marcha

Se adicionan los sustratos en cada vial percatándose que cada sustrato corresponda a su actividad específica. La concentración depende de las condiciones del ensayo y del tipo de inóculo. Se recomienda una concentración entre 1.0-1.5 g SSV/L. La cantidad para preparar un 1 Litro de medio será:

$$V_{Inoculo}(mL) = \frac{1.5 * 1000}{SSV \text{ g/L}}$$

Por cada actividad se hacen 3 repeticiones y como control se adicionan tres botes sin sustrato. Se cierran bien los viales si son de rosca o se utiliza una prensa si las tapas son de aluminio. Luego se agitan por 30 minutos para homogenizar la mezcla de sustrato, inóculo, nutrientes y tampón. Luego de esto se llevan los viales a una incubadora 30 minutos a la temperatura mesófila o termófila según el tipo de inóculo.

### 3.4.2 Cálculo Actividades Especificas

Para el cálculo de las actividades específicas se ha utilizado el Monod Kinetic Model. La ecuación de la actividad específica se puede simplificar en el modelo de orden cero, es decir, el comportamiento cinético cuando se mantienen las condiciones operativas expuestas anteriormente. La actividad expresada como  $\text{g COD} * \text{g}^{-1} \text{SSV} * \text{d}^{-1}$  y calculada a partir de la velocidad de producción de metano ( $dV_{CH_4}/dt$ ) forma una tasa de degradación del sustrato ( $ds/dt$ ) (Ortiz, 2011). Es importante aclarar que la AME se calculó a partir de la producción de  $CH_4$  y las otras dos actividades se calcularon a partir de la DQO, aunque como se mide metano en todas las actividades, los datos de metano en la AAE y en la AHE pueden ser obtenidos para obtener una curva de producción de metano.

El cálculo de la actividad se puede hacer por los siguientes métodos:

- a. De la tasa de consumo del sustrato

$$(Ac_m)_s = -(ds/dt)/X_0 \quad \text{g COD} * \text{g}^{-1} \text{SSV} * \text{d}^{-1}$$

- b. De la producción de metano

$$(Ac_m)_{CH_4} = (dV_{CH_4}/dt) / (X_0 V r f_1)$$

$$(Ac_m)_{CH_4} = X_0 * t / f_1 * V_r * SSV \quad \text{CH}_4 * \text{g}^{-1} \text{SSV} * \text{d}^{-1}$$



Donde  $A_c$  es actividad,  $S$  es el sustrato limitante,  $VCH_4$  es la producción acumulada de metano,  $VR$  el volumen del reactor,  $X_0$  es el valor de la pendiente en el período de tiempo en que se observa la velocidad máxima y  $f_1$  es un factor de conversión donde de la DQO equivalente del gas, puede calcularse usando los factores normalizados de conversión de g de DQO a mL de  $CH_4$ . El cálculo del factor está calculado en la tabla 4 para diferentes temperaturas, asumiendo una elevación al nivel del mar. A 0 °C, 1 g de DQO es igual a 350 mL de gas metano seco.

Temperatura °C	1g DQO/L = ml de $CH_4$ reportado	
	$CH_4$ seco	$CH_4$ Húmedo
10	363	367
15	369	376
20	376	385
25	382	394
30	388	405
35	395	418
40	401	433
45	408	450
50	414	471

**Tabla 11.** Factores de conversión para el cálculo del contenido de DQO en el gas metano. (A presión atmosférica y a nivel del mar) Fuente: (Univalle, 2002).

También se puede obtener el incremento de actividades por alimentación, en esta segunda medición una parte del incremento es debido al crecimiento de bacterias, que se puede estimar a partir de la segunda alimentación.

$$IAT = \frac{Y_M * DQO_{AGV} * A_M}{SSV * ACT_1}$$

Donde:

$Y_M$ : Coeficiente de rendimiento celular de las bacterias metanogénicas, que es igual a: (0,028 g SSV/g DQO<sub>elim</sub>).

$DQO_{AGV}$ : Concentración de AGV consumida en la primera alimentación, expresada en unidades de DQO: 1,07 g DQO/g AGV para acético.

$A_M$ : Actividad metanogénica específica metanógenos:  $A = 3$  y  $1.5$  (g DQO/g SSV\* d) para temperaturas de 20 y 30 °C respectivamente.

$SSV$ : Concentración del inóculo (/g/L).

$ACT_1$ : Actividad metanogénica determinada en la primera alimentación (g DQO/g SSV).

El incremento de la actividad observada, expresada como fracción de la actividad original, se calcula con la siguiente expresión:

$$IAO = \frac{ACT_2 * ACT_1}{ACT_1}$$

Si  $IAO > 2IAT$ , el incremento observado es debido mayoritariamente a la adaptación de los microorganismos. Si  $IAO < 2 IAT$ , el aumento de la actividad es debido al crecimiento de las bacterias (IRTA, 2008).

### **3.5 Biología Molecular**

En este apartado se expone los métodos utilizados para obtener información genética de los inóculos estudiados, tanto la cantidad de genes como su actividad molecular. Cabe resaltar que para el ADN se llevaron a cabo dos métodos, el primero en el laboratorio TAR y el segundo en el laboratorio del IRTA.

#### **3.5.1 Extracción ADN**

Esta es una de las metodologías más clásicas en la extracción de ADN, descrita por Sambrook y colaboradores (Sambrook et al., 1989). La metodología aquí descrita es una de las más eficientes obteniendo ADN de buena calidad y en muy buenas cantidades, además es bastante económica. Sin embargo, es un proceso largo y se debe tener especial cuidado en ciertas secciones para evitar contaminación y dañar el producto final, el ADN. Por otro lado, en el proceso de extracción se hace uso de reactivos tóxicos que precisan bastante atención.

A continuación, se enuncian los pasos para realizar la extracción:

1. Pipetear 5 ml de la muestra del fago en un tubo de ensayo.
2. Concentrar las células en centrífuga 10 minutos a 10mil rpm
3. Eliminar el sobrenadante y congelar la muestra, luego triturar la muestra hasta que quede homogénea.
4. Resuspender la muestra en 1mL de High TE
5. Adicionar 30 microlitros de NaCl (5M) y 10 microlitros de SDS al 20%, agitar el contenido del tubo.
6. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos para separar las fases
7. La fase acuosa es la que contiene el ADN por lo cual se retira el precipitado
8. Adicionar a la fase acuosa 1 mL de cloroformo y homogenizar por inmersión 5 minutos, luego de eso centrifugar por 10 minutos. Repetir este paso hasta que la fase acuosa quede completamente clara. En el caso de las muestras de fango anaerobio se repitió 4 veces este paso debido a la cantidad de impurezas de la muestra.
9. Adicionar alcohol isopropílico helado y dejar en reposo durante una hora y centrifugar 15 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente, luego enjuagar el sedimento con 1 mL de etanol al 70%. Trasladar el contenido a un ependorf.
11. Centrifugar por 10 minutos y eliminar el alcohol dejando secar la muestra a temperatura ambiente. Resuspender el sedimento en 300 microlitros de Low TE.
12. Transferir 50 microlitros en una cubeta micro de fibra de vidrio para espectrofotometría y 950 microlitros de High TE. Se utiliza un factor de dilución de 1/20.
13. Medir en espectrofotómetro a longitud de onda de 260 nm y a 280 nm. Como blanco se utiliza el High TE.
14. Comprobar la pureza de la muestra:

$$P = \text{Abs } 260 / \text{Abs } 280$$

### **3.5.2 RNeasy PowerMicrobiome Kit (50), QIAGEN**

El kit RNeasy PowerMicrobiome está diseñado para una purificación rápida y fácil de ARN total de muestras con alto contenido de inhibidores de PCR. Inhibitor Removal Technology (IRT) asegura la eliminación completa de las sustancias inhibitoras a menudo contenidas en estos materiales. El resultado es un ARN que está listo para usar en las aplicaciones posteriores más exigentes. El ADN genómico se elimina en la columna utilizando la DNasa proporcionada y el tampón de reacción. El ARN se eluye en agua RNase-fr y está listo para aplicaciones posteriores.

#### **Notas antes de comenzar el método:**

- a. La solución PM1 debe calentarse a 55 ° C durante 5–10 minutos antes de su uso.
- b. Agite para mezclar la Solución PM5 antes de usar.
- c. Prepare la Solución PM1 agregando 10 µl de β-mercaptoetanol (β-ME) por cada 990 µl de Solución PM1 (un total de 1 ml por cada preparación).
- d. Prepare la solución madre de DNasa I agregando 550 µl de agua sin ARNasa al polvo liofilizado de ADNasa I (sin RNasa) y mezcle suavemente. Alícuota de la enzima de reserva DNasa I en porciones de 50 µl y almacene a una temperatura de –30 ° C a –15 ° C para un almacenamiento a largo plazo (pero no congele-descongele más de 3 veces). Para preparar la solución de DNasa I, descongele y combine 5 µl de enzima de reserva DNasa I con 45 µl de solución de digestión de DNasa por preparación.

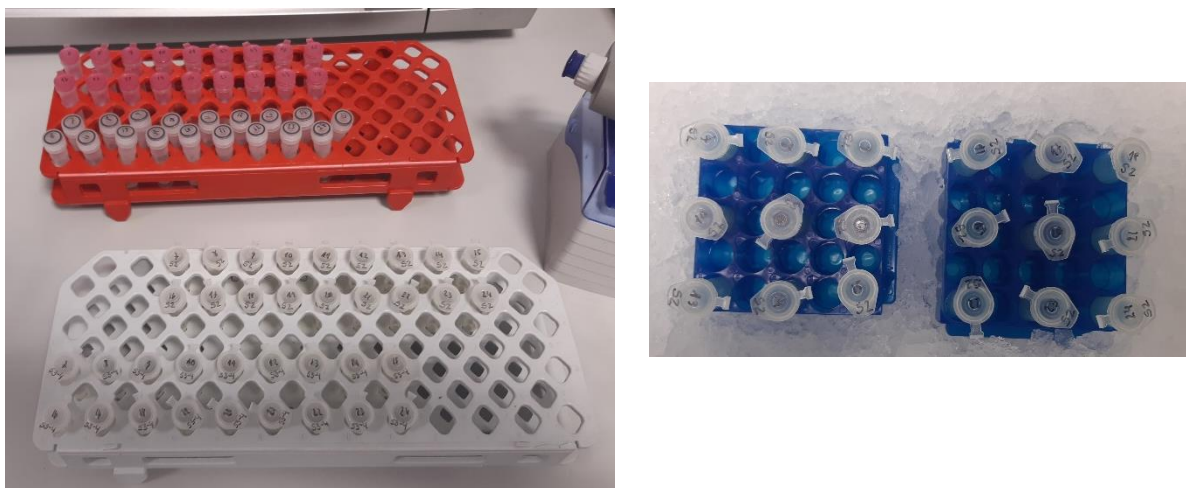
#### **A continuación, se detallan los pasos del procedimiento de extracción:**

1. Se Coloca 0,25 g de heces o muestra de biosólido en un tubo de perlas PowerBead, vidrio de 0,1 mm. Nota: Si se desea la lisis a base de fenol, agregue 100 µl de fenol – cloroformo – alcohol isoamílico (pH 6.5–8.0) al tubo PowerBead antes de agregar la muestra. Luego se agregue 650 µl de solución PM1 – β-ME al tubo PowerBead. Alternativamente, puede agregar 650 µl de PM1 y 6.5 µl de β-ME al tubo PowerBead. Asegure el tubo PowerBead horizontalmente a un adaptador de vórtice (cat. No. 13000-V1-24). Oriente las tapas de los tubos para que apunten hacia el centro del adaptador de vórtice.
2. Centrifugar a 13,000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente (15–25 ° C). Transfiera el sobrenadante a un tubo de recogida limpio de 2 ml (incluido). Nota: Si agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, retire la capa acuosa superior y transfírela a un tubo de recolección limpio de 2 ml (provisto). Luego, agregue 150 µl de solución IRS y agite brevemente para mezclar. Incubar a 2-8 ° C durante 5 min. Manual del kit RNeasy Power Microbiome 01/2020 11. Centrifugar a 13,000 x g durante 1 min. Luego, evitando el gránulo, transfiera el sobrenadante a un tubo de recolección limpio de 2 ml (provisto). Nota: No transfiera más de 650 µl en este paso.

3. Agregue 650  $\mu$ l de cada Solución PM3 y Solución PM4. Vórtice brevemente para mezclar. Nota: Para evitar que los ARN pequeños (ARN 5s, ARNt y ARN degradados) se corporifiquen con ARNm y ARNr, use 650  $\mu$ l de etanol al 70% en lugar de la Solución PM4. Para purificar ARN pequeños, como microARN y ARNip, transfiera el lisado a un tubo más grande para acomodar un volumen mayor (2.6 ml) y agregue 650  $\mu$ l adicionales de etanol al 100% (suministrado por el usuario) al lisado. Luego, introduzca 650  $\mu$ l de sobrenadante en una columna de centrifugación de ARN MB y centrifugue los tubos a 13,000 x g durante 1 minuto. Deseche el flujo continuo y repita hasta que todo el sobrenadante haya sido procesado a través de la columna de centrifugado.

4. Agite para mezclar la Solución PM5. Agregue 650  $\mu$ l de solución PM 5 a la columna de centrifugación de ARN MB y centrifugue a 13,000 x g durante 1 minuto. Omita los pasos 11–13 si desea aislar tanto el ARN como el ADN. Deseche el flujo y centrifugue a 13,000 x g durante 1 minuto para eliminar el lavado residual. Luego, Coloque la columna de centrifugación de ARN MB en un tubo de recogida limpio de 2 ml (incluido). En el centro de la columna de centrifugado, agregue 50  $\mu$ l de solución de DNasa I (preparada mezclando 45  $\mu$ l de solución de digestión de DNasa y 5  $\mu$ l de enzima de ADNasa).

5. Incubar a temperatura ambiente durante 15 min. Añadir 400  $\mu$ l de solución PM7 y centrifugar a 13,000 x g durante 1 min. Deseche el flujo continuo. Añadir 650  $\mu$ l de solución PM5. Centrifugar a 13,000 x g durante 1 min. Deseche el flujo continuo. Añadir 650  $\mu$ l de solución PM4. Centrifugar a 13,000 x g durante 1 min. Deseche el flujo continuo. Centrifugar a 13,000 x g durante 2 min. Coloque la columna de centrifugación de ARN MB en un tubo de recogida limpio de 2 ml (incluido). Luego, agregue 100  $\mu$ l de agua libre de RNasa (incluida) al centro de la membrana blanca del filtro. Incubar a temperatura ambiente durante al menos 1 min. Eluir con 100  $\mu$ l de agua libre de ARNasa maximizará el rendimiento de ARN. Para un ARN más concentrado, se puede usar un mínimo de 50  $\mu$ l de agua libre de ARNasa. Finalmente, Centrifugar a 13,000 x g durante 1 min. Deseche la columna MB Spin. El ARN ahora está listo para aplicaciones posteriores. (QUIAGEN, 2020).



**Figura 15.** Ependorf con muestras preservadas y preparadas para realizar la extracción.

### **3.5.3 Polymerasa chain reaction (PCR)**

El primer paso después de la extracción del ácido nucleico es la PCR o TR (transcripción inversa) que consiste en amplificar un fragmento objetivo de ADN y ARN. El ciclo de PCR se lleva a cabo en tres pasos: desnaturalización, recocido y extensión. Este proceso se repite durante varios ciclos generalmente de 30 a 50, para generar una gran cantidad del fragmento de ADN deseado. La parte crucial de una PCR es el conjunto de primers seleccionados que se dirigen a genes de interés que cubren grupos taxonómicos u funcionales especiales. Estos primers pueden diseñarse individualmente en función de las alineaciones de secuencias de ADN relevantes, o simplemente tomarlos de literatura.

El conjunto de primers seleccionados pueden apuntar a las secuencias en varios niveles taxonómicos, desde clase, familia, género y especie. Los productos de PCR contienen una mezcla de múltiples copias del mismo segmento amplificado al nivel taxonómico seleccionado. Estos productos de PCR pueden clonarse y luego secuenciarse para identificar especies. La PCR también puede tener sesgos y amplificar genes que no están dirigidos.

La baja temperatura de recocido tolera más desajustes y aumenta la diversidad de productos de PCR; sin embargo, también podría generar productos de PCR no deseados, llamada amplificación no específica. Los químicos y las enzimas pueden estar contaminados por secuencias de algunos microorganismos (Liu et al. 2002). Se ha visto que algunos ARNr 16S específicos están altamente correlacionados con la contaminación por en muestras ambientales (Liu et al. 2002).

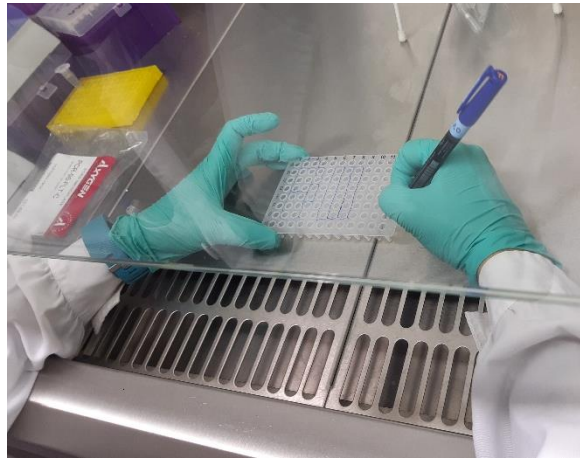
El método qPCR para hallar copias genéticas no es complejo, pero requiere de cierta habilidad en el manejo de pequeñas cantidades. Es indispensable utilizar una campana en la que solo se trabaje biología molecular ya que cualquier impureza puede arrojar malos resultados.

Lo primero que se debe realizar es la preparación de los primer y de la Máster mix que generalmente debe estar preparada antes de realizar el análisis.

Luego se va al ordenador donde se importa el perfil térmico, se guarda la secuencia deseada y se prende el qPCR, encendiendo la lampara de calentamiento. Una vez se está calentando el equipo, se preparan los patrones, se realizan las diluciones deseadas que en el caso de esta investigación fueron a 100  $\mu$ Molar y 10  $\mu$ Molar. Los patrones también se diluyen de  $10^1$  a  $10^{10}$ , este último es el patrón madre.

A cada ependorf se le adicionó 18  $\mu$ L de agua y 2 $\mu$ L de patrón. Luego se alistan el primer, el forward y el reverse y a esta mezcla se le adicionó agua a una relación de 20 $\mu$ L mezcla/180 $\mu$ L agua. A esto se le hace una pequeña agitación.

Una vez listo este paso, se dispone a preparar la matriz, como se observa en la figura 16 en la cual se coloca 9 $\mu$ L de la Mix por 1  $\mu$ L de ADN. A los patrones se les adiciona la misma cantidad de muestra.



**Figura 16.** Preparación matriz qPCR

Una vez lista la matriz, se procede a rellenar los espacios de derecha a izquierda, la primera y segunda columna con los patrones y las demás filas con las muestras ya preparadas. Una vez lista la matriz se sella con plástico y se lleva a la qPCR como se observa en la siguiente figura, donde se esperan alrededor de 3 horas para que se realice el análisis.



**Figura 17.** Matriz lista para ser leída por la qPCR

### 3.6 Métodos estadísticos

En la presente investigación se utilizaron tres métodos estadísticos para analizar las variables involucradas en las diferentes pruebas. Para Calcular la actividad metanogénica específica se utilizó la regresión lineal para hallar la pendiente que se necesita en el cálculo. Para analizar la relación existente entre las actividades específicas, los análisis fisicoquímicos y los bioindicadores de biología molecular se utilizó la correlación de Pearson y el análisis de componentes principales. Se utilizaron los softwares SPSS y SygmaPLot 14.

#### 3.6.1 Coeficiente de Correlación de Pearson

Es una prueba estadística para analizar la relación entre dos variables medidas en un nivel por intervalos 0 de razón. La Hipótesis por probar es correlacional, del tipo de "A mayor X, mayor Y", "A mayor X, menor y", "altos valores en X están asociados con altos valores en Y", "altos valores en X se asocian con bajos valores de Y".

Variables: La prueba en sí no considera a una como independiente y a otra como dependiente, ya que no evalúa la causalidad. La noción de causa-efecto (independiente-dependiente) es posible establecerla teóricamente, pero la prueba no considera dicha causalidad.

El coeficiente de correlación de Pearson se calcula a partir de las puntuaciones obtenidas en una muestra en dos variables. Se relacionan las puntuaciones obtenidas de una variable con las puntuaciones obtenidas de la otra, con los mismos participantes 0 casos.

Nivel de medición de las variables: Intervalos 0 razón.

Interpretación: El coeficiente r de Pearson puede variar de  $\sim 1.00$  a  $+1.00$ , donde:

-1.00 "A mayor X, menor Y", de manera proporcional. Es decir, cada vez que X aumenta una unidad, Y disminuye siempre una cantidad constante. Esto también se aplica "a menor X, mayor Y"(Sampieri et al., 2006).

Puntuación	Significado
-1.00	Correlación negativa perfecta
-0.90	Correlación negativa muy fuerte.
-0.75	Correlación negativa considerable.
-0.50	Correlación negativa media.
-0.25	Correlación negativa débil.
-0.10	Correlación negativa muy débil.
0.00	No existe correlacion alguna entre las variables.
+0.10	Correlación positiva muy débil.
+0.25	Correlación positiva débil.
+0.50	Correlación positiva media.
+0.75	Correlación positiva considerable.
+0.90	Correlación positiva muy fuerte.
+ 1.00	Correlación positiva perfecta.

**Tabla 12.** Significado de las puntuaciones de correlación

+1.00 "A mayor X, mayor Y" 0 "a menor X, menor Y", de manera proporcional. (Cada vez que X aumenta, Y aumenta siempre una cantidad constante.) El signo indica la dirección de la correlación (positiva 0 negativa); y el valor numérico, la magnitud de la correlación.

### **3.6.2 Análisis de componentes principales**

El objetivo de los análisis de componentes principales es la reducción de un conjunto original de variables en un conjunto más pequeño de componentes no correlacionados que representen la mayor parte de la información encontrada en las variables originales.

La técnica es más útil cuando un extenso número de variables impide una interpretación eficaz de las relaciones entre los objetos (sujetos y unidades). Al reducir la dimensionalidad, se interpreta un pequeño número de componentes en lugar de un extenso número de variables.

El análisis estándar de componentes principales asume relaciones lineales entre las variables numéricas. Por otra parte, el método de escalamiento óptimo permite escalar las variables a diferentes niveles. Las variables categóricas se cuantifican de forma óptima en la dimensionalidad especificada. Como resultado, se pueden modelar relaciones no lineales entre las variables (Sampieri et al., 2006).



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### 4.1 Evaluación y optimización de la actividad hidrolítica, acidogénica y metanogénica en un inóculo anaerobio de una EDAR.

En esta primera parte experimental, se quiso mejorar el método de las actividades específicas para lo cual se probaron cambios en variables como nutrientes, agitación y tiempo de medición. Todas las muestras tomadas son del mismo inóculo, aunque para las pruebas 1,2 y 3 es de una fecha diferente a la de las pruebas 4 y 5. Para la primera prueba se realizó el ensayo en un tiempo de 14 días. Para la segunda prueba no se adicionó nutrientes ni se realizó agitación de los viales y el tiempo de seguimiento fue durante catorce días. Durante la tercera prueba no se adicionaron nutrientes, solo se aplicó la agitación de los viales.

Las pruebas 4 y 5 se llevaron a cabo en siete días, utilizando la misma muestra ya que se quería ver la diferencia entre la agitación y la no agitación en un tiempo de muestreo de 7 días, como se puede observar en la tabla 13. A la prueba 4 se le adicionó nutrientes y se agitó. En la prueba 5 solo se adicionó nutrientes para evitar una mayor actividad microbiana al crecimiento real, de acuerdo con Soto y colaboradores (Soto et al., 1993).

Prueba	Nutrientes	Agitación	Tiempo (días)
1	x	x	14
2			14
3		x	7
4	x	x	7
5	x		7

**Tabla 13.** Características del experimento

Para esta primera parte de la investigación era muy importante saber si se puede estimar la actividad específica en un lapso corto de tiempo y con ello poder llevar este bioindicador a laboratorio de planta. Se observó que el sustrato utilizado es muy importante en una buena obtención de resultados, por ejemplo, se probó como sustrato los ácido propiónico y butírico para la AME, pero estos no arrojaron buenos resultados.

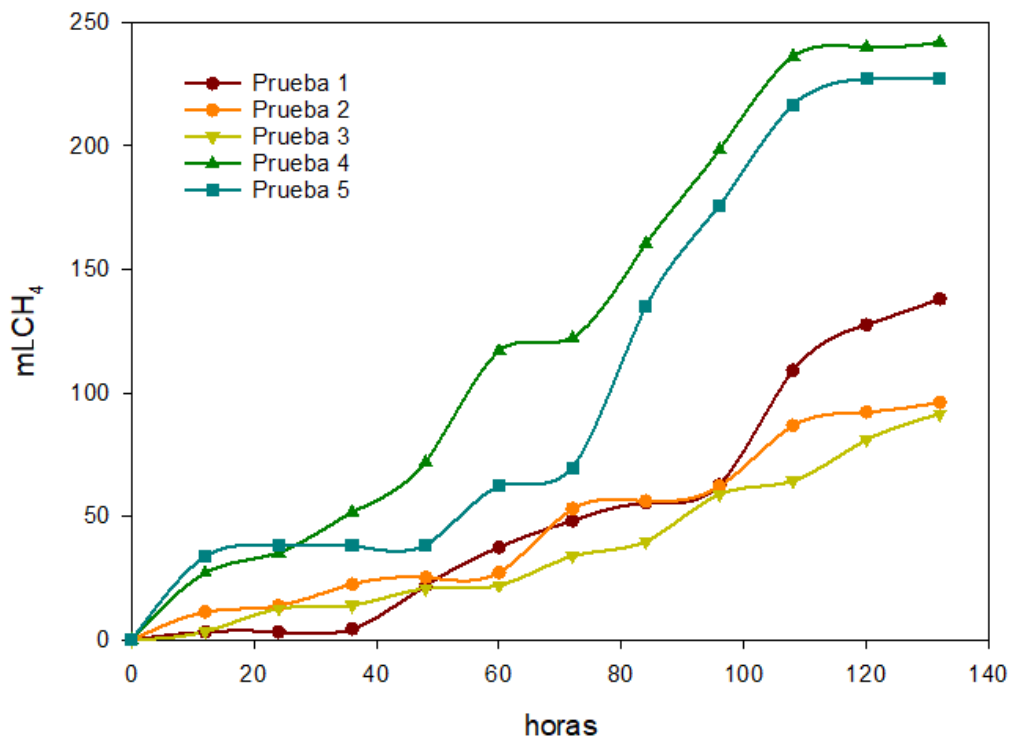
A continuación, se expone en la tabla 14, la caracterización del inóculo de esta etapa de la investigación.

Prueba	Actividad	Parámetros				
		ST g/L	SV g/L	pH	DQO g/L	AGV/ALC
1-3	AME	23,1	13,7	8	37,2	0,91
	AAE	27,3	15,2	7,32	35,7	0,26
	AHE	23,3	16,4	7,5	41,9	0,25
	Control	24,2	17,1	7,1	33,8	0,43
	Error	± 0,5	± 0,8	±0,2	±0,2	±0,3
4-5	AME	19,8	10,4	7,5	37,2	0,41
	AAE	38,6	18,1	8,2	50,2	0,41
	AHE	33,6	23,6	8,3	44,4	0,55
	Control	32,9	25,8	8,4	35,5	0,54
	Error	± 0,9	± 0,9	±0,1	± 0,9	±0,3

**Tabla 14.** Caracterización de las pruebas

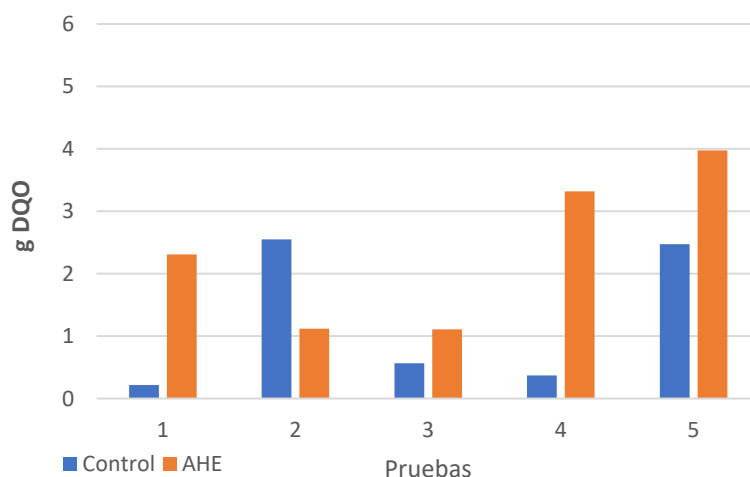
#### 4.1.1 Actividad Hidrolítica

Para la AHE se ha encontrado que la prueba 4, con agitación y la 5 con agitación y adición de nutrientes, tuvieron los mejores comportamientos.



**Figura 18.** Metano generado para todas pruebas de AHE. Prueba 1(con agitación y nutrientes, 14 días) Prueba 2 (14 días), prueba 3 (Agitación, 7 días), prueba 4(con agitación y nutrientes, 7 días), prueba 5 (Nutrientes, 7 días).

Como se observa en la figura 18, la prueba 4 y 5 tienen un crecimiento exponencial a partir del segundo día y llegan a la meseta de su crecimiento al quinto día, en este periodo de tiempo se puede tener una curva representativa. La prueba uno tiende a tener una curva parecida, aunque tarda más tiempo en llegar a la meseta de crecimiento.

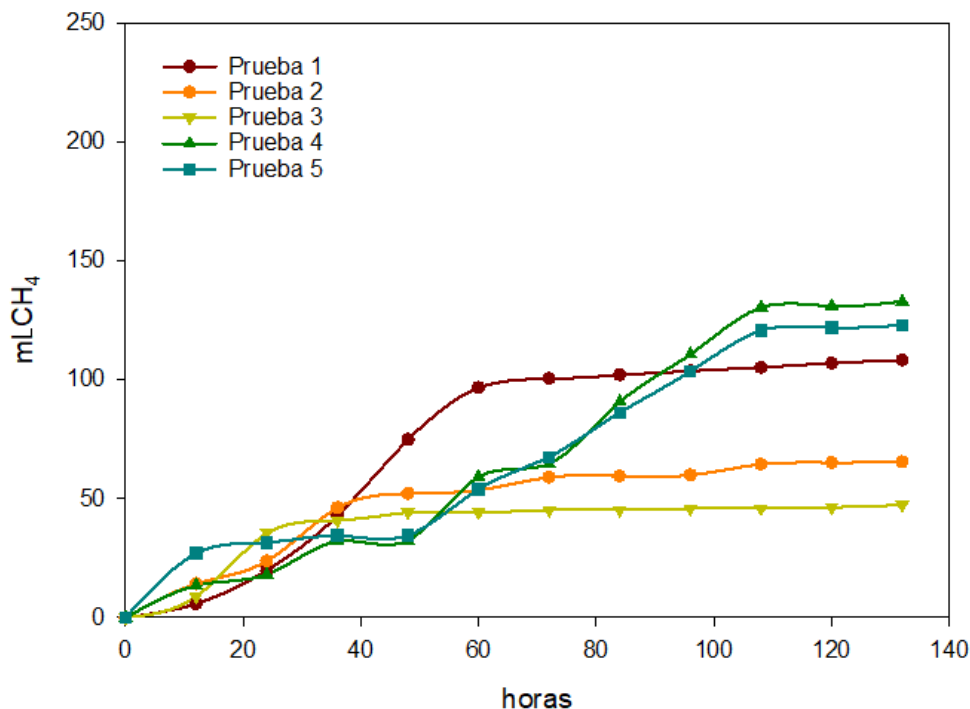


**Figura 19.** DQO degradada para AHE y el control

En términos de DQO degradada, la prueba que tuvo un mejor comportamiento también fue la quinta y luego la cuarta como se puede ver en la figura 19.

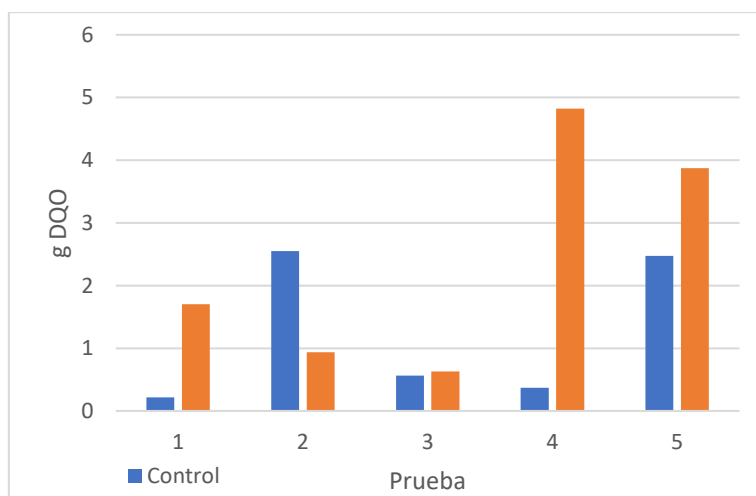
### 4.1.2 Actividad Acidogénica

Para la AAE se encontró que la prueba 4, con agitación y la 5 con agitación y adición de nutrientes, tuvieron los mejores comportamientos, como se puede ver en la figura 20, seguido de la prueba 1 la cual se le añadió nutrientes y se agitó. Estas pruebas, llegan a la meseta de su crecimiento exponencial antes del quinto día. Las pruebas dos y tres por su parte no tuvieron un desempeño significativo como en la AHE. Esto indica que para este tipo de bacterias la agitación o no agitación de los viales no tiene efecto en ellas.



**Figura 20.** Metano generado para todas pruebas de AAE. Prueba 1 (con agitación y nutrientes, 14 días) Prueba 2 (14 días), prueba 3 (Agitación, 7 días), prueba 4 (con agitación y nutrientes, 14 días), prueba 5 (Nutrientes, 7 días).

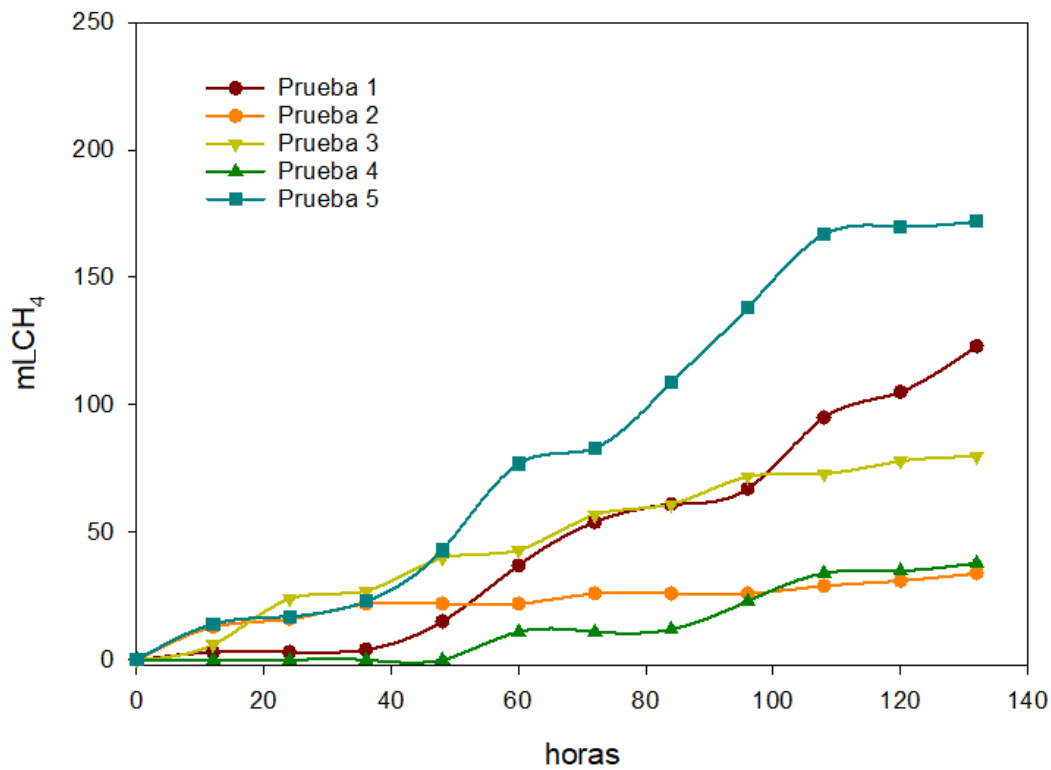
La Figura 21 muestra que la prueba cinco tuvo una DQO degradada más elevada que las demás, lo que concuerda con la curva de la figura anterior. Sin embargo, podemos ver que la DQO del control superó la de la AAE.



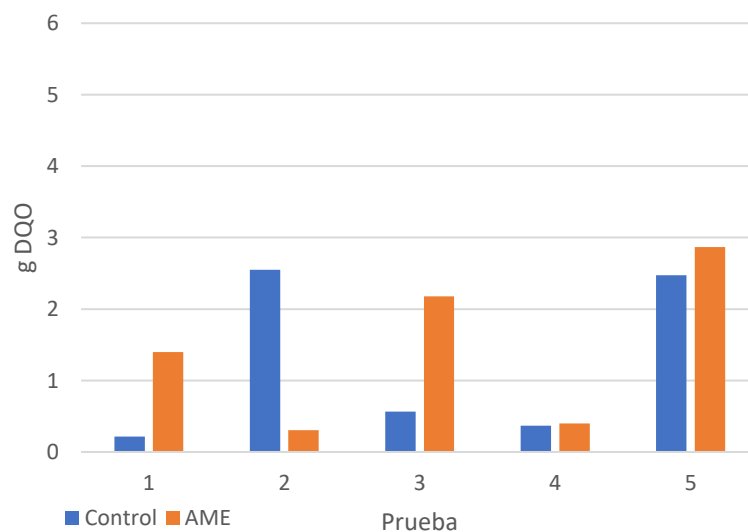
**Figura 21.** DQO degradada para la AAE y el control

### 4.1.3 Actividad Metanogénica

Se puede ver en la figura 22, que la prueba 5 con agitación y adición de nutrientes, es la curva representativa porque muestra un crecimiento exponencial luego del segundo día y se evidencia una curva con características de crecimiento exponencial. Además, se observa una buena producción de metano llegando al fin de su crecimiento exponencial al quinto día del ensayo.



**Figura 22.** Metano generado para todas pruebas de AME. Prueba 1 (con agitación y nutrientes, 14 días) Prueba 2 (14 días), prueba 3 (Agitación, 7 días), prueba 4 (con agitación y nutrientes, 14 días), prueba 5 (Nutrientes, 7 días). A continuación, se observa la DQO degradada en todas las pruebas para la AME.

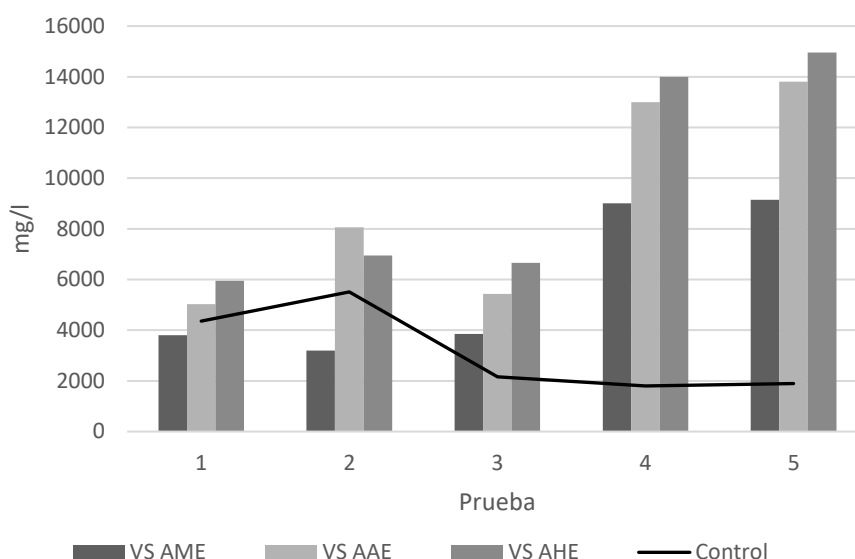


**Figura 23.** DQO degradada para la AME y el control

Aunque en la prueba 3 (con solo agitación), la DQO degradada supera la del control, no es más representativo que la prueba 5, porque la diferencia de DQO degradada entre la 3 y 5 prueba es de 5 g/L. Podría ser que los microorganismos en la prueba cinco tuvieran las condiciones ideales para biodegradar 5 gramos más de materia orgánica.

#### 4.1.4 Sólidos volátiles Eliminados para todas las pruebas

También se ha evaluado los sólidos volátiles eliminados (SV), un parámetro importante en la digestión anaerobia. En la figura 24 se puede ver la evolución de la VS degradados en todas las pruebas y en el control.



**Figura 24.** Sólidos volátiles degradados para todas las pruebas. Prueba 1 (con agitación y nutrientes, 14 días) Prueba 2 (14 días), prueba 3 (Agitación, 7 días), prueba 4 (con agitación y nutrientes, 14 días), prueba 5 (Nutrientes, 7 días). A continuación, se observa la DQO degradada en todas las pruebas para la AME.

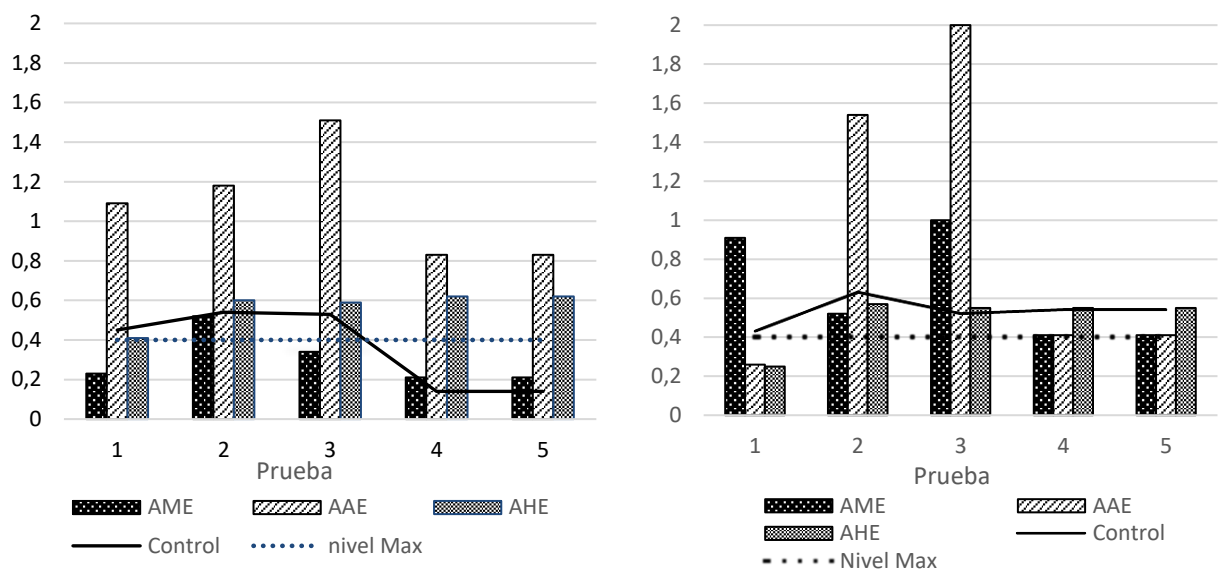
En todas las pruebas los SV del control fueron más bajas, esto es algo común, si tenemos en cuenta los sustratos suministrados en las actividades específicas. La Figura 24 respalda el resultado en la curva de la AME y en el valor de DQO, porque la prueba 5 tuvo el mejor comportamiento que las otras pruebas en un lapso más corto de tiempo.

La AHE tuvo elevados SV degradados en la quinta y cuarta prueba, lo que dice la no agitación de la prueba cinco tiene el mismo rendimiento en términos de SV degradados que la cuarta prueba la cual tuvo agitación por medio del shaker. Es decir, que en términos de SV la agitación de los viales no es una variable influyente. Sin embargo, los SV siguen siendo un parámetro que puede relacionarse con las actividades específicas ya que también y de manera menos precisa da una idea de la concentración de sólidos. Debido a la complejidad de los residuos, no es posible conocer normalmente su composición, por lo que se utilizan los SV para describir su concentración (Fernández-Polanco, P. et al. 2005).

#### 4.1.6 Relación AGV/ALC para todas las pruebas

Otro parámetro importante de la digestión anaeróbica es la relación entre los ácidos grasos volátiles y la alcalinidad, que generalmente debe ser inferior a 0,4. Como dijo Borja, la relación AGV/ALC se puede usar como un indicador de la estabilidad del proceso. Cuando esta relación sea inferior a 0,4-0,5 (equivalentes de ácido acético / equivalentes de  $\text{CaCO}_3$ ), se considera que el proceso funciona favorablemente sin riesgo de acidificación (Borja et al., 2004). Esta relación muestra el equilibrio que debe tener el reactor entre la oferta de ácidos y la capacidad metanogénica para usar estos ácidos y producir metano.

En esta etapa de la investigación, se realizó la medición de AGV al comienzo y al final de las pruebas. Podemos ver en la figura 25 que las pruebas 4 y 5 estaban en la tasa óptima, excepto la AHE, donde la tasa aumentó debido a la alta presencia de ácidos que tenía una relación entre 0,5-0,6.



**Figura 25.** Relación AGV/ALC para todas las pruebas. (a) inicio, (b) final

La Figura 25 muestra que la AME estaba en la relación óptima, pero AAE tenía una tasa más alta porque hay muchos ácidos en el medio. Podemos observar en las pruebas 1,2,3 que incluso el control no estaba en la tasa óptima, por lo que es normal que la relación en estas pruebas sea alta. Por otro lado, podemos ver en la quinta prueba como al inicio del ensayo la relación AGV/ALC de la AME y la AAE está es valores óptimos, y al final del ensayo la AME mantiene una óptima relación, pero las otras actividades tienen alta presencia de AGV, lo que nos indica que existió un gran consumo de AGV en la AME.

A groso modo, se ha observado que en la cuarta y quinta prueba existió una mejor relación AGV/ALC que en las demás pruebas. Las primeras tres pruebas por el contrario exhiben al inicio una oferta de AGV significativa y al final un consumo de los AGV, pero no suficiente para llegar a una relación óptima. Estos resultados confirman que la prueba cinco tiene el mejor comportamiento que las otras pruebas y que con ello podemos correlacionar con los AGV las actividades específicas para soportarlo como bioindicador de inóculos de depuradora. Como argumentó Li et al, la relación de AGV a alcalinidad total (AGV/ALC) puede reflejar el metabolismo del sistema de digestión anaerobia (Li et al, 2014).



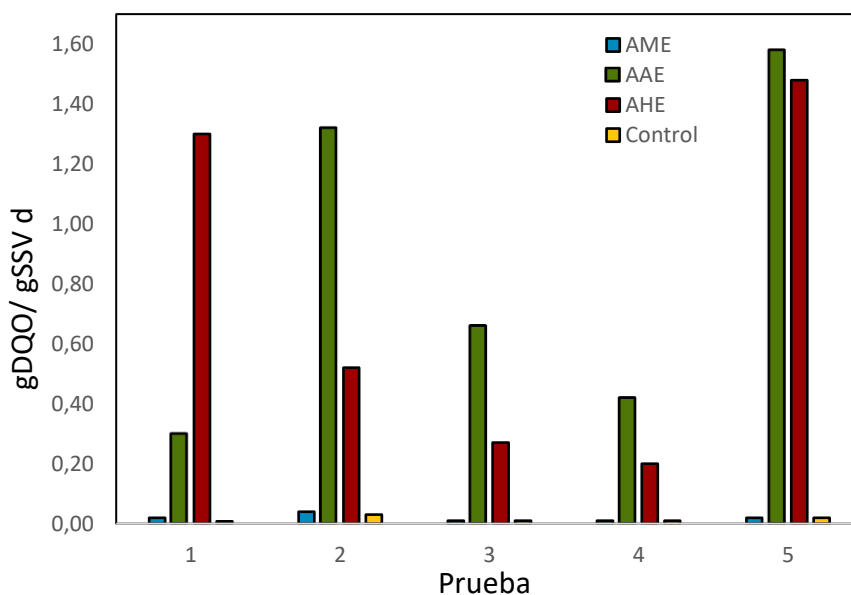
#### 4.1.7 Cálculo valor de actividades específicas

A continuación, se muestran los valores calculados de cada una de las actividades específicas, así como la actividad del control. La Tabla 15 muestra que para AHE y AAE para la quinta prueba tiene el mejor valor y para AME fue la segunda prueba ligeramente más alta que las demás. Como concluye Soto, se debe considerar que la tasa de pasos metanogénicos es generalmente menor que la hidrolítica o acidogénica, especialmente cuando se consideran sustratos solubles (Soto et al., 1993).

Prueba	AHE	AAE	AME	Control
1	1.3	0,30	0,02	0,01
2	0,52	1,32	0,04	0,03
3	0,27	0,66	0,01	0,01
4	0,20	0,42	0,01	0,01
5	1,48	1.58	0,02	0,02

**Tabla 15.** Cálculo actividades específicas. Actividad en g DQO<sub>CH<sub>4</sub></sub>/g SSV\*d. AAE y AHE en g DQO/g SSV\*d.

A pesar de que la quinta prueba tiene una AME muy parecidas a las demás, vemos que es la que tiene mejor desempeño en las actividades específicas y que la no agitación de los viales es un método que nos dará un buen resultado en estos ensayos, como se observa en la figura 26.



**Figura 26.** Valor de las actividades específicas y el control por cada prueba

Los valores obtenidos en la investigación son similares a otros experimentos. Por ejemplo, el cálculo de Soto de la AME fue 0,97 DQO CH<sub>4</sub>/g SSV\*d en promedio. El resultado para AAE fue entre 0,6-1,08 DQO CH<sub>4</sub> /g SSV \* d. Por otro lado, otro investigador como López calculó la AME de otros sustratos. Calcularon 0,02-0,2 DQO CH<sub>4</sub> /g SSV \*d para el lodo anaeróbico, 0,8-1,5 DQO CH<sub>4</sub> / g SSV \* d para el lodo granular y para la laguna anaerobia 0,03-0,1 (López et al. 2004). Además, Jiménez obtiene un valor 1,31 de AME de codigestión entre estiércol de cerdo y paja de arroz (Jiménez et al, 2015).

#### **4.1.8 Discusión**

Se ha evaluado las actividades específicas para afinar el método de la AME, AAE y AHE y encontrar resultados confiables. Para el método de la AHE y la AAE se encontró que la prueba 5, sin agitación fue la prueba que produjo más biogás. Como afirma Ortiz, los resultados de AME obtenidos no fueron buenos, por lo que se pensó la agitación podría estar provocando la ruptura de los flóculos microbianos, y por tanto reduciendo la actividad metanogénica (Ortiz, 2011).

Por otro lado, se ha observado que la AME tiene valores muy bajos en comparación con la AAE y la AHE, esto se debe principalmente a que el cálculo para la AME se realiza en función de la producción de metano y para las otras dos actividades mediante el cociente entre la DQO y los SSV.

La prueba cinco fue la que tuvo mejor comportamiento en las curvas de las actividades específicas, fue la prueba que destacó en todas, respaldado por un mayor DQO degradada, unos SV eliminados considerables y una estable relación de AGV/ALC. El valor de la AME no fue el mejor, pero si se compara con las demás pruebas la diferencia no es muy significativa.

Con respecto a los parámetros de actividad específicos, se concluye que es mejor hacer el método sin agitación, con nutrientes y con un mínimo de 108 horas de tiempo de experimento (casi 5 días), porque en la figura 18 podemos ver en la quinta prueba, cómo el crecimiento de los microorganismos se detiene a las 108 horas y luego se estabiliza. El cálculo de la actividad específicas muestra que los valores eran similares a los encontrados en literatura y se observa un gran potencial de correlación entre las actividades específicas y los parámetros fisicoquímicos.

El control, es decir el blanco del experimento, obtuvo valores por debajo de las pruebas a las cuales se les adicionó los sustratos. Esto nos indica que el experimento estuvo bien realizado, ya que al no tener alimentación lo evidente es que el rendimiento de estos viales fuera menor que los demás.

#### 4.2 Análisis de cinco inóculos de digestión anaerobia utilizando la correlación de bioindicadores de comportamiento: Actividad hidrolítica, Actividad Acidogénica, Actividad Metanogénica y ADN.

En este paso de la investigación se analizaron cinco inóculos, tres con codigestión. Se ha utilizado actividades específicas como el primer bioindicador que nos brinda la capacidad de producción de metano de cada inóculo. Se utilizó la actividad metanogénica específica, actividad acidogénica específica y actividad hidrolítica específica.

Se ha utilizado un método de extracción para tomar el ADN de los inóculos, repitiendo algunos pasos debido a las impurezas de la muestra. El ensayo de los bioindicadores se realizó al mismo tiempo, para mantener las mismas condiciones experimentales. El experimento se realizó en el laboratorio de digestión anaerobia y de microbiología del grupo de investigación TAR. En la tabla 16 se describe el sustrato utilizado para cada actividad específica y el número de repeticiones realizadas. Al grupo control no se le adicionó sustrato.

Actividad específica	Sustrato	Repetición
AME	Acetato	3
AHE	Celulosa	3
AAE	Glucosa	3
Control		3

**Tabla 16.** Características de la aplicación de las actividades específicas.

La metodología de esta etapa empezaba por la preparación de actividades específicas, luego se hacía la extracción de ADN al inicio y al final del experimento. Se observó el comportamiento de las actividades específicas durante cinco días y los resultados de ADN se podrían tener en cinco horas.

Los resultados que se exponen a continuación tuvieron en cuenta las tres repeticiones de cada actividad específica. Por ejemplo, en el momento de calcular la DQO, los ST, SV el pH y la relación AGV/ALC, se obtenía las medias de los tres resultados de cada una de las repeticiones para obtener el resultado final. Las tablas de las caracterizaciones tienen el cálculo de la desviación estándar (SD) que nos da una idea del error que se cometió en el cálculo de las variables.

#### 4.2.1 Caracterización inicial del ensayo

El primer paso fue caracterizar los inóculos como se puede ver en la tabla 3. Al comenzar la prueba se realizaron análisis de Sólidos totales, sólidos volátiles, pH, DQO y se halló la relación AGV/ALC, antes de usar los bioindicadores. Al mismo tiempo, se hizo la evaluación de actividades específicas y las extracciones de ADN.

A continuación, se detalla los resultados de las analíticas en la siguiente tabla.

Prueba	Actividad	Parámetros				
		ST g/L	SV g/L	pH	DQO g/L	AGV/ALC
A	AME	27,4	14,3	8,5	22,1	0,94
	AAE	26,9	17,9	8,4	22,5	0,49
	AHE	27,6	18,2	8,3	23,5	0,46
	Control	21,5	12,1	8,7	17	0,45
	Error	± 0,9	± 0,8	±0,1	± 0,9	±0,2
B	AME	41	24,6	7,3	39,7	1,21
	AAE	42,3	28,3	7,8	41,4	0,69
	AHE	41,2	28,9	7,9	39,5	0,67
	Control	35,8	22,8	7,1	38	0,77
	Error	± 0,8	± 1	±0,3	± 0,7	±0,2
C	AME	21,5	11,2	8	20,5	1,48
	AAE	20,8	13,7	7,6	22,8	0,97
	AHE	20,7	13,8	7,9	19	0,82
	Control	15,6	8,4	8,1	17,8	0,9
	Error	± 0,9	± 0,8	±0,2	± 0,8	±0,3
D	AME	28,5	17	8,1	34	1,4
	AAE	28,6	20,2	8,1	34,1	0,68
	AHE	29,1	20,9	8	31,5	0,72
	Control	23,4	15,1	7,8	31,2	0,64
	Error	± 0,9	± 1	±0,1	± 1	±0,3
E	AME	29,9	15,3	8,5	21,5	1,14
	AAE	29,3	18,2	8,6	24,9	0,82
	AHE	31,1	19,4	8,6	23,7	0,91
	Control	24,7	13,2	8,6	20	0,83
	Error	± 0,9	± 0,8	±0,05	± 0,7	±0,1

**Tabla 17.** Caracterización de inóculos. Prueba A: Inoculo alimentado con fango mixto. Prueba B: Inoculo alimentado con fango mixto decantado. Prueba C: inóculo + lixiviados. Prueba D: Inóculo + detergente + aceite. Prueba E: codigestión de Fango deshidratado + materia seca.

En relación con la caracterización de los inóculos se puede observar que el inóculo decantado de la prueba B es el que tiene una carga orgánica más alta seguido de la prueba D. Por otro lado, el que tiene una relación AGV/ALC más estable es el inóculo de la prueba A seguido de la prueba B. En general todas las pruebas tienen un pH alcalino, sin embargo, el inóculo de la prueba A, D y E tienen un pH por encima de 8. Para ensayos Batch es mejor tener un pH alcalino y con ello contrarrestar la acumulación de AGV y de bicarbonato. Las proporciones de los diversos productos se modifican por la duración y las condiciones de la fermentación, siendo el butírico y el acético los productos mayoritarios si el pH se mantiene alcalino (Madigan et al., 1998).

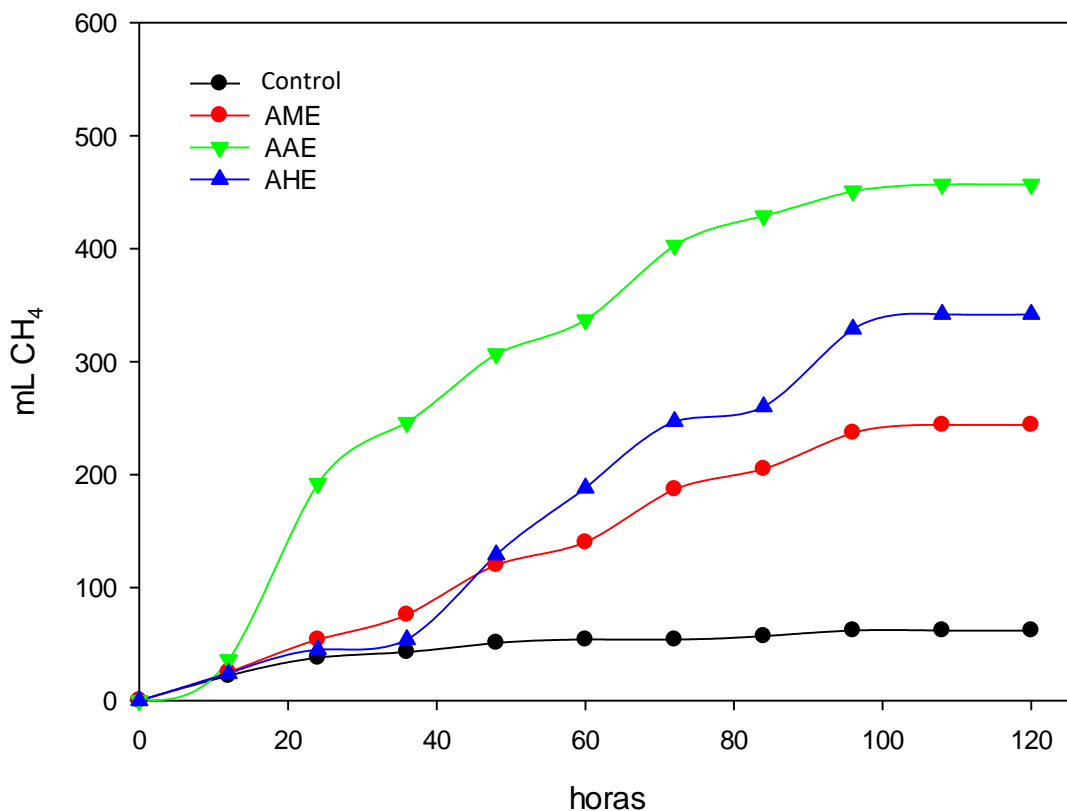
#### 4.2.2 Inóculo alimentado de fango mixto (Prueba A)

Se comienza por analizar los resultados del inóculo + fango mixto que corresponde a la prueba A, se exponen los datos fisicoquímicos en la tabla 18. La AHE en este caso, tuvo la mejor degradación de DQO: 2,8 g/L, en relación con las otras actividades y el control. Los SV degradados estaban en 4,1 g/L. El pH comenzó en 8,3 y terminó en 7,2. Como dice Soto, el consumo de sustrato influye claramente en la disminución del pH y el posterior aumento de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa (Soto, 1993).

Prueba	Actividad	Parámetros						
		ST d g/L	SV d g/L	pH		DQO d g/L	AGV/ALC	
				inicial	final		Inicial	Final
A	AME	1,08	1,78	8,5	7,6	1,19	0,94	0,72
	AAE	3,53	4,64	8,4	7	1,70	0,49	1,2
	AHE	3,45	4,13	8,3	7,2	2,82	0,46	0,92
	Control	0,26	0,44	8,7	7,1	0,34	0,45	1,06
	Error	±0,9	±1	±0,1	±0,2	±1	±0,2	±0,2

**Tabla 18.** Parámetros fisicoquímicos para el inóculo de la prueba A. d: degradada

En la AAE, la DQO degradada fue de solo 1,7 gr, la relación inicial entre AGV/ALC fue de 0,49 pero aumento hasta 1,2. Esto es posible por la alta presencia de AGV en los viales, pero debido al efecto del tampón, el pH se mantuvo alcalino. En la siguiente figura se puede ver la producción de metano para este inóculo.



**Figura 27.** Metano generado por el inóculo alimentado de fango mixto.

El pH al inicio del experimento estaba bastante alcalino, pero al final se estabilizó en 7. Esto puede indicar que existía una alta presencia de AGV la cual ha disminuido el pH, lo cual, es respaldado por la curva de la figura 27, ya que en esta se muestra como la AAE tuvo una alta producción de metano, debido principalmente por la abundancia de AGV.

En cuanto los SV, la AAE es la actividad que tiene más SV degradados seguido de la AHE, la AME y por último el control. Eso sigue la tendencia que se observa en la figura 27. Entre más sólidos volátiles degradado, más actividad existe en el inóculo y, por ende, más producción de metano.

Por otra parte, la DQO degradada más alta fue la de la AHE seguido de la AAE, la AME y por último el control. Esto corrobora la valides del experimento, debido a que el control que es el blanco del experimento tiene los valores más bajos de DQO degrada, así como de los SV.

Al inicio del experimento la relación AGV/ALC estuvo dentro del rango recomendado, menos en la AME, luego al final del experimento, la relación subió hasta niveles de 1.2 en la AAE. Eso como hemos dicho anteriormente se debe principalmente a la alta presencia de AGV en esta actividad.

La curva de la AME como se aprecia en la figura 27 está por debajo de la curva de las otras actividades, lo que concuerda con una baja producción de biogás del digestor (450 ml/día). La DQO y los SV degradados son más altos en la AME que en el control, lo que respalda que la curva de la AME aumente en el tiempo.

Por otra parte, se observa que la AAE fue la que tuvo la mayor producción de biogás, debido a esto se considera que el control cuenta con gran cantidad de ácidos y a esto se debe el descenso del pH al final de la prueba. Cuando la actividad de las bacterias acidogénicas es mayor que las otras, se producen y acumulan altos volúmenes de ácidos orgánicos y el pH comienza a descender, un nivel de pH inhibitorio para los metanogénicos es de 6.4 (Monnet,2004).

Vemos en la figura 27 que los microorganismos terminan su crecimiento exponencial a las 96 horas (4 días), menos el control el cual no tuvo una gran actividad. Con esto, podemos decir que las actividades pueden tener un resultado óptimo los primeros cinco días del ensayo. Esto concuerda lo que dice Flotats, quien estimó el tiempo mínimo de generación de las bacterias metanogénicas de 2-5 días. (Flotats, 2015).

#### 4.2.4 Inóculo alimentado de fango mixto en decantación (Prueba B)

Analizamos ahora los datos que corresponden a la prueba B. Como se dijo anteriormente este inóculo fue decantado por lo cual existe más materia orgánica y por ende más SV que en el anterior inóculo como se aprecia en la siguiente tabla.

Prueba	Actividad	Parámetros						
		ST g/L	SV g/L	pH i		DQO d g/L	AGV/ALC i	
				inicial	final		Inicial	final
B	AME	0,06	1,93	7,3	7,6	5,93	1,21	0,54
	AAE	4,18	4,62	7,8	7,8	9,58	0,69	0,82
	AHE	0,61	3,21	7,9	7,4	8,65	0,67	0,82
	Control	0,35	0,53	7,1	7,6	5,60	0,77	0,87
	Error	± 0,8	± 0,7	± 0,3	± 0,1	± 1	± 0,2	± 0,1

Tabla 19. Parámetros fisicoquímicos del inóculo de la prueba B. inicial y final. \*degradada

A continuación, en la figura 25, se expone la curva de generación de metano para este inóculo

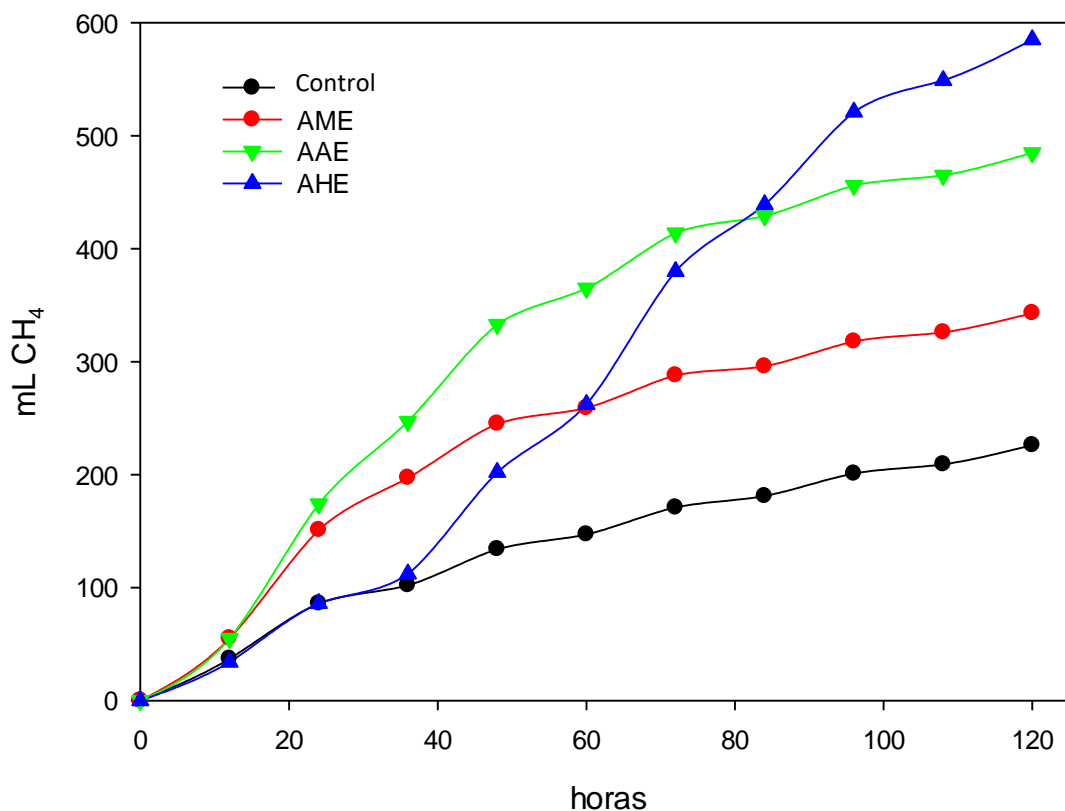


Figura 28. Metano generado por el inóculo decantado.

En la prueba B, la DQO degradada de la AHE fue de 8,6 g/L y la VS fue de 3,2 g/L. Como este inóculo se decantó, es posible que existan mejores condiciones para las bacterias. La relación AGV/ALC mantiene el valor entre 0,67-0,82 y el pH comenzó en 7,9 y terminó en 7,4. Podemos ver que las bacterias hidrolíticas tuvieron un buen desempeño porque degradaron las moléculas grandes de manera eficiente.

En esta prueba, la DQO degradada de la AAE fue de 9,5 gr, y los SV degradados fueron de 4,6. Estos parámetros fueron mucho menores que en esta prueba porque había mucha carga orgánica en el inóculo decantado. La relación inicial AGV/ALC fue de 0,69 y la final fue de 0,82. Estaba claro que había muchos ácidos en los viales, pero el pH permaneció en 7,8 gracias a la solución tampón. Para esta prueba, se ha utilizado un inóculo decantado con 38 g/L de DQO y 23 g/ L de SV.

En esta prueba, está claro que la AME alimentada con acetato tuvo un mejor comportamiento que el control, es posible corroborar este dato con los SV eliminados porque había más SV eliminados en la AME que en el control. En la figura 28, podemos ver que este inóculo tuvo una producción de metano mayor que la del primero, y la AME fue mayor, lo que significa que el potencial del inóculo decantado para producir metano es mayor en la prueba B; un cincuenta por ciento más de producción de metano.

Es interesante observar cómo solo con un tratamiento físico como la decantación puede aumentar la eficiencia del proceso, incrementando los SV y por supuesto la población de microorganismos. La decantación por contacto favorece la floculación y mejora el rendimiento, además de aumentar la adsorción de sustancias disueltas sobre los flóculos ya formados. Se consigue aumentando la concentración de flóculos mediante un lecho de fangos o recirculando parte de los fangos formados (Hu et al., 2005).

Se puede observar también que la AHE tiene un gran comportamiento debido a la aglomeración de consorcios bacterianos que logran reducir las moléculas complejas a aminoácidos o ácidos de cadena larga, lo que las acidogénicas tienen en abundancia y lo procesan con gran eficiencia como se observa en la figura 28. Es interesante como en esta prueba, la curva seguirá ascendiendo si se prolonga el ensayo, ya que todas las curvas tienen un crecimiento exponencial.



#### 4.2.5 Codigestión de Inóculo alimentado con Fango Mixto + lixiviado (Prueba C)

Ahora analizamos los resultados de la codigestión de fango mixto y lixiviado que corresponde a la prueba C. En este inóculo, la DQO degradada fue de 6,4 g/L casi igual que la del control. Los SV degradados fueron de 2,8 g/L. El pH terminó en 7,6 y la relación AGV/ALC comenzó en 0,82 y terminó en 1,39. La razón por la cual esta proporción terminó alta es porque había un ambiente ácido proveniente de los AGV. En el lixiviado es posible encontrar muchos lípidos, ya que los aceites y grasas se pueden convertir fácilmente en ácidos grasos de cadena larga. En esta prueba, la DQO degradada fue de 8,1 g/L y los SV degradados fue de 4,1 g/L, como se puede observar en la tabla 20.

Prueba	Actividad	Parámetros						
		ST d* g/L	SV d g/L	pH		DQO d g/L	AGV/ALC	
				inicial	final		Inicial	final
C	AME	0,85	1,08	8	8,3	5,00	1,48	0,99
	AAE	3,33	4,10	7,6	6,3	8,11	0,97	2,38
	AHE	1,74	2,88	7,9	7,6	6,43	0,82	1,39
	Control	0,10	0,84	8,1	7,9	6,22	0,9	1,14
	Error	±1	±0,9	±0,2	±0,1	±0,8	±0,2	±0,2

Tabla 20. Parámetros fisicoquímicos inicial y final. \*degradado

La gráfica de producción de metano según cada actividad específica se muestra en la siguiente gráfica.

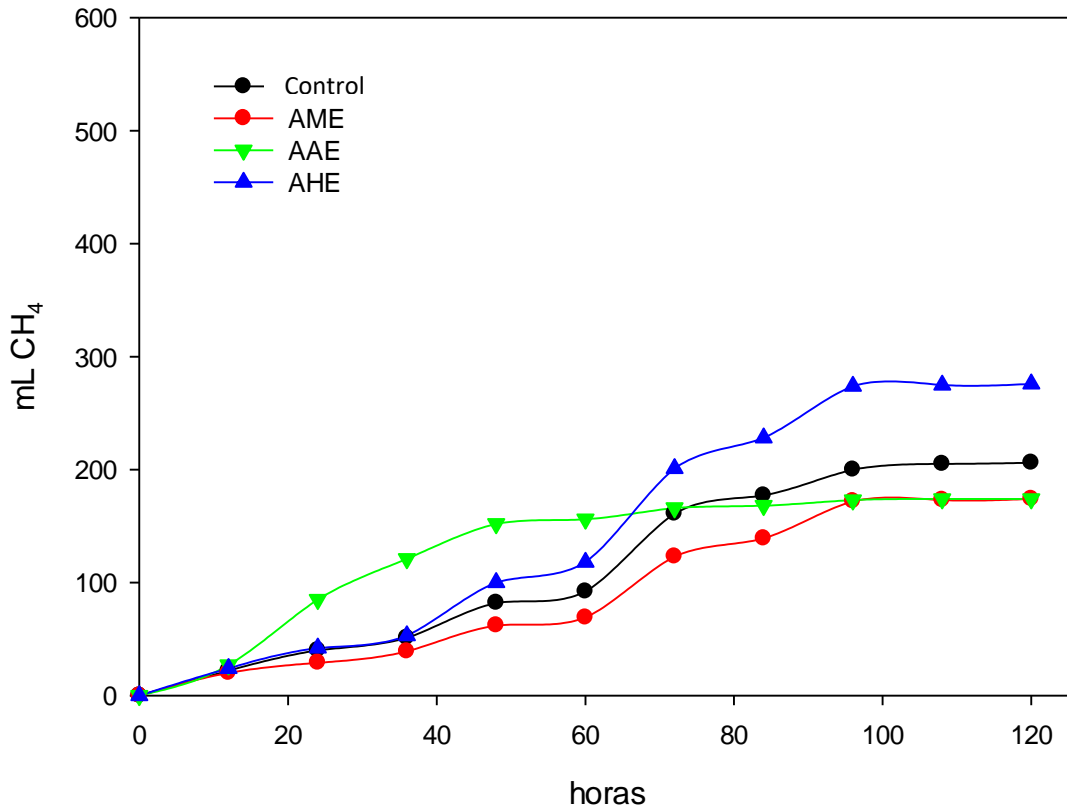


Figura 29. Metano generado por el inóculo alimentado con fango mixto + lixiviado.

El AAE en esta prueba tuvo el mejor rendimiento que otras actividades porque hubo acumulación de ácidos en los viales y la relación AGV/ALC tuvo un aumento de 0,97 a 2,38. Una alta carga orgánica aumenta la producción de hidrógeno y AGV más allá de la capacidad de las metanogénicas para digerirlo, lo que resulta en la acumulación de AGV, o la disminución de la capacidad de los metanógenos debido a la inhibición por compuestos tóxicos o caída de pH (<6) (Schink, 2002). En este caso, el pH comenzó con 7,3 pero terminó con 6,3. La razón principal fue la alta oferta de ácidos en los viales y que las bacterias acidogénicas tuvieron un gran crecimiento.

En este ensayo, el comportamiento de la AME fue diferente porque hubo altibajos, pero no un crecimiento exponencial. Es posible que las arquea metanogénicas no tuvieran un buen ambiente. De casi todos los microorganismos presentes en el reactor, las metanogénicas son las más sensibles, sin embargo, estas son difíciles de estudiar a pesar de su papel crítico (Liu and Whitman 2008). En este caso, el control tuvo una mejor producción de metano que la AME, esto es posible porque el lixiviado tiene una gran variedad de compuestos como metales pesados, nitrógeno amoniacal, hidrocarburos aromáticos policíclicos, fenoles, aldehídos, etc., que disminuyen la capacidad y el potencial del inóculo incluso si se agrega un cosustrato.

A las 96 horas, el control disminuye la producción de metano, pero al día siguiente aumenta, lo que significa que las bacterias no terminaron de adaptarse al lixiviado en este tiempo de experimentación. En cuanto la AHE, es la que tiene una mejor producción de metano, pero sigue baja con respecto a las otras pruebas y la AAE termina al mismo nivel de la AME. En esta prueba se observa que el crecimiento se detiene en todas las actividades incluyendo el control a las 96 horas.

En este inóculo ninguna actividad alcanza los 300 mL de producción de metano, por lo cual podemos inferir que el lixiviado no tiene un buen efecto para este inóculo. La AHE, sin embargo, es la actividad que más tiene crecimiento. Es posible que el lixiviado tuviera muchas moléculas como monosacáridos y aminoácidos, excelente alimento para las bacterias acidogénicas, debido a la diversidad de elementos y compuesto químicos que pueden existir en un lixiviado como este, de una estación de transferencia de residuos sólidos.

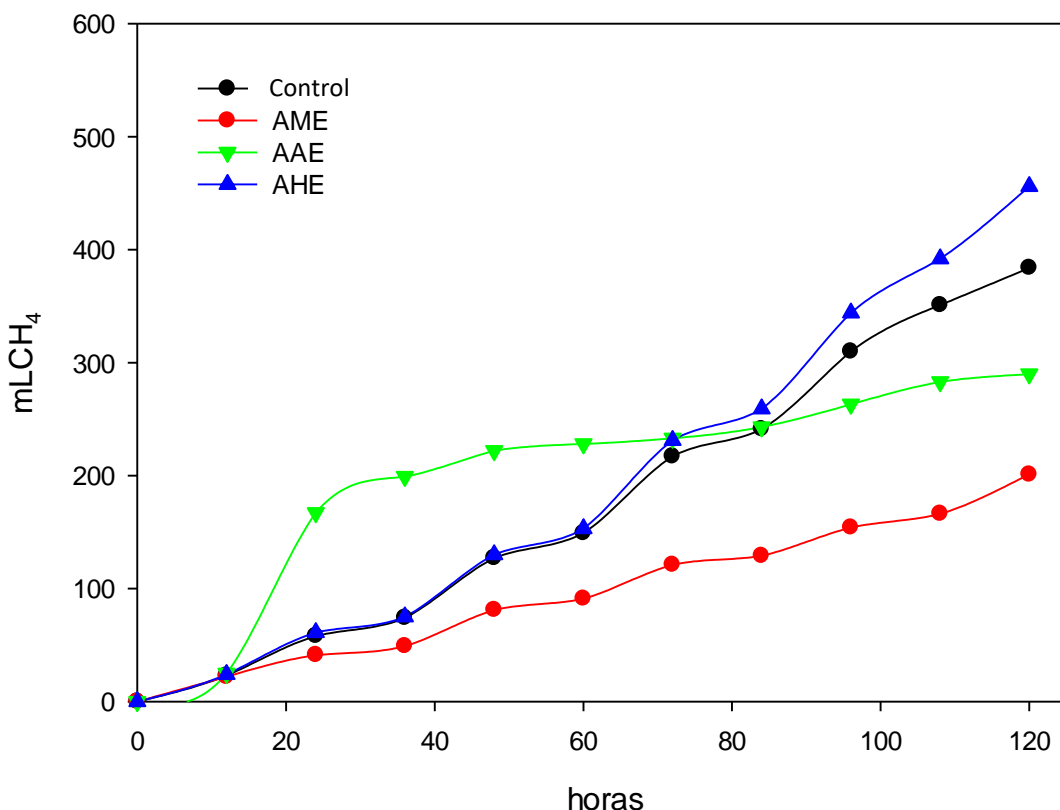
#### 4.2.6 Codigestión de inóculo alimentado con fango mixto + detergente + aceite de motor (Prueba D)

En este punto analizamos los resultados de la codigestión de fango mixto, detergente y aceite de motor que corresponde a la prueba D. En la cual, la DQO degradada tiene un dato similar al control. Esto significa que las bacterias hidrolíticas en el control tenían el mismo comportamiento que la AHE. Es posible que la codigestión de detergente y aceite de motor tenga un buen ambiente para que las bacterias hidrolíticas degraden la carga orgánica como se observa en la figura 30. A continuación se expone la caracterización de los ensayos para esta prueba.

Prueba	Actividad	Parámetros						
		ST d g/L	SV d g/L	pH		DQO d g/L	AGV/ALC	
				inicial	final		Inicial	final
D	AME	0,15	0,26	8,1	8	2,84	1,4	0,95
	AAE	2,87	3,78	8,1	7,1	6,18	0,68	0,79
	AHE	2,35	3,39	8	7,2	8,42	0,72	0,65
	Control	0,59	1,53	7,8	7	9,20	0,64	0,83
	Error	±0,8	±0,7	±0,1	±0,4	±0,8	±0,3	±0,1

**Tabla 21.** Parámetros fisicoquímicos inicial y final. \*degradada

La siguiente es la gráfica que relaciona el metano generado con las actividades específicas para este inóculo.



**Figura 30.** Metano generado por el inóculo alimentado con fano mixto + detergente +aceite.

Esta prueba tuvo 6,1 g/L de DQO degradado en AAE y 3,7 g/L de SV degradado. El pH comenzó alcalino y la relación AGV/ALC comenzó en 0,68 y terminó en el mismo valor. La actividad de las bacterias acidogénicas no fue la mejor porque el aceite del motor y el detergente pueden generar inhibición en estas bacterias.

La AME en esta prueba, tuvo el mismo comportamiento que en la prueba C, y el control tuvo un mejor comportamiento que la AME. Esta prueba se desarrolló en un inóculo con una codigestión de detergente y aceite que no tenía un alto potencial de adaptación y especialización. La bacteria hidrogenotrófica antes del experimento seguramente ya estaban adaptadas a este sustrato y habría más población de estas que del grupo acetoclástico.

Las arquea hidrogenotróficas, se adaptó más rápidamente al jabón y al aceite que el grupo acetatoclástico porque a las 108 horas las bacterias acetoclásticas querían aumentar un poco la producción de metano, pero, aun así, las bacterias hidrogenotróficas estaban más adaptadas. Acerca de este dominio, Alvarado et al. cita que el acetato se considera un precursor importante para la metanogénesis, sin embargo, un número creciente de estudios informa un claro dominio de la hidrogenotrófica sobre la metanogénesis acetoclástica (Alvarado et al.,2014).

En este inóculo, la AHE tuvo un mejor comportamiento que las otras actividades, aunque muy cerca a la del control. La AAE y la AME estuvieron por debajo del control sin superar una producción de 300 mL de metano. Al parecer, este tipo de alimentación no influye positivamente en las metanogénicas y las bacterias acidogénicas, pero si les da un gran impulso a las bacterias hidrolíticas. Esto puede ser posible porque el aceite ofrece una gran cantidad de lípidos en el medio ambiente con los cuales las bacterias hidrolíticas tienen buena porción de fuente de energía y pueden tener un crecimiento mayor que las demás. La degradación de los lípidos en ambientes anaerobios comienza con la ruptura de las grasas por la acción de enzimas hidrolíticas denominadas lipasas produciendo ácidos grasos de cadena larga y glicerol (Ortiz, 2011).

También se observa, que en esta prueba se podría continuar el experimento más tiempo ya que las curvas siguen su crecimiento exponencial, en los cinco días de lectura 8 (120 h). Puede entonces que el crecimiento microbiano este un poco ralentizado por la presencia de tensoactivos que pueden ser inhibidores de los microorganismos anaerobios.

#### 4.2.7 Codigestión de Inóculo +fango deshidratado+ materia seca (Prueba E)

Analizamos los resultados de esta codigestión de materia seca que corresponde a la prueba E. En esta prueba, la DQO degradada fue mayor en el control que en el AHE. Los SV degradados más altos fueron en la AAE, con 5,6 g/L, como se observa en la siguiente tabla

Prueba	Actividad	Parámetros						
		ST d g/L	SV d g/L	pH		DQO d g/L	AGV/ALC	
				inicial	final		Inicial	final
E	AME	2,26	2,68	8,5	8,2	3,57	1,14	0,62
	AAE	5,21	5,60	8,6	8,3	1,30	0,82	0,72
	AHE	3,42	3,08	8,6	8,3	1,40	0,91	1,25
	Control	1,96	1,78	8,6	7,4	2,61	0,83	1,11
	Error	±0,9	±0,7	±0,05	±0,4	±0,8	±0,1	±0,3

Tabla 22. Parámetros fisicoquímicos inicial y final. \*degradada

A continuación, se presenta la gráfica de producción de metano para este inóculo

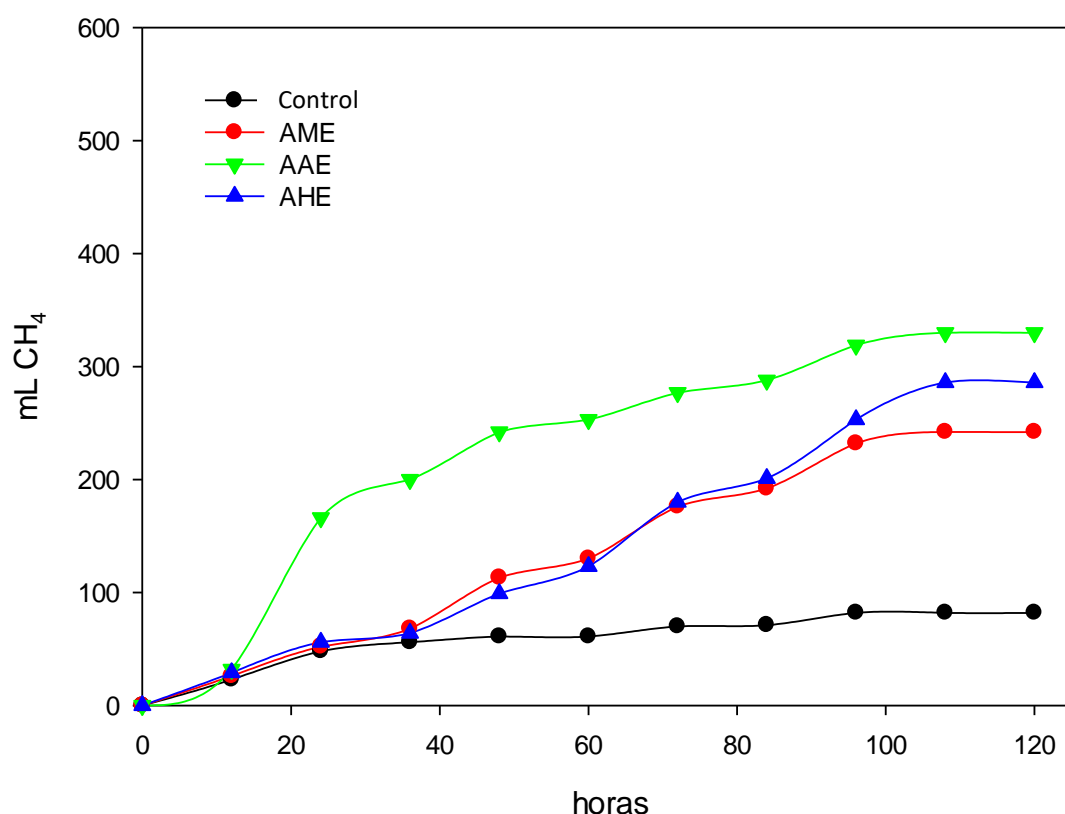


Figura 31. Metano generado por el inóculo +fango deshidratado + materia seca.

Los SV degradados más altos son de la AAE, seguido de la AHE y la AME, lo que concuerda con el resultado de la figura 31. La AAE en este inóculo tiene una actividad sobresaliente, lo que refleja la alta presencia de compuestos y elementos dispuestos para que las acidogénicas logran trabajar y producir AGV.

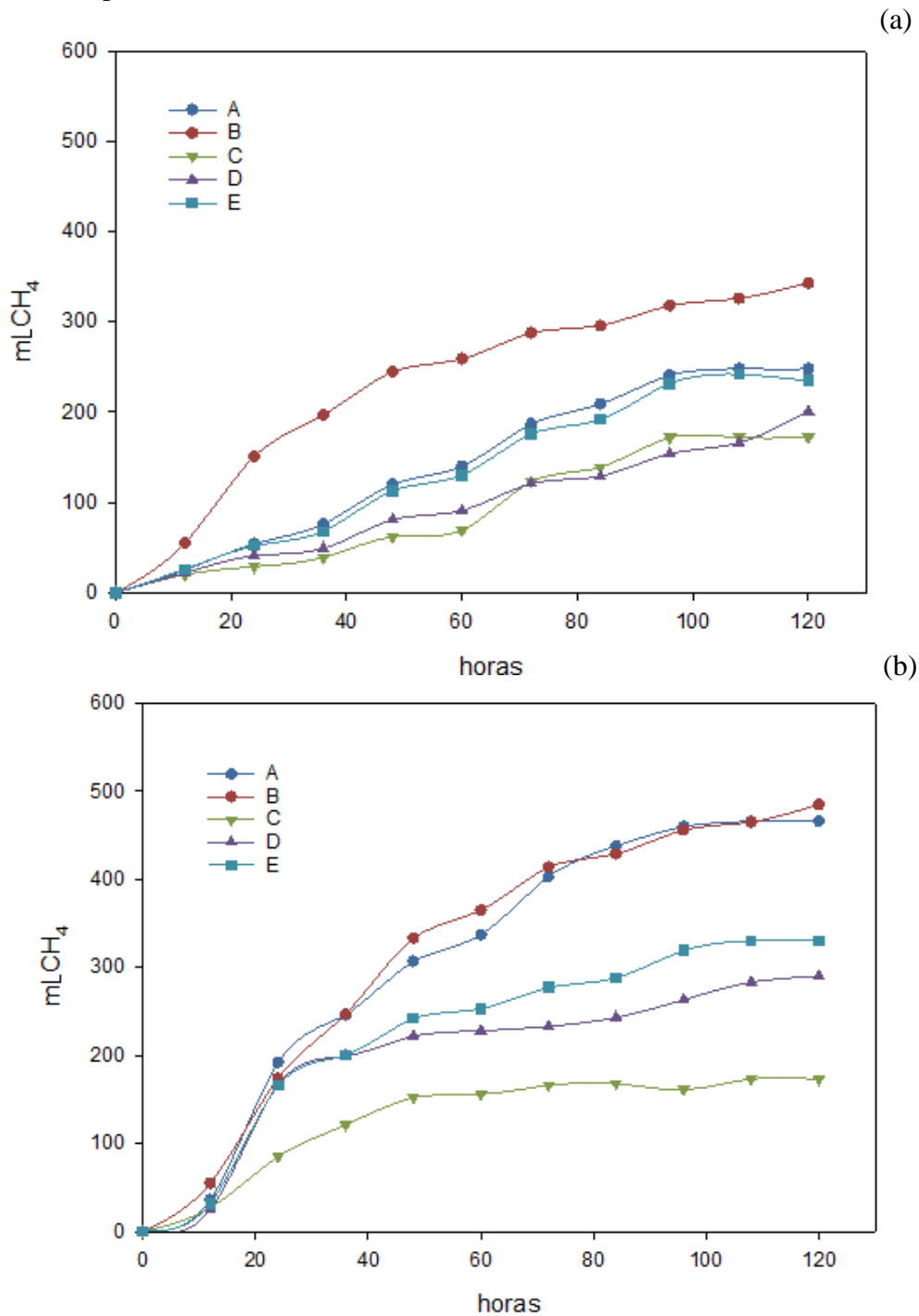
En cuanto la DQO degradada, la AME tuvo el mejor rendimiento, seguido del control. Las otras dos actividades tienen una DQO degradada similar. Esto quiere decir que la DQO degradada no refleja realmente la actividad de los microorganismos, y los SV parece que se correlacionan mejor con el crecimiento y la actividad de estos.

Al inicio del experimento la relación AGV/ALC no estuvo dentro del rango óptimo y tampoco al final, esto confirma la alta presencia de AGV que las metanogénicas no lograron utilizar y por esto la baja producción de metano en comparación con las demás pruebas. Los AGV son tóxicos a pH menor de 7 (Ortiz, 2011).

La AAE fue representativa y muy diferente de las demás. A las 96 horas, las actividades terminaron su crecimiento exponencial. Se esperaba que este inóculo tuviera muy bajo rendimiento, pero si se alimenta con un sustrato del cual se pueda obtener alimento para las metanogénicas que no sea acetato en exceso, los microorganismos podrían tener un gran crecimiento exponencial. Los resultados de DQO y SV corroboraron que la AME tenía un mejor comportamiento que el control, el cual intentó aumentar la producción de metano a las 96 horas, pero no por más tiempo.

#### 4.2.8 Comparación por Actividades específicas

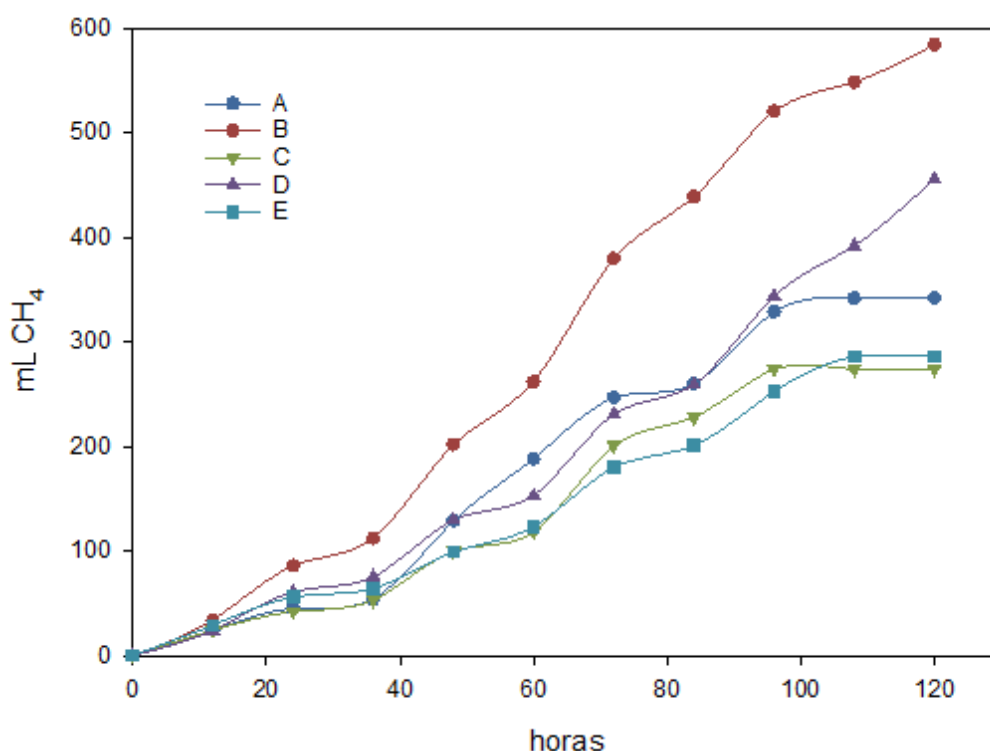
Es importante comparar las pruebas realizadas en el experimento desde el punto de vista de las actividades específicas para observar el inóculo con mejor potencial de todos. Para todas las actividades, la prueba B tuvo un mejor comportamiento que las otras pruebas como se puede ver en la figura 32, por lo que podemos probar que el inóculo decantado tenía la mejor cantidad de consorcios microbiológicos. A continuación, se pueden ver las gráficas de la AHE y la AAE para todas las actividades.



**Figura 32.** Metano generado para todas las pruebas. (a) AHE (b) AAE. Prueba A: Inoculo alimentado con fango mixto. Prueba B: Inoculo alimentado con fango mixto decantado. Prueba C: inóculo + lixiviados. Prueba D: Inóculo + detergente + aceite. Prueba E: codigestión de Fango deshidratado + materia seca.

El peor comportamiento de estos fangos fue la prueba C. Solo en la AHE, las bacterias hidrolíticas aumentaron su población, pero tal vez, los lixiviados inhibieron el metabolismo de las metanogénicas y acidogénicas, disminuyendo el crecimiento en los primeros 3 días. La prueba D y E tuvieron un comportamiento intermedio, la prueba D solo tiene una buena producción de metano en La AHE y existe bastante alimento para las bacterias hidrolíticas que provienen del detergente y el aceite del motor.

Por otro lado, la prueba E tuvo una mejor producción de metano en la AAE como se aprecia en la figura 32. Además, en toda la prueba, AHE y AAE tuvieron más producción de biogás que la AME y el control. Esto sucede porque la relación inicial de AGV/ALC de AHE y AAE estaba muy cerca del valor recomendado, 0,3-0,4. Por otro lado, la AME tenía una relación alta, por lo que el ambiente inicial en esta actividad era ácido como se aprecia en a la siguiente figura.



**Figura 33.** Metano generado de todas las pruebas para la AME. Prueba A: Inoculo alimentado con fango mixto. Prueba B: Inoculo decantado. Prueba C: inóculo + lixiviados. Prueba D: Inóculo + detergente + aceite. Prueba E: codigestión de Fango deshidratado + materia seca.

Es necesario tener un buen inóculo para degradar rápidamente la carga orgánica, por lo que es una buena idea realizar la decantación previa. La segunda prueba con más producción de biogás fue la prueba A, la cual tenía un valor representativo de la AAE y la AME. En la AHE, la prueba A tuvo el tercer mejor comportamiento, significa que tenía un gran grupo de bacterias acidogénicas trabajando para producir ácidos, pero las bacterias hidrolíticas no funcionaron eficientemente.

En la prueba A y E, el control produjo más metano que la AME, esto es posible porque hay más bacterias hidrogenotróficas que acetoclásticas. Debe tenerse en cuenta que la tasa metanogénica suele ser inferior a la hidrolítica o acidogénica, especialmente cuando se consideran sustratos solubles (Soto et al., 1993).



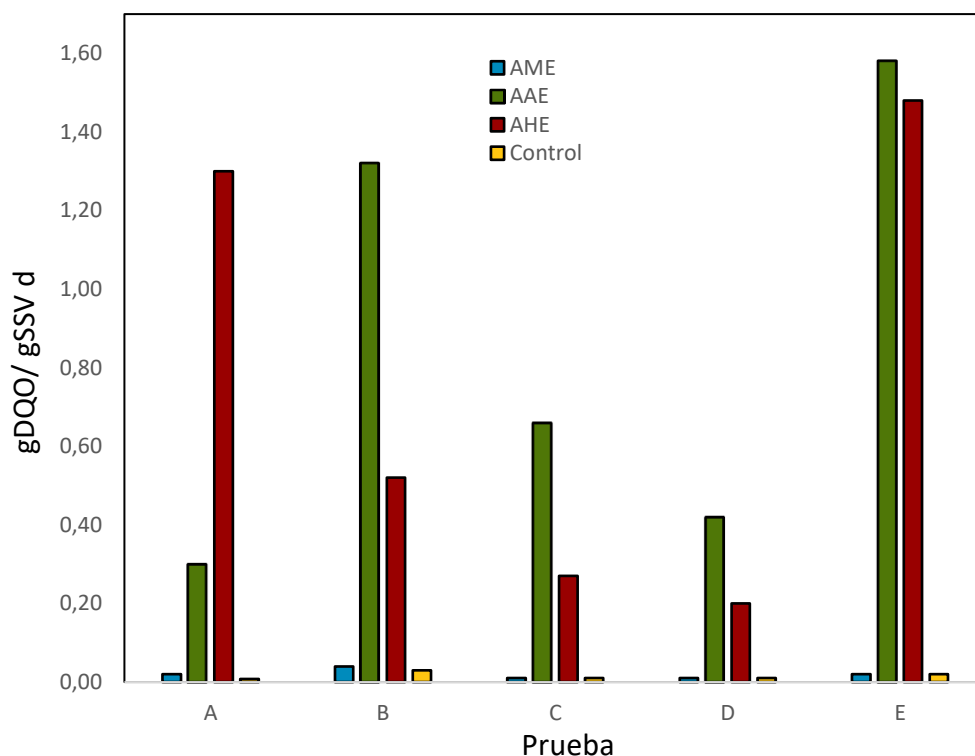
#### 4.2.9 Cálculo de actividades específicas

Se calcularon los valores de las actividades específicas. La Tabla 23 muestra que la prueba C tenía valores altos en la AAE y AHE, como podría verse en la producción de biogás. La prueba E tiene valores más bajos porque es la prueba en la que el AHE tuvo una producción de biogás más baja y en general un peor rendimiento. El control obtuvo valores bajos casi en todas las pruebas. Podemos ver también que la prueba A tiene valores más bajos que las otras pruebas, excepto con el inóculo en inhibición. Además, vemos que el valor de AAE y AHE en todas las pruebas fue mayor que la AME.

Prueba	AME	AAE	AHE	Control
A	0,03	0,09	0,15	0,01
B	0,02	0,34	0,30	0,02
C	0,03	0,59	0,47	0,05
D	0,02	0,31	0,42	0,04
E	0,03	0,07	0,07	0,01

**Tabla 23.** Cálculo actividades específicas. AME en g DQO<sub>CH4</sub>/g SSV\*d. AAE y AHE en g DQO/g SSV\*d para cada prueba.

Los valores obtenidos en la investigación son similares a otros experimentos. Por ejemplo, Batstone ha encontrado, que los métodos de deshidratación, la actividad metanogénica específica de todas las muestras estuvo en el rango esperado de 0,2–0,4 g DQO CH<sub>4</sub>/g SSV\*d (Batstone D, 2015). En la figura 34 se expone la gráfica del cálculo de las actividades específicas.



**Figura 34.** Valor de las actividades específicas y el control por cada prueba. Prueba A: Inoculo alimentado con fango mixto. Prueba B: Inoculo alimentado con fango mixto decantado. Prueba C: inóculo + lixiviados. Prueba D: Inóculo + detergente + aceite. Prueba E: codigestión de Fango deshidratado + materia seca.

Con base a esta gráfica, podemos argumentar que es posible ajustar las mezclas de sustratos en codigestión, realizando una compensación al adicionar un cosustrato rico en AHE a otro que no. Por ejemplo, en este caso al inóculo de la prueba D se puede agregar inóculo de la prueba E para aumentar su actividad acidogénica e hidrolítica.

#### 4.2.10 Resultados ADN

Para saber la cantidad de material genético total contenido en los inóculos estudiados, se realizó la extracción de ADN para cada prueba. En la siguiente tabla se pueden ver los resultados, en la cual se refleja la concentración de ADN y la relación entre las longitudes de onda 260/280, la cual nos muestra la pureza de la muestra y la cual debe estar por encima de 1,8.

Se realizó una medición inicial y otra final para observar el comportamiento de la biomasa que se encuentra en cada inóculo estudiado. Cabe resaltar que este dato refleja todos los microorganismos que se encuentran en el inóculo, incluyendo bacterias, archea, hongos, que en su conjunto son responsables de la digestión anaerobia. Por ejemplo, Gruninger et al., ha reportado hongos anaerobios presentes en la generación de biogás. Los hongos anaerobios, son muy bien conocidos en el rumen de los herbívoros, donde son unos de los actores principales en la degradación de la lignocelulosa (Gruninger et al., 2014).

Pruebas	ADN inicial µg/mL	260/280	ADN final µg/mL	260/280
A	12	1.8	28.26	1.86
B	14	1.85	15.81	1.95
C	20.6	1.8	26.09	1.97
D	5.8	2	7.52	2
E	16	2	21.3	1.93

**Tabla 24.** ADN inicial y final para todas las pruebas Prueba A: Inoculo alimentado con fango mixto. Prueba B: Inoculo alimentado con fango mixto decantado. Prueba C: inóculo + lixiviados. Prueba D: Inóculo + detergente + aceite. Prueba E: codigestión de Fango deshidratado + materia seca.

De los resultados se puede observar que en todas las pruebas no hubo un incremento significativo de ADN luego de finalizar el experimento. Al contrario de otras investigaciones donde el incremento estándar con diferentes sepas microbianas dio como resultado una tasa de recuperación de ADN de más del 90% (Garcés et al., 2005).

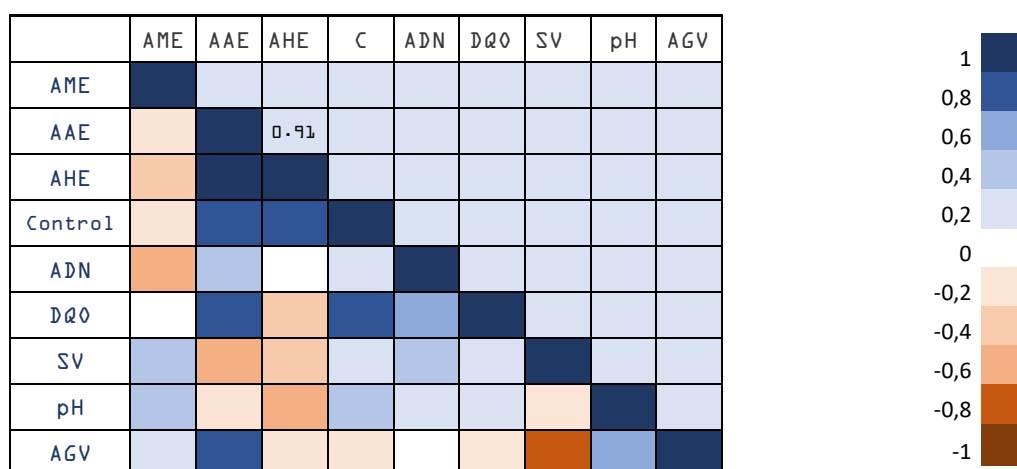
Para aplicar este método en planta se debe tener en cuenta que la presencia de impurezas puede ser determinante en la medición que se hace. Por consiguiente, si la purificación de muestra está mal hecha, la pureza de la muestra difícilmente puede estar en el rango óptimo entre 1,8 y 2. La extracción de ADN de muestras de lodo en digestores anaerobios rara vez se ha estudiado u optimizado, por lo que faltan métodos estandarizados. Sin embargo, hay una serie de ventajas y desventajas para cada una de las opciones disponibles y deben tenerse en cuenta antes de elegir una técnica en particular (Dong et al., 2013).

Estos resultados muestran una gran oportunidad en la medida que el ADN se puedan correlacionar con otras variables como los parámetros fisicoquímicos, por ejemplo, con la carga orgánica en términos de SV que es donde se encuentran los aglomerados de microorganismos que realizan sintrofia en el inóculo y hacen posible la digestión anaerobia.

#### 4.2.11 Análisis estadístico

Luego de realizar los ensayos de las actividades específicas y el ADN, se tenía varias variables que podían correlacionarse entre ellas. En esta investigación, se realizó el análisis químico, midiendo el pH, la DQO, la relación AGV/ALC, los SV y la extracción de ADN. La correlación entre estas variables se determinó mediante el análisis de correlación de Pearson, con la cual podemos ver si las variables se relacionan entre sí. Esta herramienta permitió identificar las variables más importantes en cada actividad específica y comprender qué variables son representativas cuando se utiliza los bioindicadores. Existen varios investigadores que han correlacionado bioindicadores con los parámetros operativos, la composición de la alimentación y la búsqueda de nuevas especies de bacterias (Chiva, 2018).

A continuación, se expone el mapa de correlaciones para todas las actividades.



**Figura 35.** Mapa de correlación de todas las actividades específicas.

El primer mapa que se aprecia en la figura 35, muestra las correlaciones de la AME con los análisis fisicoquímicos, la extracción de ADN y las actividades específicas. Se puede ver que las AHE se correlaciona de manera muy positiva con la AAE a un nivel de significancia de 0,01. Por otro lado, se observa una correlación negativa entre la AHE y los fisicoquímicos, es decir que cuando suben los datos fisicoquímicos baja esta actividad.

Existe una correlación negativa entre los SV y la relación AGV/ALC. Es decir que cuando sube la cantidad de AGV disminuyen los SV que son donde habitan los conglomerados microbianos. Gómez et al, encuentra que la dinámica de las bacterias metanogénicas se ve más afectada por la concentración de AGV que, por la adición de cosustratos (Gómez et al. 2014).

La AME tiene una correlación negativa con las otras actividades específicas y el ADN. Esto quiere decir que cuando sube la AME baja levemente las otras dos actividades. También se puede interpretar que cuando la AME baja el ADN tiene un ligero incremento.

A continuación, se observa el mapa de correlaciones de la AAE para todas las pruebas

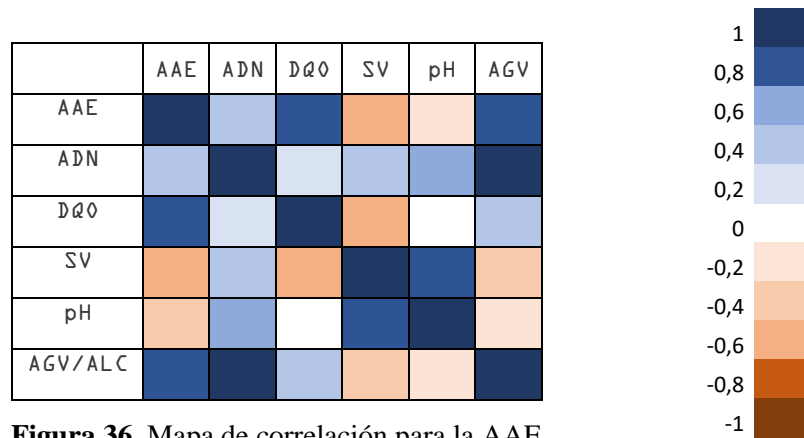


Figura 36. Mapa de correlación para la AAE.

En la figura 36, se puede ver que la AAE tiene una correlación positiva con casi todos los parámetros menos con los SV y el pH. Existe una correlación muy positiva entre el ADN y los AGV. Es decir que cuando los AGV aumenta el ADN aumenta. Algunas investigaciones recientes que utilizan herramientas moleculares han correlacionado con éxito el rendimiento del digestor con el contenido genético, incluida la producción de metano y la degradación de ácidos grasos y parámetros operativos como la temperatura y la concentración de amoníaco (De Vrieze et al., 2015).

En la siguiente figura se puede observar el mapa de correlación para la AHE, los parámetros fisicoquímicos y el ADN.

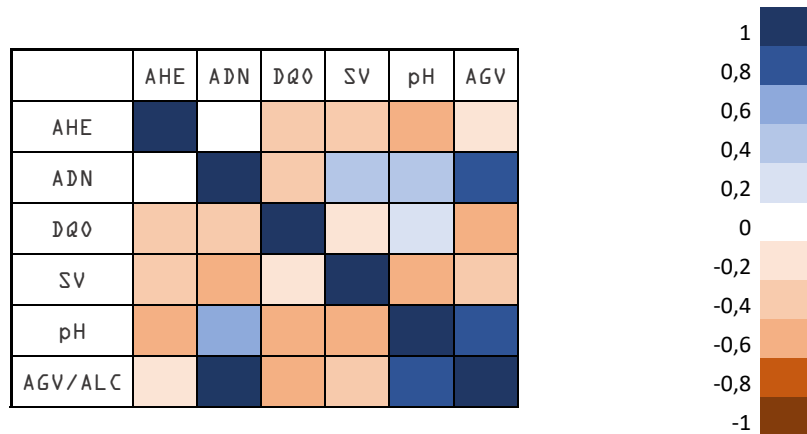
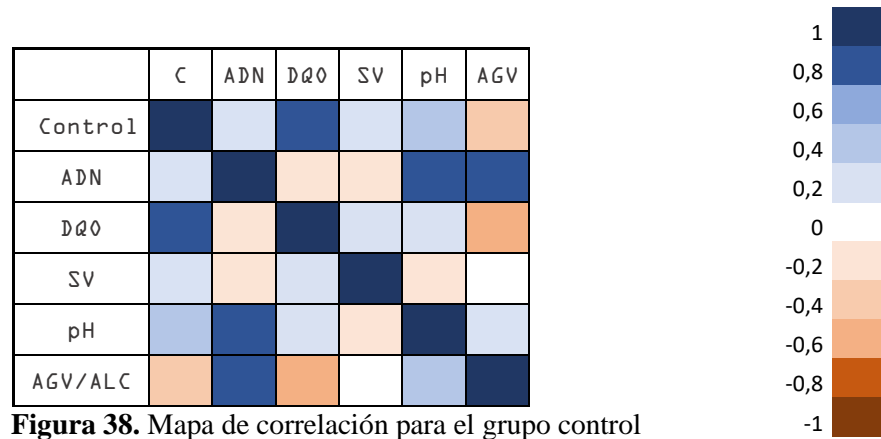


Figura 37. Mapa de correlación para la AHE.

El ADN tiene una fuerte correlación positiva con los AGV. Es decir que cuando sube los AGV, la cantidad de ADN presente en el inóculo aumenta. Estos resultados van en concordancia con Guilherme, quien descubrió que la comunidad de microbiología se correlacionaba con el aumento de la acumulación de AGV y la disminución del pH (Guilherme et al., 2019). También existe una correlación negativa entre el AHE y los fisicoquímicos, es decir que esta actividad es propensa a disminuir si estos parámetros bajan también.

Es interesante que la AHE tienen una correlación negativa con el pH. Esto quiere decir que cuando el pH baja la presencia de estas bacterias aumenta. En otros estudios como el de Na Duan et al, una bacteria productora de hidrógeno tuvo una muy negativa correlación con el pH (Na Duan et al., 2020).

A continuación, se observa el mapa de correlación del comportamiento de los blancos utilizados en esta fase de la investigación.



**Figura 38.** Mapa de correlación para el grupo control

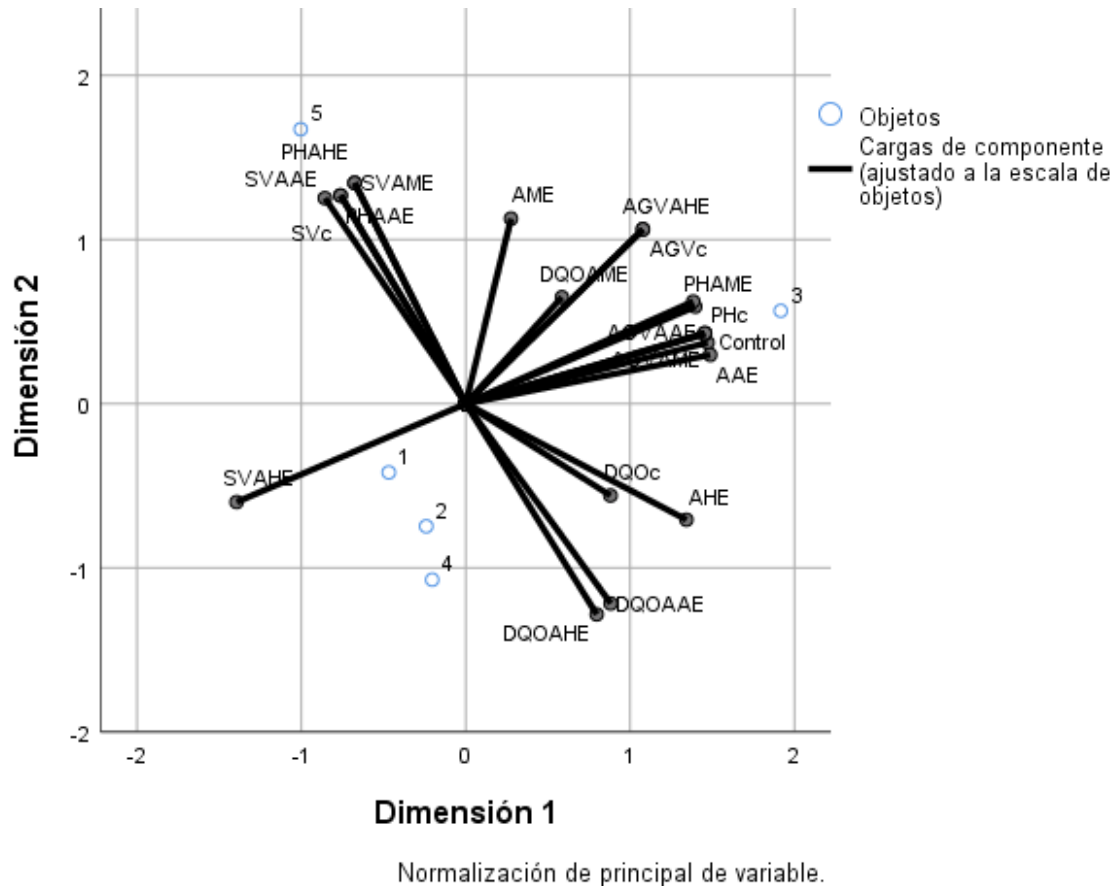
Se ha observado que las muestras que sirvieron de blanco tienen una correlación positiva con todas las variables menos con los AGV, aunque es una leve correlación negativa. Existe una fuerte correlación positiva entre el ADN y el pH.

Existe una correlación negativa moderada entre los AGV y la DQO, es decir que cuando son muchos los AGV, baja la DQO, esto es así ya que la acumulación de AGV no es buena para la remoción de carga orgánica. Resalta la correlación positiva entre el ADN, el pH y los AGV. Es decir que si los AGV se mantienen en un aumento moderado la abundancia relativa microbiana puede aumentar.

Estas correlaciones son herramientas útiles para entender las relaciones entre las variables involucradas en la digestión anaerobia. Se han realizado esfuerzos y avances para correlacionar las poblaciones bacterianas y arquea y sus funciones con los parámetros del proceso de la digestión anaerobia (Venkiteshwaran et al., 2015). Muchos estudios recientes han investigado las correlaciones entre la composición microbiana y el rendimiento del digestor en términos de estructura de la comunidad microbiana, abundancia relativa y actividad, y vías de degradación.

#### 4.2.12 Análisis de componentes principales

En la figura 39 se puede observar el análisis por componentes que se realizó de todas las variables involucradas en esta etapa de la investigación.



**Figura 39.** Diagrama de dispersión biespacial para el reactor RM y el reactor AD:

Esta herramienta nos permite analizar bastantes variables en grupos más pequeños, también llamados componentes, para analizar de mejor forma las variables estudiadas.

Podemos inferir de la figura 39, que las actividades específicas están próximas al valor 1 de la dimensión o componente 1. Así mismo, la DQO y los AGV tienen la misma tendencia. Con lo cual, el componente uno describe la relación entre estas tres variables que indica el riesgo por la presencia de ácidos en los inóculos y su efecto en la reducción de la degradación de la materia orgánica.

Por otro lado, podemos observar que en la dimensión 2 se observan variables cercanas al 1 como: pH y SV. Esto puede significar, que el componente 1 describe la degradación de la materia orgánica en términos de SV y su efecto en cada actividad específica.

#### **4.2.13 Discusión**

Las Actividades específicas se relacionan entre sí de una forma negativa, es decir que cuando sube una de ellas, las demás bajan. Esto es posible que ocurra, ya que un aumento en la actividad hidrolítica puede generar decrecimiento en las acidogénicas, si el crecimiento es desmedido. Lo mismo puede ocurrir con las acidogénicas que pueden producir muchos más AGV de los que las metanogénicas pueden digerir. Las altas cargas orgánicas aumentan los AGV lo que genera una disminución de la capacidad de las metanogénicas por el decrecimiento del pH.

Observando los análisis fisicoquímicos, el cálculo de las actividades específicas y las curvas de las actividades específicas, se pueden clasificar los inóculos de acuerdo con su actividad de la siguiente manera: B, A, C, E, D. Esto significa que los inóculos A, B, C tuvieron mejor actividad y comportamiento. En oposición, las pruebas D y E tienen un riesgo de inhibición y el equipo sugeriría tomar contingencias para mejorar la actividad microbiana.

En este orden de ideas, se puede inferir que el inóculo A tiene una alta actividad acidogénica, una actividad hidrolítica media y una baja actividad metanogénica. En este caso se podría decir que la fase limitante es la metanogénica y se debería tomar medidas como el cambio de alimentación que favorezca las metanogénicas. Varios estudios recientes han investigado las correlaciones entre la composición microbiana y el rendimiento del digestor en términos de estructura de la comunidad microbiana, diversidad y actividad, y vías de degradación (Carballa, 2015).

En el inóculo B, tiene una alta actividad hidrolítica, una media actividad acidogénica y una baja actividad metanogénica. En este caso, la actividad limitante es la metanogénica y se diría que se debe cambiar la alimentación para favorecer el crecimiento de estos microorganismos. La decantación como pretratamiento nos asegura más conglomerados microbianos, pero no que haya más metanogénicas.

En el inóculo C, se ha encontrado una actividad hidrolítica alta, y una actividad acidogénica y metanogénica similares que fueron sobrepasadas por la actividad del control. Se observa en este inóculo que los lixiviados aumentan la AHE, pero limita la AAE y la AME. Por lo cual, si el control presenta mejor actividad no es necesario cambiar de alimentación ya que este por si solo es eficiente.

Para el inóculo D, se puede inferir que tiene una actividad hidrolítica alta, una actividad acidogénica media y una actividad metanogénica baja. Estas dos últimas están por debajo del control. La codigestión de aceite y detergente en este inóculo incrementan la actividad hidrolítica por la presencia de compuesto complejos. Se podría sugerir adicionar una alimentación que favorezca el consorcio metanogénico. En el inóculo E, existe una alta actividad acidogénica, una media actividad hidrolítica y una baja actividad metanogénica. Esto se debe a que esta muestra fue tomada de un inóculo que estaba produciendo muy poco biogás, alrededor de 700 mL/día, con lo cual su AME antes del ensayo ya estaba muy baja.

### **4.3 Análisis de digestores anaerobios termófilos y mesófilo mediante las actividades específicas, ADN, y qPCR.**

Esta parte de la investigación se llevó a cabo en el instituto de investigación y tecnología agroalimentaria (IRTA). El objetivo principal de este experimento fue realizar la especialización de bacterias y Archea para el posterior análisis genético. Para esto se utilizaron las actividades específicas, los ácidos nucleicos y la qPCR. Se tomaron muestras de dos reactores anaerobios en régimen termófilo, uno de ellos era un reactor en fase metanogénica y el otro un reactor donde se realizan todas las fases. La tercera muestra fue tomada de un reactor de régimen mesófilo.

A diferencia de los capítulos anteriores en el cual se quería predecir el comportamiento de un inóculo adicionando un sustrato específico, en este capítulo, se quería realizar la especialización de microorganismos antes de que el crecimiento exponencial de las actividades específicas llegara a estabilizarse. Esta prueba estaba dentro del proyecto Pioner liderado por el IRTA, en el cual se quería observar el comportamiento de estos digestores en rango termófilo y definir la capacidad de respuesta a sobre cargas y su evolución ante estos casos. A continuación se explican los resultados encontrados.

#### **4.3.1 Características del ensayo**

Las actividades específicas se llevaron a cabo en viales de 100 mL, los cuales se llenaban hasta 80 mL para dejar una cabeza de biogás de 20 mL. Es importante recalcar que en estas pruebas el procedimiento se realizó por peso y no por volumen, es decir que cuando se llenaban los botes, se pesaban antes de llenar el vial. Como buffer se utilizó sales de fosfato  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . En estos ensayos se utilizó para la AHE peptona caseína o llamada también triptófano, para la AAE se utilizó glucosa y para la AME se utilizó acetato de sodio.

Los inóculos utilizados en estas pruebas fueron tomados de un reactor anaerobio de mezcla completa llamado reactor AD, el otro se obtuvo de un reactor metanogénico llamado RM, los dos en rango termófilo y el tercero de un reactor de fango mixto, en régimen mesófilo  $35^\circ\text{C}$ . Ninguno de estas muestras tenía algún pretratamiento, pero el AD se alimentaba con una mezcla de sustratos como se explica en el apartado de materiales y métodos.

Es importante aclarar, que la medición de metano para el RM y el AD se realizó por más de 40 días, debido a que el incremento de las poblaciones microbianas para la AME y la AHE no se generaron al mismo tiempo que la del AAE.

Cabe señalar que solo se aplicaron los ensayos genéticos especializados (ARNr 16S, *mcrA* y *aprA*) a las muestras de ADN que se consideró representativas. Por ejemplo, el inóculo del FM tuvo valores de más de  $300 \text{ ng}/\mu\text{L}$  y el RM en algunas actividades no superó valores de  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Es por este motivo que solo se tuvo en cuenta la muestra de la AAE del reactor RM y AD para utilizarla en la qPCR. Esto es debido a que no vale la pena gastar materiales e insumos en muestras que no nos van a arrojar datos representativos de la abundancia relativa y actividad de los microorganismos.



### 4.3.2 Caracterización de los inóculos.

Como en los experimentos anteriores se realizó la caracterización de los tres reactores, en este caso de los reactores RM, AD y FM. Se analizó el pH, los sólidos volátiles, la DQO y los AGV como se aprecia en la siguiente tabla.

Reactor	Actividad	Parámetros			
		pH	SV g/L	DQO g/L	AGV
RM	AHE	8	14,2	37,2	32110
	AAE	8	15,3	39,2	45447
	AME	8	15,2	39,7	54389
	Control	8,1	13,3	34,6	41893
	Error	±0,05	±0,9	±0,9	±9213
AD	AHE	7,7	5,2	21,3	2326
	AAE	7,7	5,7	23,3	3750
	AME	7,7	5,9	23,9	6265
	Control	7,7	4,6	18,7	1289
	Error	±0	±0,5	±1	±2155
FM	AHE	7,3	24,8	39,5	949
	AAE	7,4	24,9	39,7	4440
	AME	7,4	25,6	40,8	5512
	Control	7,5	23,1	36,7	1303
	Error	±0,08	±1	±0,8	±2270

**Tabla 25.** Caracterización de los inóculos de cada reactor. Reactor metanogénico (RM), Reactor AD, reactor FM.

Se puede ver que el reactor RM y FM tiene la mayor DQO que el inóculo del AD. Los datos de la DQO no varían mucho, solo la de los controles de cada uno de estos se mantiene por debajo de las DQO de las actividades.

El pH para las tres muestras es alcalino, aunque el del RM estaba en 8. Se puede observar como para un reactor metanogénico el pH tiende a estar por encima de 8, con lo cual se puede deducir que en regímenes termófilos para metanogénicas un pH de estas características favorece el crecimiento de las metanogénicas.

Los AGV iniciales del RM son bastante altos en comparación con el inóculo del AD y el FM. La diferencia es que el RM se alimenta de lo que sale de un reactor hidrolítico en el cual ya todo el material complejo se entrega listo para que las bacterias acetogénicas produzcan ácidos en mayor proporción, además de los ácidos de cadena larga generados en la hidrólisis.

Se puede observar en la tabla 25, que el FM tiene una gran presencia de SV mucho más que el AD y que el RM. Esto indica que hay una gran cantidad de consorcios microbianos en el inóculo, con esto se podría deducir un gran microbiota, pero aún no su actividad.

### 4.3.3 Inóculo reactor Metanogénico (RM)

Como se ha explicado antes, este inóculo fue obtenido de un reactor metanogénico en régimen termofílico (55°C), utilizado solo para la fase metanogénica. Como vemos en la siguiente gráfica la AHE fue la que tuvo mejor comportamiento con respecto a las otras actividades. En este inóculo se realizaron dos alimentaciones, una en el tiempo cero y la segunda solo en la AAE ya que era la que tenía la curva más representativa. Por esta segunda alimentación vemos como la curva tiene un segundo crecimiento exponencial hasta el día 24. La medición de biogás y CO<sub>2</sub> se realizó durante 42 días. A continuación, se expone los datos fisicoquímicos del reactor RM.

RM						
Parámetros		AHE	AAE	AME	Control	Error
pH	Inicial	8	8	8	8,1	±0,05
	Final	7,3	6,7	7,4	7,4	±0,3
SV	Inicial	14,2	15,3	15,2	13,3	±0,9
	Final	13,4	5,43	12,77	12,15	±0,8
	Degradada	0,8	9,87	2,43	1,15	±1
DQO	Inicial	37,2	39,2	39,7	34,6	±1
	Final	36,3	14,7	34,6	32,9	±0,8
	Degradada	0,9	24,5	5,1	1,7	±0,9
AGV	Inicial	32110	45447	54389	41893	±1524
	Final	65657	92928	111211	85660	±2535

Tabla 26. Parámetros fisicoquímicos inicial, final y degradados para el inóculo del RM.

En la figura 40, se puede observar el comportamiento del metano para este inóculo

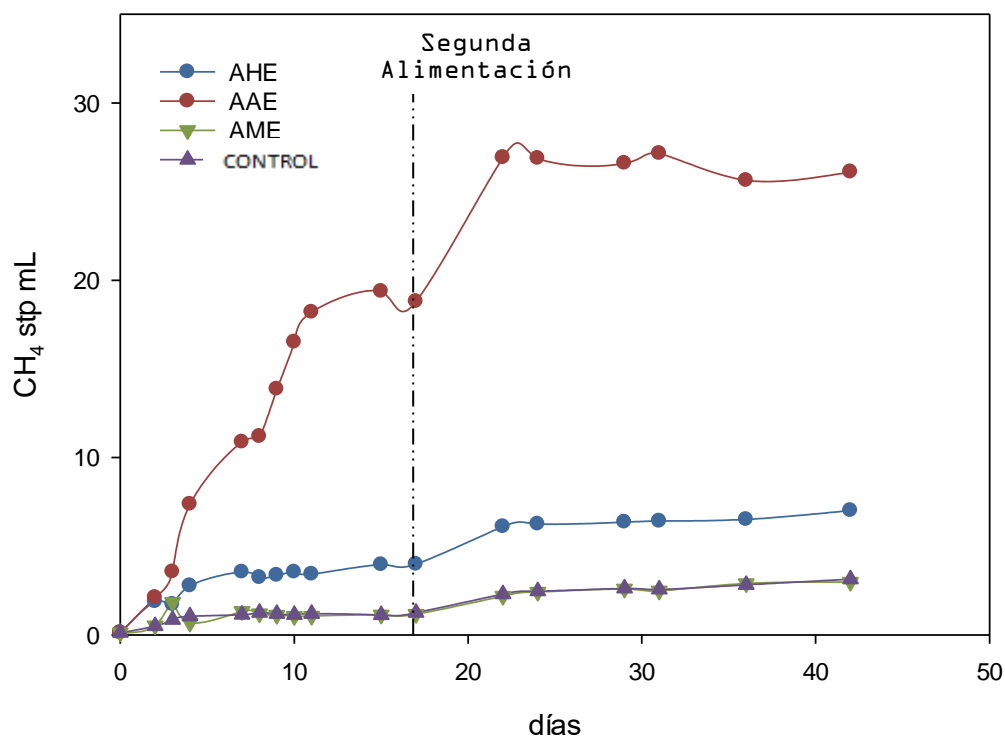


Figura 40. Producción de metano para cada actividad específica en reactor metanogénico

El crecimiento exponencial en la AAE se puede corroborar con la DQO degradada, la cual es de 21,15 g/L con una producción de AGV alta y unos SV degradados de 8 g/L. En comparación, las otras actividades y el control tuvieron porcentajes de DQO y SV degradados mucho más bajas. La toma de muestra para los ensayos microbiológicos se tomó cuando la curva del AAE estaba ligeramente plana, el día 30 del ensayo.

La AHE por su parte tuvo el segundo mejor comportamiento, pero con una curva que no es representativa que no llegó a 100 mL de metano. La AME y el control tienen un comportamiento similar esto debido principalmente a que en el control predominaban las archaea hidrogenotróficas, ya que la adición de acetato tuvo muy poco efecto en esta actividad. Podemos decir que este inóculo tiene una gran AAE, la cual genera bastantes AGV, quizás demasiado para las metanogénicas lo que generaba un ambiente más ácido que se puede corroborar con la bajada del pH de 8 a 6,7 en la AAE. Como cita Cabrera, esta acumulación de AGV es debida a que las bacterias metanogénicas no son capaces de degradarlos tan rápido como son producidos por las bacterias acidogénicas (Cabrera, 2002).

En cuanto al CO<sub>2</sub> vemos que la AAE tiene una gran producción como se aprecia en la figura 41. El CO<sub>2</sub> generado en esta actividad es utilizado por la metanogénicas hidrogenotróficas, permitiendo disminuir el CO<sub>2</sub> y la presión de H<sub>2</sub> (Ferry,1992). La AHE por su parte tiene una baja producción de CO<sub>2</sub> ya que en esta etapa no se genera mucho CO<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> de la AME y el control tienen un comportamiento similar al de la gráfica anterior.

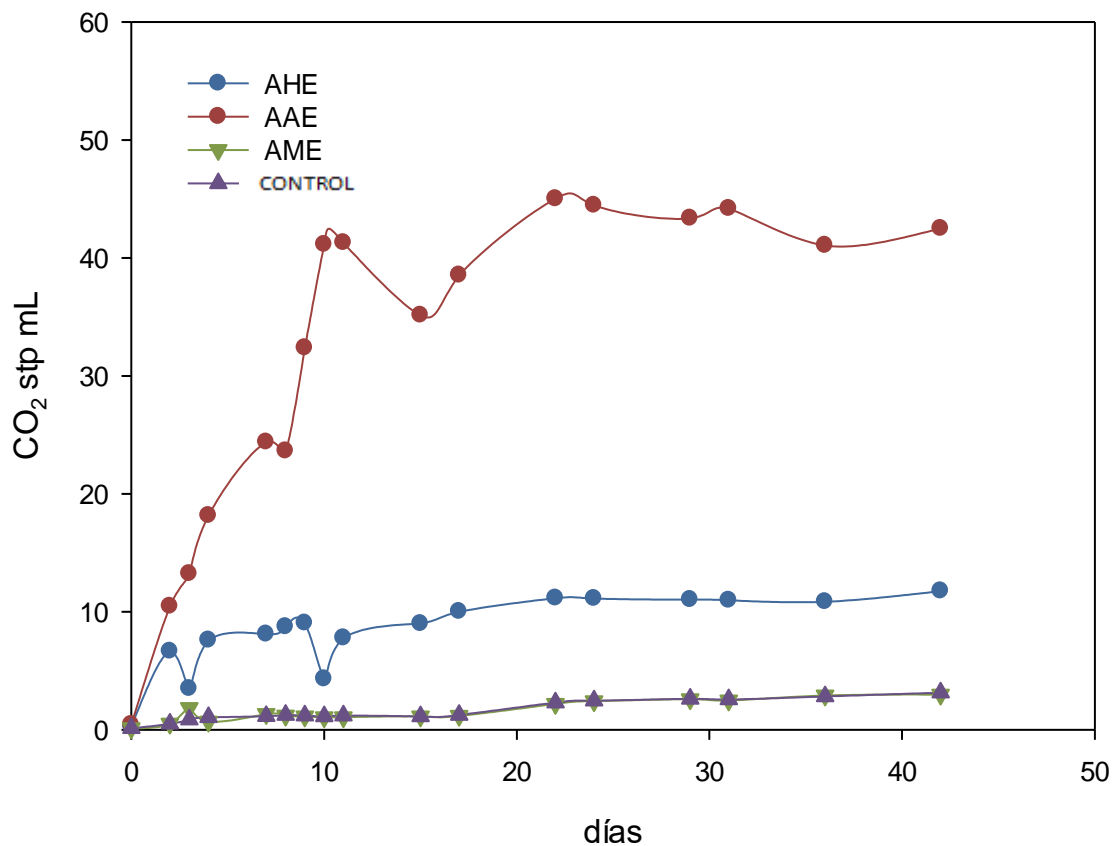
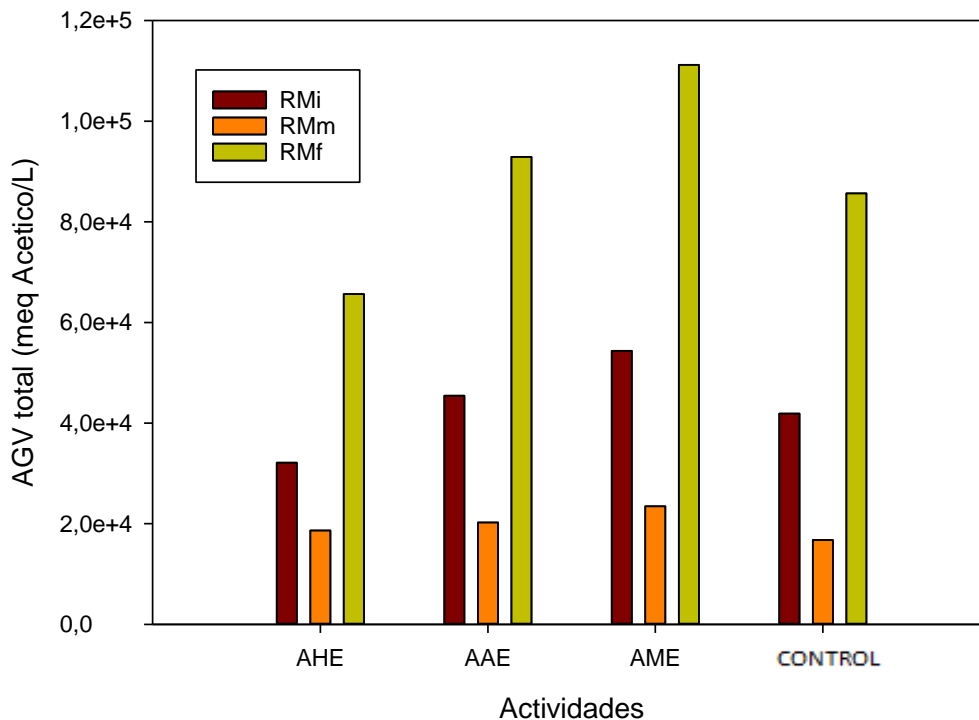


Figura 41. Producción de CO<sub>2</sub> en RM por cada actividad específica y el control

Se logra observar en la siguiente gráfica, como los AGV para todas las actividades se incrementa al final del ensayo, pero en una medición intermedia que se realizó, bajan considerablemente.



**Figura 42.** Concentración de AGV en el transcurso de la prueba para reactor RM. RM i: inicial, RM m: a la mitad, RM f: al final del ensayo.

Esta medición intermedia se realizó el día 16 del ensayo, y se puede corroborar con las gráficas anteriores de metano y CO<sub>2</sub>, las cuales, tienen un decrecimiento ese día, esto se ve reflejado en la curva del AAE que fue la que tuvo mejor comportamiento.

Vemos también que el mayor incremento de AGV la tiene la AME, pero si se analiza la producción de metano, la AME no tiene una gran producción, esto quiere decir que predominan en este inóculo las archaea hidrogenotróficas a las acetoclásticas. Como sugiere Schünner, este dominio de los metanógenos hidrogenotróficos sugiere que el hidrógeno y/o el formiato está disponible en grandes cantidades en algunos tipos de biodigestores y es el principal sustrato metanogénico, en lugar del acetato. La abundancia de hidrogenotróficos en relación con los metanógenos acetoclásticos aumenta típicamente a temperaturas de proceso elevadas y niveles de compuestos, tales como altos niveles de amoníaco, causando una inhibición selectiva de los metanógenos que utilizan acetato. (Schünner, 2016).

Como este inóculo era de un reactor metanogénico, es decir, donde solo se realizaba esta fase de la digestión anaerobia, la concentración de AGV era más alta que el reactor AD teniendo el mismo inóculo, pero diferente alimentación. Al parecer la abundancia de AGV al final del ensayo, se debe principalmente a la alimentación que es el efluente de un reactor hidrolítico, el cual entrega moléculas fáciles de transformar por las bacterias hidrolíticas. Las metanogénicas en la AME debido a la abundancia de AGV se ralentizaron su metabolismo.

### 4.3.4 Inóculo Reactor AD + agua residual de Matadero

Este inóculo tiene una menor carga orgánica que el anterior, con un promedio de 20 g/L de DQO para el AD y 36 g/L para el RM. Esto puede explicar la baja producción de metano y CO<sub>2</sub>. En esta prueba también se hizo una segunda alimentación de la AAE al mismo tiempo que en anterior. En la siguiente figura, el AHE y el AAE tienen una curva muy similar pero muy poca producción de metano que no llega a los 10 mL de metano.

AD						
Parámetros		AHE	AAE	AME	Control	Error
pH	Inicial	7,7	7,7	7,7	7,7	±0
	Final	7,9	7,2	7,9	7,9	±0,3
SV	Inicial	5,2	5,7	5,9	4,6	±0,5
	final	2,1	4	4,62	2,57	±0,8
	degradada	3,1	1,7	1,28	2,03	±1
DQO	Inicial	21,3	23,3	23,9	18,7	±0,8
	final	17,4	21,5	21,3	10,3	±1
	degradada	3,9	1,8	2,6	8,4	±0,7
AGV	Inicial	2326	3750	6265	1289	±2155
	Final	2631	4.242	7.087	1458	±2438

Tabla 27. Parámetros fisicoquímicos inicial, final y degradados para el inóculo del AD

A continuación, se expone la producción de metano para este Inóculo.

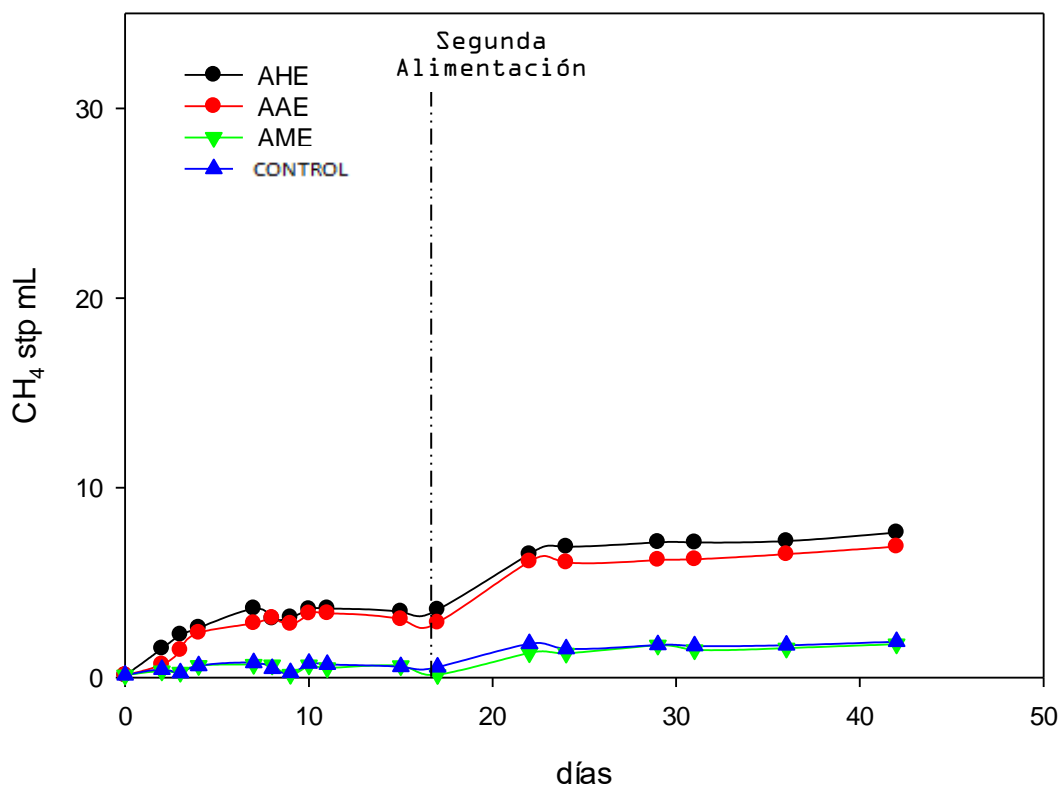


Figura 43. Producción metano en reactor AD para todas las actividades y el grupo control

La AHE tiene una DQO degradada de 9 g/kg y la AAE de 2,96 g/kg, así mismo con los SV, lo que corrobora la baja producción de biogás de este inóculo en la prueba. Vemos una pH que se mantiene estable y no sufre cambios extremos por presencia de bicarbonato o abundancia de AGV. En este caso, para aumentar la proporción de metano dentro del biogás se debe mejorar las condiciones de las hidrogenotróficas y evitar el desacople existente en esta ruta; una de las formas es trabajar a temperaturas altas, ya que se ha demostrado que las arqueas hidrogenotróficas están mejor adaptadas y predominan en este tipo de ambiente (Sun et al. 2014).

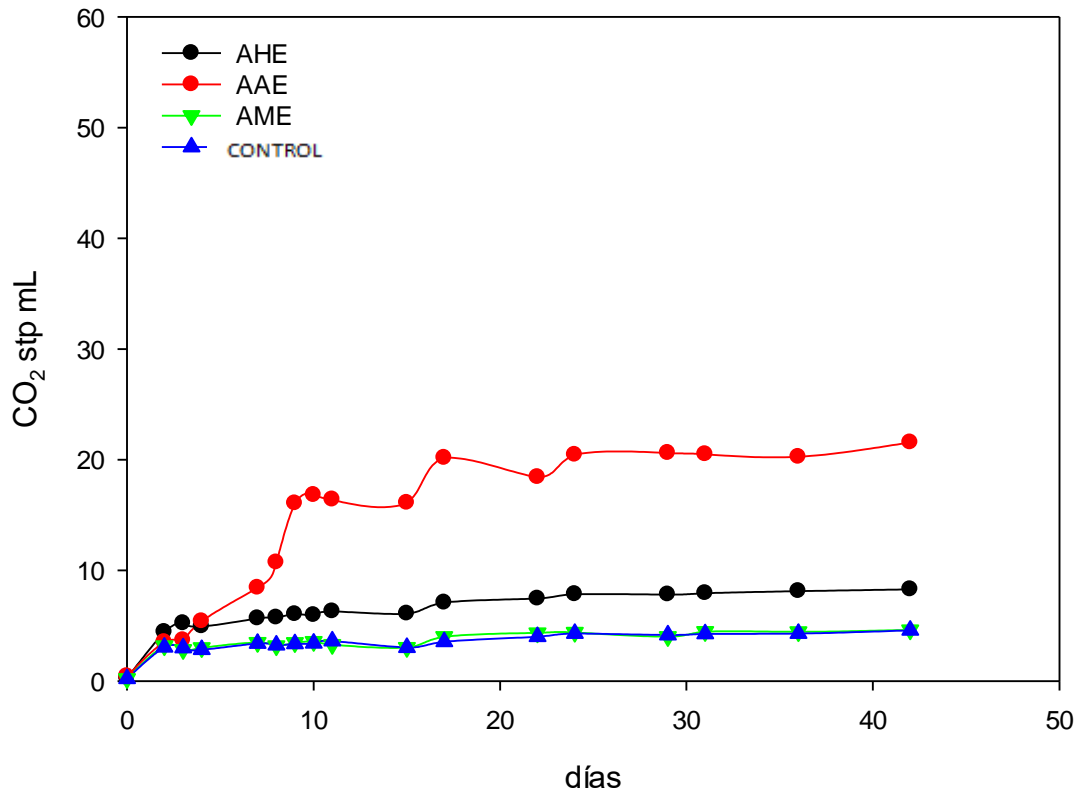
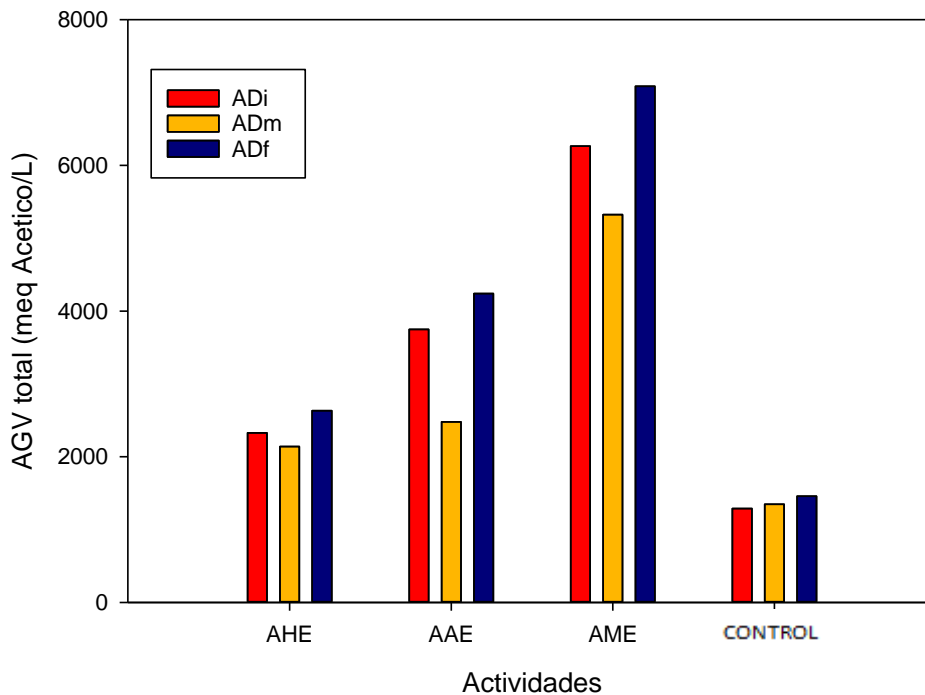


Figura 44. Producción CO<sub>2</sub> reactor AD, para todas las actividades y el grupo control

En relación con la producción de CO<sub>2</sub> para esta prueba, vemos en la siguiente figura como la AAE tiene mejor producción sobrepasando los 20 mL. Sin embargo, la AME y el control tienen una tendencia similar a la anterior grafica del metano, con una baja producción de CO<sub>2</sub>, así como para la AHE que como se esperaba no tiene una gran producción de CO<sub>2</sub>. La producción de metano a partir del gas carbónico (CO<sub>2</sub>), vía de evacuación de los hidrógenos producidos durante las etapas de hidrólisis y sobre todo de acetogénesis, es una reacción de reducción rápida que asegura alrededor del 30 % del metano. El 70 % restante proviene de la degradación del ácido acético (Moletta, 1993).

A continuación, se expone la gráfica de AGV del inóculo AD en la siguiente figura:



**Figura 45.** Concentración de AGV en el transcurso de la prueba para reactor AD. AD i: inicial, AD m: a la mitad, AD f: al final del ensayo.

Con respecto a los AGV, se observa un comportamiento similar al primer inóculo con una baja concentración de AGV en la segunda medición. Los AGV fueron bajos si se comparan con el inóculo del RM con valores finales que no superan los 10 mil (meq Acético/L), esto también nos indica la poca actividad de las bacterias acidogénicas y con ello la baja presencia de AGV para las bacterias metanogénicas.

Los AGV de la AME, tiene un incremento sustancial al final del ensayo muy superior a la producción de metano. Es posible que existiera una acumulación de AGV debido al hidrógeno. La acumulación de hidrógeno en el medio es característica de un desacople de fases o malfuncionamiento de la digestión, frecuentemente, tras una sobrecarga de materia orgánica. Ésta provocará una acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV), concretamente de acetato, propiónico y butírico, de los cuales el propiónico es el más difícil de degradar y se considera un fuerte inhibidor (Mösche y Jördening, 1999).

Comparando los AGV's de la AME con el control, ambos tiene la misma producción de metano pero el control una muy baja concentración de AGV's. Esto significa que la adición de substratos puede incrementar en este caso la producción de biogás.

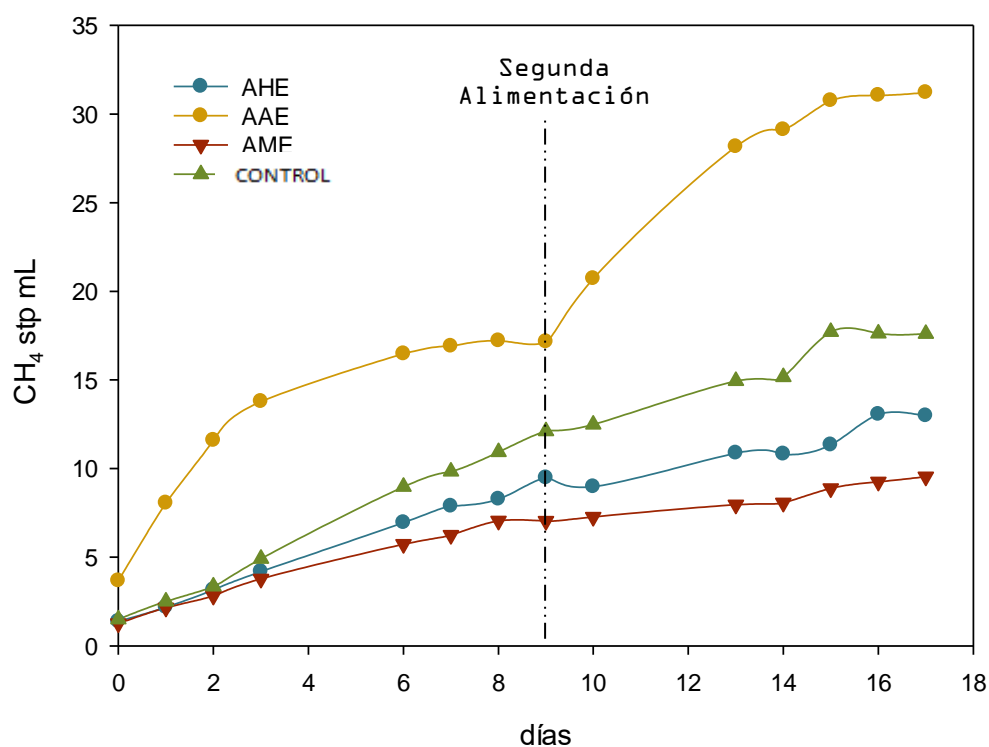
### 4.3.5. Inóculo alimentado con fango mixto (FM)

Este inóculo tiene una DQO alrededor de 37 g/kg y 23 g/kg de SV. Podemos observar como la AAE tiene una curva exponencial hasta el noveno día que es cuando se realiza la segunda alimentación solo en este caso a todas las actividades. La medición de biogás en este ensayo fue por 17 días esperando el término del crecimiento esponencial que se dio al mismo tiempo en todas las actividades y en el control. En la tabla 28 de exponen los parámetros fisicoquímicos.

		FM				
Parámetros		AHE	AAE	AME	Control	Error
pH	Inicial	7,3	7,4	7,4	7,5	±0,08
	Final	6,9	7,5	7,5	7,5	±0,3
SV	Inicial	24,8	24,9	25,6	23,1	±1
	Final	16,35	12,83	14,78	12,46	±1
	degradada	8,45	12	10,8	10,6	±0,9
DQO	Inicial	39,5	39,7	40,8	36,7	±0,8
	Final	27,9	21,9	25,23	21,26	±0,7
	degradada	11,6	17,8	15,5	15,4	±1
AGV	Inicial	949	4440	5512	1303	±2270
	Final	1200	5613	6968	1647	±2869

**Tabla 28.** Parámetros fisicoquímicos inicial, final y degradados para el reactor FM

La figura 43, nos muestra las curvas que resultaron para etse inóculo.



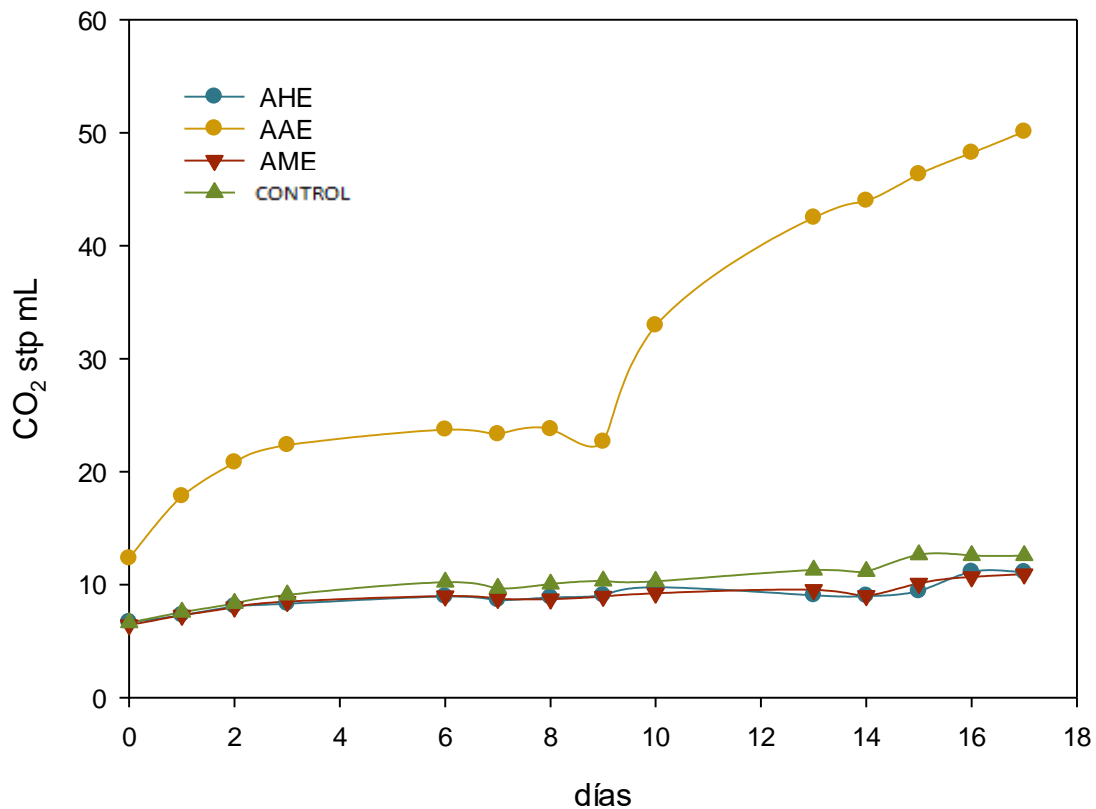
**Figura 46.** Producción de metano del inóculo alimentado de fango mixto, para todas las actividades y el grupo control.



Vemos como el control tiene la segunda mejor producción de biogás seguido de la AHE y la AME. Este inóculo también tiene una alta AAE lo que se refleja luego de la segunda alimentación hasta el día 15 que la curva se empieza aplanar. Fue en el día 14 antes de que la curva se aplanara que se tomó la muestra para los análisis moleculares respectivos.

En este caso las Archea hidrogenotróficas tienen un mejor desarrollo que las acetoclásticas y es por eso que la AAE tiene un crecimiento más elevado. En el caso de las arquea, requieren hidrógeno como fuente de electrones y en algunas reacciones para producir metano (Ferry, Kastead, 2007).

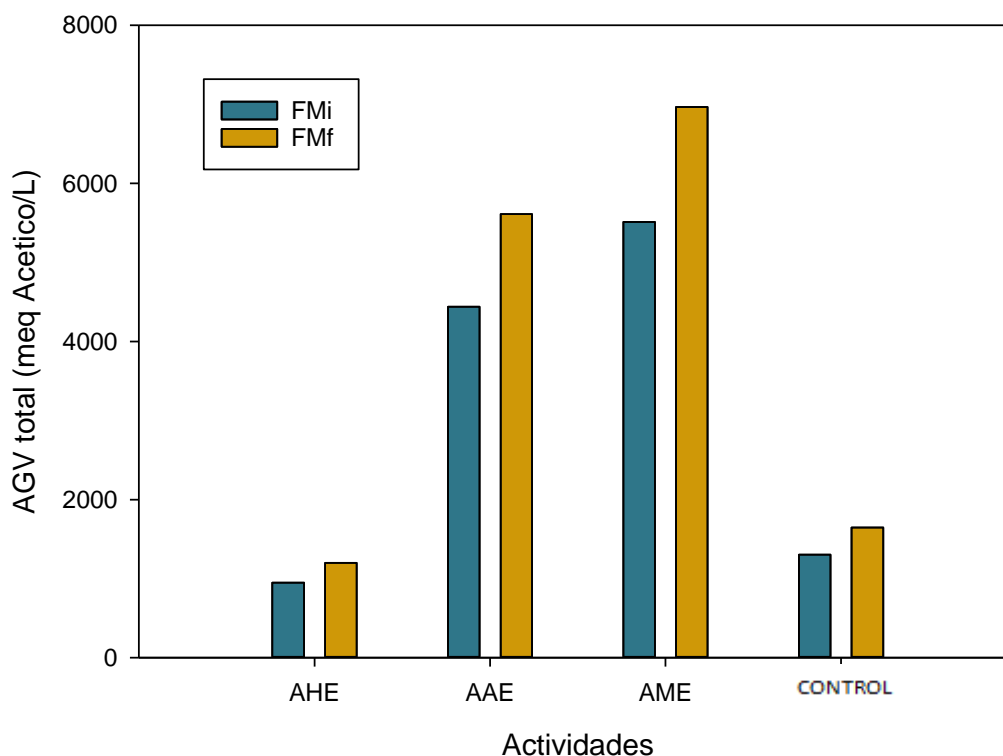
En la figura 47, se observa la producción de CO<sub>2</sub> para este inóculo. En la AAE, el comportamiento del CO<sub>2</sub> fue muy parecido a la curva de metano de la anterior gráfica. Esto significa que las bacterias acidogénicas en este inóculo son muy eficientes generando ácidos a partir de azúcares, en este caso la glucosa que se utilizó como sustrato.



**Figura 47.** Producción de CO<sub>2</sub> para inóculo alimentado de fango mixto para todas las actividades y el grupo control.

El control, tiene la segunda mejor producción de CO<sub>2</sub> como en la curva de producción de metano, seguido de la AME y la AHE que tienen una producción similar. El día 15 en estas tres pruebas el CO<sub>2</sub> tiende a subir, pero luego la curva se aplanar de nuevo siguiendo la tendencia del metano.

En la siguiente figura se puede observar los AGV para el FM.



**Figura 48.** AGV inicial y final para todas las actividades del FM. Fm i: inicial, Fm f: final.

La AAE tiene una gran cantidad de AGV al inicio y al final lo que soporta la alta producción de biogás en esta actividad. La AME por su parte, también tiene una alta presencia de AGV, sin embargo, al utilizar acetato como sustrato para la AME no ayuda para que las poblaciones microbianas tengan un crecimiento como en la AAE, aunque esta curva puede tener un mayor crecimiento luego de los 17 días de observación. Este fenómeno se repite en todas las pruebas, donde la AME teniendo alta presencia de acetato no incrementa su producción de metano. Esto es posible porque la acumulación de acetato puede tener un efecto inhibitorio de la acetogénesis.

En este inóculo vemos como la AHE y el control que tiene menos presencia de ácidos tiene una mayor producción de metano. La AME por su parte, tiene el comportamiento inverso. Sin embargo, para la AAE que tiene una buena producción de AGV´s tiene el mejor incremento de metano en la anterior gráfica. Es decir, este inóculo no necesita de ayuda para esta etapa del proceso (AAE), pero se puede incrementar su rendimiento con la adición de proteasa y lipasas o algún compuesto que incremente su productividad.

Por otro lado, para incrementar la producción de metano se puede alentar el crecimiento de arquea hidrogenotrofas alentando el crecimiento de la acetoclásticas, ya que, algunas bacterias acetogénicas son capaces de invertir su ruta de síntesis de acetato a oxidación de dicho compuesto, pasando a ser conocidas como bacterias oxidadoras de acetato (SAOB) y produciendo tanto H<sub>2</sub> como CO<sub>2</sub>, los cuales serán usados por las arqueas Hidrogenotróficas para producir metano.(Sun et al. 2014).

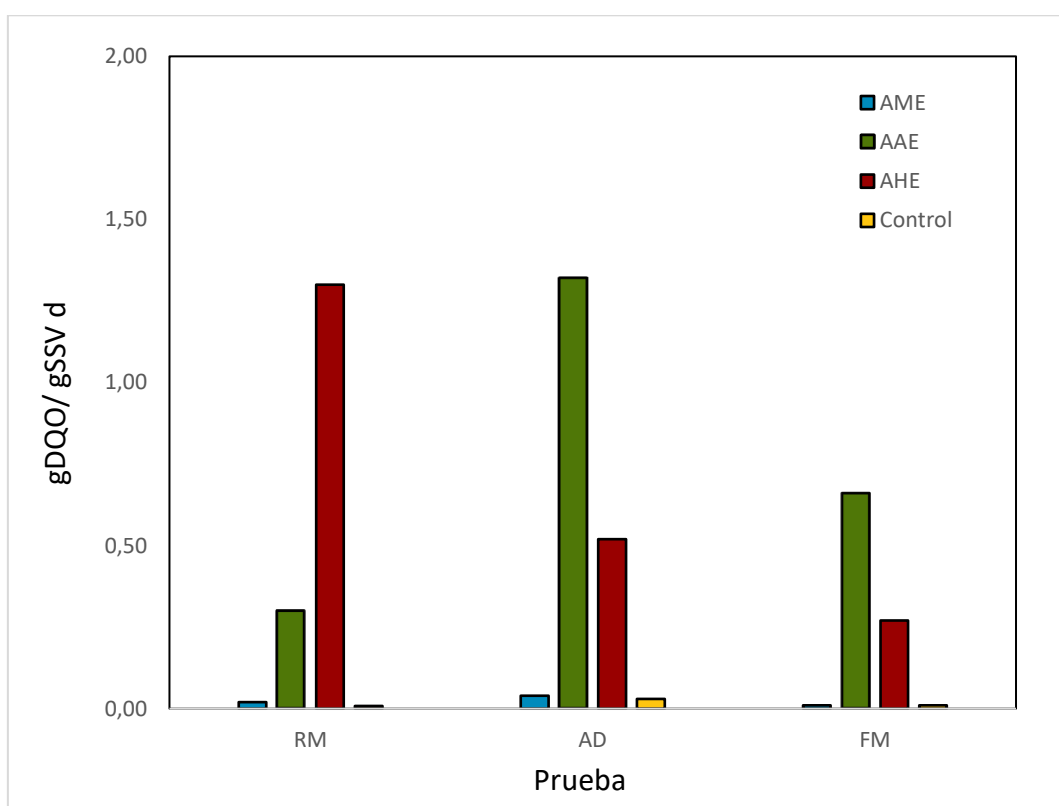
### 4.3.6 Cálculo actividades específicas

Se realizó el cálculo de las actividades específicas para esta etapa de la investigación como se puede observar en la siguiente tabla. Para el inóculo alimentando con FM se realizó dos cálculos ya que se realizaron dos alimentaciones. Sin embargo, se puede observar que la actividad en la segunda alimentación es muy baja y no es representativa frente a la primera actividad calculada.

Prueba	AHE	AAE	AME	Control
RM	0,06	1,6	0,02	0,03
AD	0,75	0,32	0,01	0,02
FM <sub>1</sub>	0,47	0,71	0,15	0,12
FM <sub>2</sub>	0,03	0,02	0,11	0,02

**Tabla 29.** Resultado actividades específicas. AME en g DQO<sub>CH4</sub>/g SSV\*d. AAE y AHE en g DQO/g SSV\*d. FM<sub>1</sub>= Primera alimentación en el fango mixto. FM<sub>2</sub>: Segunda alimentación en el fango mixto.

A continuación, se puede ver en la siguiente figura, los valores de la actividad para cada inóculo. Se puede apreciar como la AAE tiene una actividad sobresaliente seguida del inóculo alimentado de FM, esto soporta la información arrojada en la producción de metano, donde la AAE tuvo la mejor producción de biogás en el RM y FM. La actividad más baja para todas las pruebas fue la del control, lo que corrobora que el experimento fue bien realizado.



**Figura 49.** Resultado cálculo de actividades específicas para los inóculos de RM, AD y FM. No se incluyó la FM<sub>2</sub> ya que su valor es muy bajo.

En la gráfica 49 se puede observar cómo los dos reactores termófilos pueden complementarse. El RM puede darle al reactor AD más actividad hidrolítica y el AD puede incrementar la actividad acidogénica en el reactor RM.

### 4.3.7 Resultados Biología Molecular

Se realizó un análisis del material genético total de las tres muestras de esta etapa de la investigación, mediante la extracción de ADN con el kit Power Microbioma explicado en el apartado de materiales y métodos. También se analizó el material genético de las bacterias obtenido mediante la aplicación de ARN ribosómico de la subunidad ARNr 16S. Así mismo se obtuvo resultados de la aplicación de la *mcrA* y la *aprA* en el inóculo FM.

#### 4.3.7.1 Las bacterias y su actividad en los tres inóculos.

En la siguiente tabla se aprecian los resultados de la ARNr 16S.

Muestra	ARNr 16S				
	ADN ng/μL	ADN No copias/g	SD	ADNc No copias/g	SD
<b>Inóculo de FM</b>					
<b>AHE</b>	78,06	3,23E+10	9,99E+09	2,95E+11	7,63E+10
<b>AAE</b>	355,39	3,98E+10	1,11E+10	7,50E+11	1,13E+11
<b>AME</b>	42,09	1,89E+09	1,21E+09	4,37E+09	3,31E+09
<b>Control</b>	280,48	2,55E+09	2,97E+09	4,55E+09	2,05E+09
<b>Inóculo de AD</b>					
<b>AHE</b>	10,62				
<b>AAE</b>	16,47	4,13E+09	2,02E+09	3,69E+10	4,89E+09
<b>AME</b>	9,81				
<b>Control</b>	9,03				
<b>Inóculo de RM</b>					
<b>AHE</b>	20,26				
<b>AAE</b>	36,28	2,93E+09	7,96E+08	1,97E+11	9,54E+10
<b>AME</b>	14,1				
<b>Control</b>	12,94				

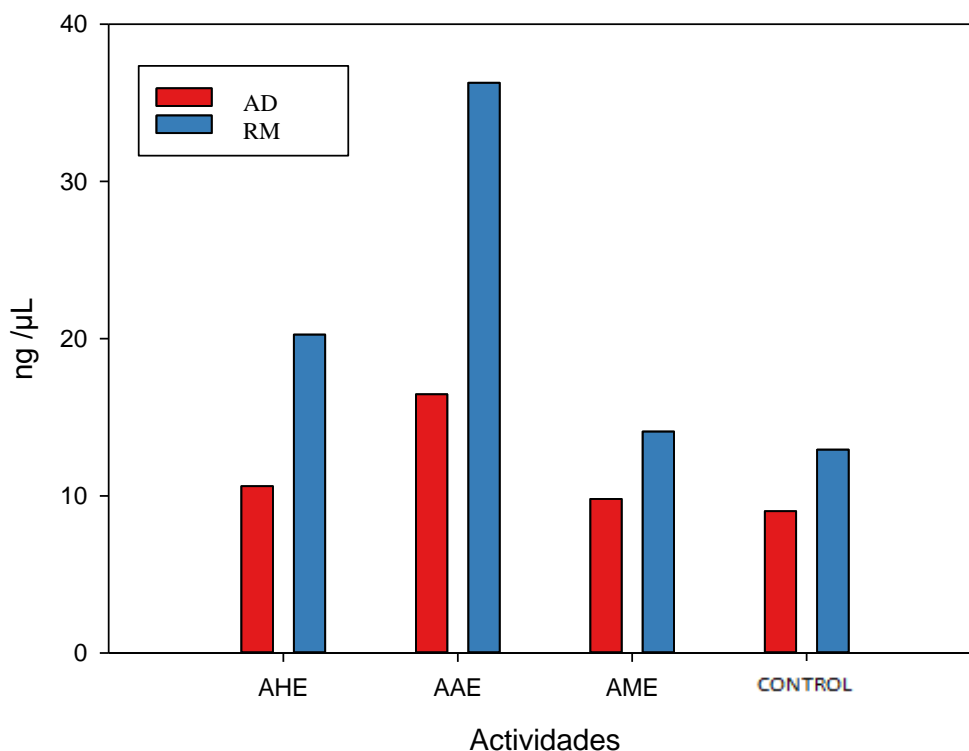
**Tabla 30.** No copias de genes de la ARNr 16S para todos los tres reactores. ADNc: actividad. ADN: abundancia relativa. SD: desviación estándar.

Para el inóculo del reactor AD y el del reactor de 7 L, solo se realizó el análisis de la ADNc en la actividad acidogénica específica, ya que según la extracción total de ADN no se observaba mucha actividad en estos ensayos, además que, en los ensayos de actividades específicas, estas actividades no tuvieron una considerable producción de biogás.

Para el inóculo del AD por ejemplo se ha observado una concentración total de ADN mayor en AAE seguido de la AHE, la AME y finalmente el control. Esto se corrobora con los resultados de las curvas en las actividades en la cual AAE tiene la mayor producción de biogás seguido del AHE. En los resultados del inóculo del RM, la AAE tiene la mayor concentración de ADN total seguido de la AHE, el AME y finalmente el control. Esto corresponde con los resultados mostrados en la gráfica de la producción de metano.

Con respecto a la ARNr 16S, podemos observar en los dos reactores termófilos una cantidad de ADN similar en los dos reactores y en términos de ADNc el reactor RM tiene una mayor actividad como lo demuestra la gráfica de producción de biogás. Se ha investigado comunidades microbianas en la producción termofílica de metano de ácidos orgánicos en un reactor de lecho fijo, usando ARNr 16S el análisis mostró que la población microbiana cambia con el tiempo de retención hidráulico (Ueno y Tatara, 2008).

En la figura 50, se observa la comparación del ADN total para los inóculos de los reactores AD y RM. Es importante comparar estos dos inóculos ya que tienen el mismo inóculo inicial de la EDAR la Llagosta.



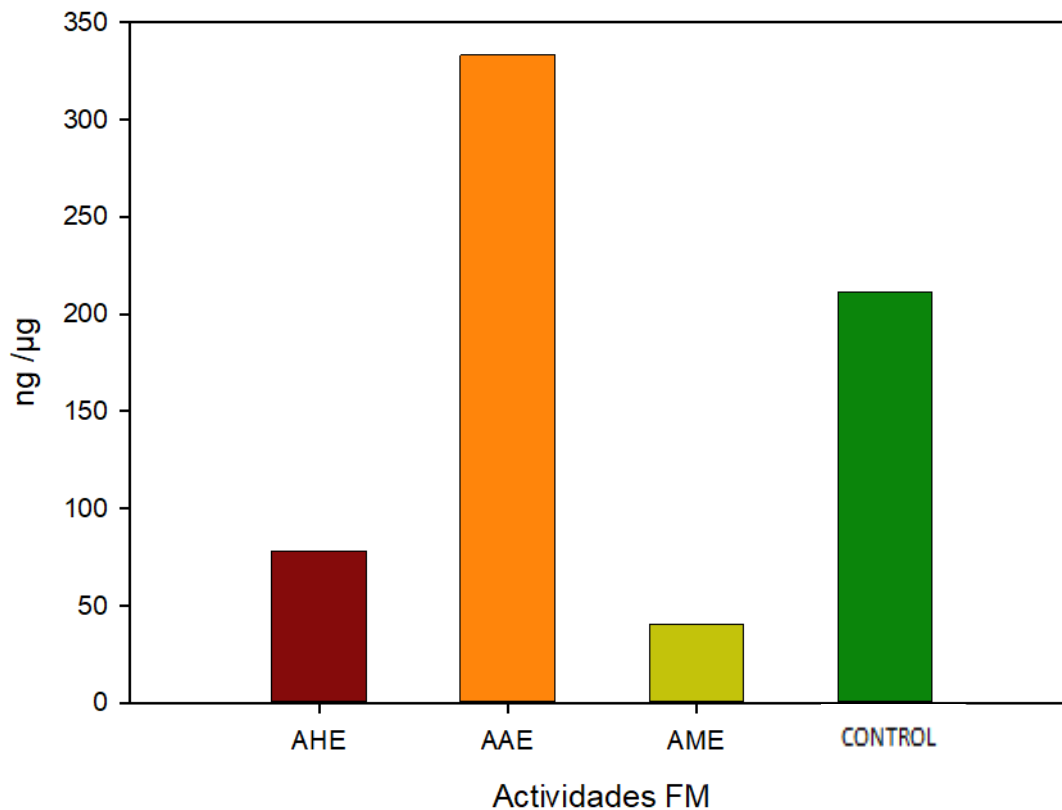
**Figura 50.** ADN encontrado al final de las pruebas para los inóculos de RM y AD

En esta gráfica podemos observar como el inóculo del reactor RM tiene una gran cantidad de material genético total a comparación del AD. Se ha observado también, una similitud entre la concentración en los dos inóculos de la concentración de ADN del AME y del control. Esta información nos indica que la alimentación del RM, que era el efluente de un reactor hidrolítico estaba cargada de aminoácidos, ácidos de cadena larga para que las bacterias acidogénicas tuvieran un mejor crecimiento y por ende una gran producción de AGV que en el reactor AD.

La concentración de ADN en el inóculo del AD es menor en todas las actividades específicas, esto se debe a que la alimentación de este reactor que era residuos esterilizados y agua residual de matadero no era muy digerible por las bacterias hidrolíticas de este reactor y por esto influye en que los otros microorganismos no tengan un buen crecimiento.

La alimentación de un reactor es fundamental en el metabolismo de los microorganismos y por ende en la producción de biogás. Por otro lado, el reactor hidrolítico es una herramienta interesante para digerir las moléculas complejas de los substratos y con ello entregarles a las acidogénicas alimento en abundancia.

En la siguiente gráfica se muestra el ADN total encontrado en todas las actividades específicas del inóculo alimentado con fango mixto.



**Figura 51.** ADN encontrado al final de la prueba para el FM

Se puede observar una gran cantidad de ADN total en la AAE seguido del control, la AHE y la AME. Esto concuerda con los resultados de la producción de metano en cada actividad específica. Es notable, como la AME tiene el valor más bajo, incluso más que el control, esto puede significar que en este inóculo abundan más las bacterias hidrogenotróficas que las acetoclásticas, ya que el acetato adicionado al AME no tuvo el crecimiento que se quería.

En este caso las acidogénicas generaban más AGV del que las acetogénicas lograban convertir en acetato, por lo que imperaba la vía del  $H_2$ . El hidrógeno es primordial en las relaciones entre microorganismos sobre todo en la etapa metanogénica. La transferencia de hidrógeno se considera un factor clave para la sintrofia, porque muchas relaciones sintroficas dependen del hidrógeno como lanzadera de electrones (Morris et al., 2013).

#### 4.3.7.2 Las arquea metanogénicas y las sulfato reductoras

A continuación, se puede apreciar los resultados de los bioindicadores moleculares de *mcrA* que cuantifica los genes presentes de las metanogénicas y la *aprA* que cuantifica las bacterias sulfatoreductoras. En la tabla 31 se exponen estos resultados.

Muestra	<b>mcrA</b>				<b>aprA</b>			
	ADN	SD	ADNc	SD	ADN	SD	ADNc	SD
	copias/g		copias/g		copias/g		copias/g	
<b>Inóculo +Fango mixto</b>								
<b>AHE</b>	1,28E+08	5,93E+07	1,89E+06	1,05E+06	8,05E+08	3,05E+08	3,33E+04	1,00E+4
<b>AAE</b>	1,46E+08	5,38E+07	3,06E+05	4,60E+04	6,44E+08	9,32E+07	0	0
<b>AME</b>	8,53E+06	4,06E+06	6,81E+04	7,68E+04	5,38E+07	2,44E+07	8,53E+06	4,06E+6
<b>Control</b>	9,20E+06	5,31E+06	1,65E+05	1,03E+05	5,38E+07	2,44E+07	8,20E+03	0
<b>Inóculo del Reactor AD</b>								
<b>AHE</b>								
<b>AAE</b>	1,09E+08	4,23E+07	1,98E+06	2,57E+06	1,57E+06	3,18E+05	1,30E+05	1
<b>AME</b>								
<b>Control</b>								
<b>Inóculo del Reactor Metanogénico</b>								
<b>AHE</b>								
<b>AAE</b>	3,55E+08	9,1E+07	1,60E+06	1	8,68E+05	2,61E+05	0	0
<b>AME</b>								
<b>Control</b>								

**Tabla 31.** Copias génicas de los reactores RM, AD y FM y para cada actividad específica. *aprA*: fosfosulfato reductasa alfa. *mcrA*: Metil coenzima reductasa. SD: desviación estándar. ADNc: actividad. ADN: abundancia relativa

Para el FM existe una abundancia relativa (ADN) considerable de metanogénicas, aunque con un valor muy similar con las que se encuentran en los reactores AD y RM. Si hablamos de la actividad (ADNc) de las metanogénicas, vemos que los tres reactores tienen una actividad similar para la AAE. Es posible que con la información del ADNc sea más útil para analizar los inóculos ya que se ve una mayor variabilidad. Como expone Zhang, la disminución en la abundancia relativa basada en ADNc observada a través de los compartimientos del reactor fue mayor que la disminución en la abundancia relativa basada en ADN. Este hallazgo indica que el análisis de la abundancia relativa de bacterias metabólicamente activas fue más discriminatorio que el análisis basado en la mera presencia de bacterias. Todos estos hallazgos sugieren que los análisis basados en ADNc son más apropiados para monitorear el rendimiento del reactor (Zhang, 2010).

En cuanto las sulfatoreductoras, podemos ver que existe más abundancia relativa en el FM que en los reactores AD y RM. Sin embargo, si hablamos en términos de actividad vemos una alta variabilidad en las pruebas del FM. En cuanto a la actividad de las sulfatoreductoras, el reactor AD es el que tiene más actividad de estas bacterias. Pero si observamos la actividad de las sulfatoreductoras en la AME para el reactor FM, vemos que están bastante activas. Esto quizás explique la baja producción de metano en la AME, donde la alta actividad de las sulfatoreductoras inhibe la actividad de las metanogénicas acetoclásticas.

#### 4.3.8. Tasas de actividad

Con los resultados moleculares podemos calcular tasas de actividad que nos pueden dar un reflejo más exacto de la actividad de las metanogénicas. La relación ADNc/ADN refleja la actividad real específica del proceso de los metanógenos. Como ambos métodos son parámetros potentes para la detección temprana de fallas en el proceso, los operadores de plantas de biogás pueden evitar pérdidas económicas por su aplicación preventiva (B Munk et al., 2012).

Muestra	Tasas mcrA		Tasas aprA	
	mcrA/ARNr 16S	ADNc/ADN	aprA/ARNr 16S	ADNc/ADN
AHE	0,40 %	1,48E-02	2,49 %	4,14E-05
AAE	0,37 %	2,10E-03	1,62 %	0
AME	0,45 %	7,98E-03	2,85 %	1,59E-01
Control	0,36 %	1,79E-02	2,11 %	1,52E-04

**Tabla 32.** Tasas de actividad para metanogénicas (mcrA) y sulfatoreductoras (aprA). Abundancia relativa con respecto al gen ARNr 16S. Resultados para el inóculo del FM.

En la tabla 32 podemos observar que, para la mcrA, la muestra con mayor tasa ADNc/ADN es el control y la AHE. En cambio, la AAE y la AME que deberían tener más actividad metanogénica quedan con valores más bajos.

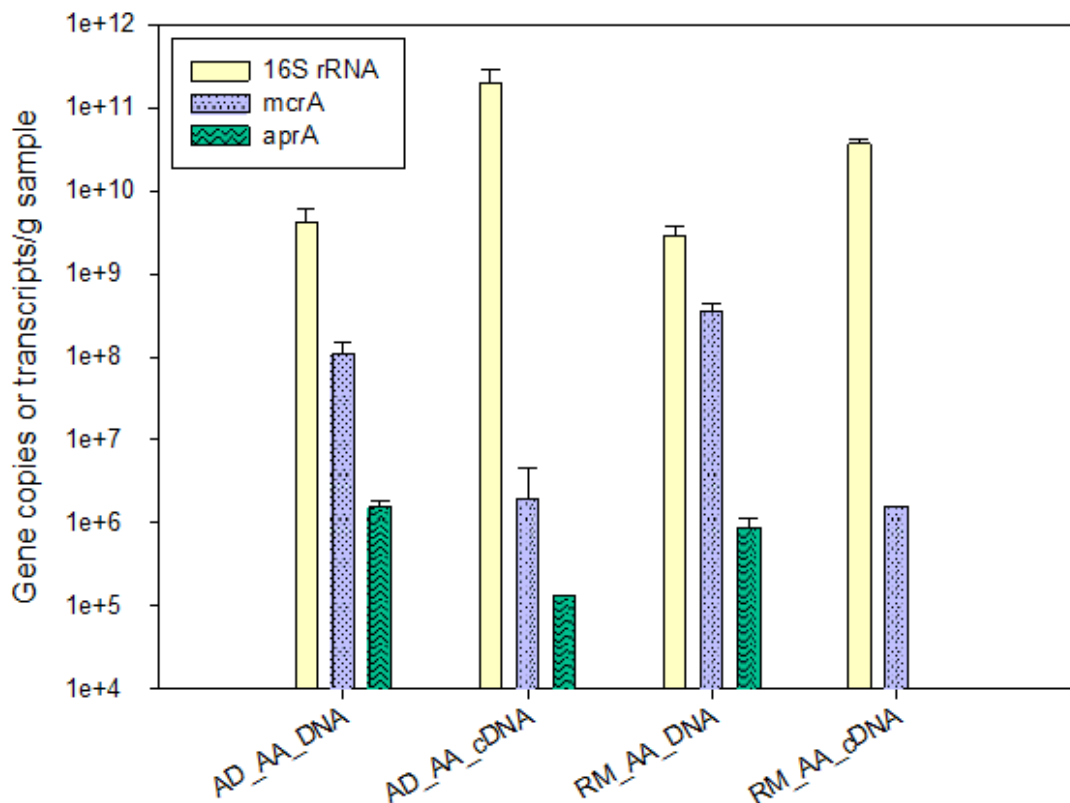
En cuanto a la tasa mcrA/ARNr 16S, se obtuvo una gran abundancia relativa de metanogénicas en a AME y la AHE. Sin embargo, la AME y el control no están muy lejos de estos resultados. Esta tasa nos indica la proporción de metanogénicas que existe con relación al valor total de bacteria y arquea medida por la ARNr 16S. En general se ve que la proporción de metanogénicas en la población bacteriana y arquea total, no varía significativamente en el inóculo. La relación ADNc/ADN, también incluye un parámetro de actividad específicamente a la transcripción del gen ARNm, también puede informar sobre el estado fisiológico de un gremio distinto, se podría mostrar esto para los metanógenos (B Munk et al., 2012).

En cuanto las sulfatoreductoras, se encontró que la abundancia relativa de este grupo con respecto a las bacterias y arquea es mucho mayor que el de las metanogénicas. Puede que las sulfatoreductoras tengan una gran abundancia relativa, pero no tienen mucha actividad como se observa en los valores de ADNc/ADN.

Estas tasas arrojan resultados interesantes para aplicarlos en planta, sin embargo, como argumenta Munk et al, debe demostrarse si la relación ADNc/ADN se puede aplicar a las plantas de biogás en la práctica, cuando solo se pueden analizar una serie de tiempo corta o muy pocas muestras. Estos parámetros biológicos moleculares pueden, particularmente en combinación con parámetros químicos y físicos, ayudar a los operadores de plantas de biogás a controlar mejor el proceso de fermentación y contrarrestar las fallas inminentes del proceso antes de que surjan pérdidas económicas graves (B Munk et al., 2012).



En la siguiente gráfica se puede observar los resultados obtenidos de la técnica qPCR, en la cual se obtuvo el número de copias genéticas para la ARNr 16S, la mcrA y la aprA para analizar los inóculos RM y AD.



**Figura 52.** Resultados qPCR de abundancia relativa y de actividad en bacterias y arquea (ARNr 16S) para metanogénicas (mcrA) y sulfatoreductoras (aprA). Resultados para los inóculos del RM y AD.

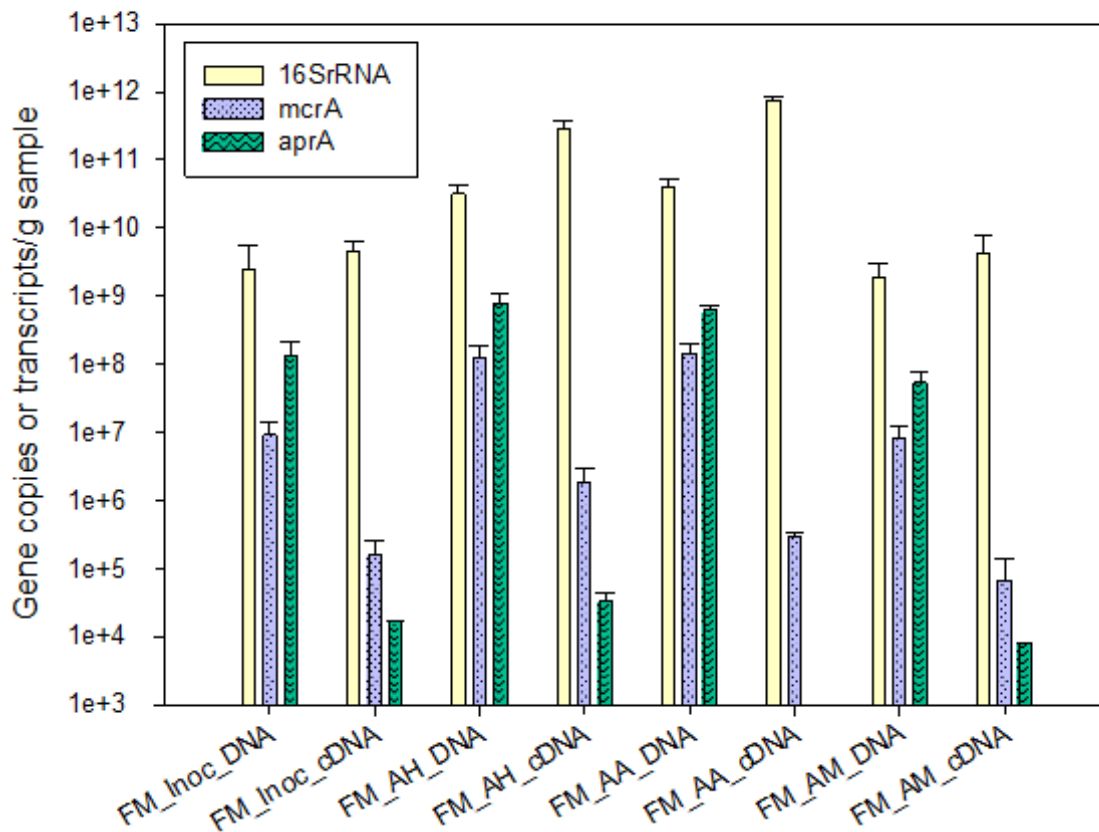
Como se puede observar, existe en los dos inóculos una abundancia relativa de bacterias más alta que las metanogénicas y las sulfatoreductoras. Las metanogénicas tienen una mayor abundancia relativa en la AAE del reactor RM. Esto concuerda con la producción de metano donde la AAE fue la que más produjo y confirma la presencia de metanogénicas en el RM el cual solo trabaja en fase metanogénica.

En términos de actividad bacteriana se puede inferir de la figura 52, que la AAE del reactor AD, tiene una mayor actividad que el reactor RM. Los dos reactores tienen una actividad de las metanogénicas muy similar, por lo cual se puede concluir que la abundancia relativa también es un buen indicativo para predecir la producción de biogás de un inóculo.

En cuanto a las sulfatoreductoras, existe una abundancia relativa similar de este grupo en los dos reactores, pero una baja actividad en el reactor AD y una nula actividad en el RM. Esto puede significar, que no existe una alta presencia de sulfuros en estos reactores y que estas bacterias no compiten en estos inóculos por fuentes de energía o carbono con las arque metanogénicas.

Es interesante anotar, que la abundancia relativa de metanogénicas es mayor que su actividad en los dos reactores. Esto puede significar, que puede existir presencia de estas arquea, pero en general, la actividad es menor que la cantidad de poblaciones presentes.

En la siguiente gráfica se puede observar los resultados obtenidos de la técnica qPCR, en la cual se obtuvo el número de copias genéticas para la ARNr 16S, la *mcrA* y *aprA* para el FM.



**Figura 53.** Resultados qPCR de abundancia relativa y actividad de bacterias y arquea (ARNr 16S) para metanogénicas (*mcrA*) y sulfatoreductoras (*aprA*). Resultados para el inóculo del FM.

En términos de la ARNr 16S, el gráfico muestra claramente que la abundancia relativa obtenida en la AAE y la AHE son muy parecidos, aunque la AAE tiene una actividad mayor, es decir una mejor actividad de las arquea en esta muestra. El control y la AME tienen una concentración de bacteria y muy parecida y también su actividad está en el mismo valor. La alta actividad encontrada en la AAE corrobora la mayor producción de metano de esta actividad. La baja actividad de la AME concuerda con la baja producción de metano de esta actividad.

El control tiene más presencia genética que el ensayo de la AME, aunque fue el segundo ensayo que más produjo metano. Resalta el resultado de la AHE en el cual se ha encontrado una considerable presencia de bacterias y arquea con una alta actividad casi igual de buena como la de la AAE, aunque esta no tiene una alta producción de metano en el ensayo de actividades específicas. Esto puede ocurrir debido a que como cita Felchner, otro factor importante en la eficiencia del proceso es la distancia entre bacteria y arquea (Felchner-Zwirello et al.).

En cuanto a las sulfatoredutoras, vemos que en las muestras existe una gran abundancia relativa, pero su actividad es baja. Esto puede indicar que la presencia de sulfatoredutoras en el medio no interfiere con la abundancia relativa de las metanogénicas como ocurre en el ADN de la AAE. Este argumento podría ser novedoso ya que existen sulfatoredutoras que consumen acético y otras  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . Dependerá de qué metanogénicas estén activas (las acetotrofas o las hidrogenotrofas).

La eliminación de hidrógeno del medio es llevada a cabo, por lo general, por bacterias metanógenas, hidrogenotróficas, aunque en presencia de sulfatos, las bacterias sulfatoredutoras son capaces de establecer una relación sintrófica con las bacterias que requieren Hidrógeno para su metabolismo. La relación sintrófica recibe el nombre de transferencia interespecífica de hidrógeno y permite llevar a cabo las reacciones, con un balance energético favorable (Cadi, 1994).

#### 4.3.8 Análisis estadístico

Se realizaron correlaciones para cada inóculo estudiado. A continuación, se puede observar el mapa de correlaciones del inóculo del reactor RM.

	DQO	pH	SV	AGV	AME	ADN
DQO		-0,962*	1,000**			
pH			-0,961*			-0,98*
SV						0,914
AGV						-0,81
AME						
ADN						

**Figura 54.** Mapa correlación para el inóculo del RM.

En la figura 54 podemos apreciar, como en este inóculo existe una alta correlación positiva entre la DQO el ADN y los SV. Esto quiere decir que cuando la DQO disminuye, disminuye también el ADN y los SV. Por otro lado, existe una correlación fuertemente positiva entre los SV y el ADN, eso ocurre porque el aumento de los SV incrementa el ADN microbiológico. Se puede apreciar también, una fuerte correlación negativa entre el DQO y el pH, es decir que cuando baja el pH, la DQO aumenta. LA AME tiene una correlación positiva con los fisicoquímicos, es decir que cuando la AME se incrementa puede existir un leve aumento de los parámetros medidos.

En la siguiente figura se observa del mapa de correlación para el inóculo del reactor AD

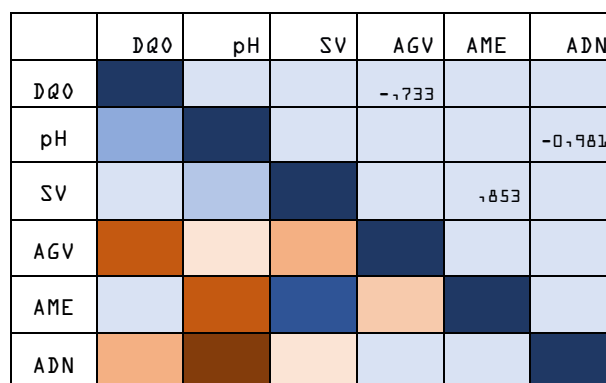


Figura 55. Mapa de correlación para el inóculo del AD:

Acá se puede inferir que no existen correlaciones positivas fuertes, al contrario, se encuentra una correlación negativa entre la ADN y el pH. Este fenómeno también lo vemos en el inóculo anterior, es decir que los microorganismos son muy susceptibles a los cambios de pH. En este reactor no se encuentran correlaciones con un alto grado de significancia, es decir que no existe correlaciones representativas, puede que no halla muchas simbiosis microbiana. Esto concuerda con la baja producción de metano.

Se puede apreciar en la siguiente figura el mapa de correlación del inóculo + fango mixto.

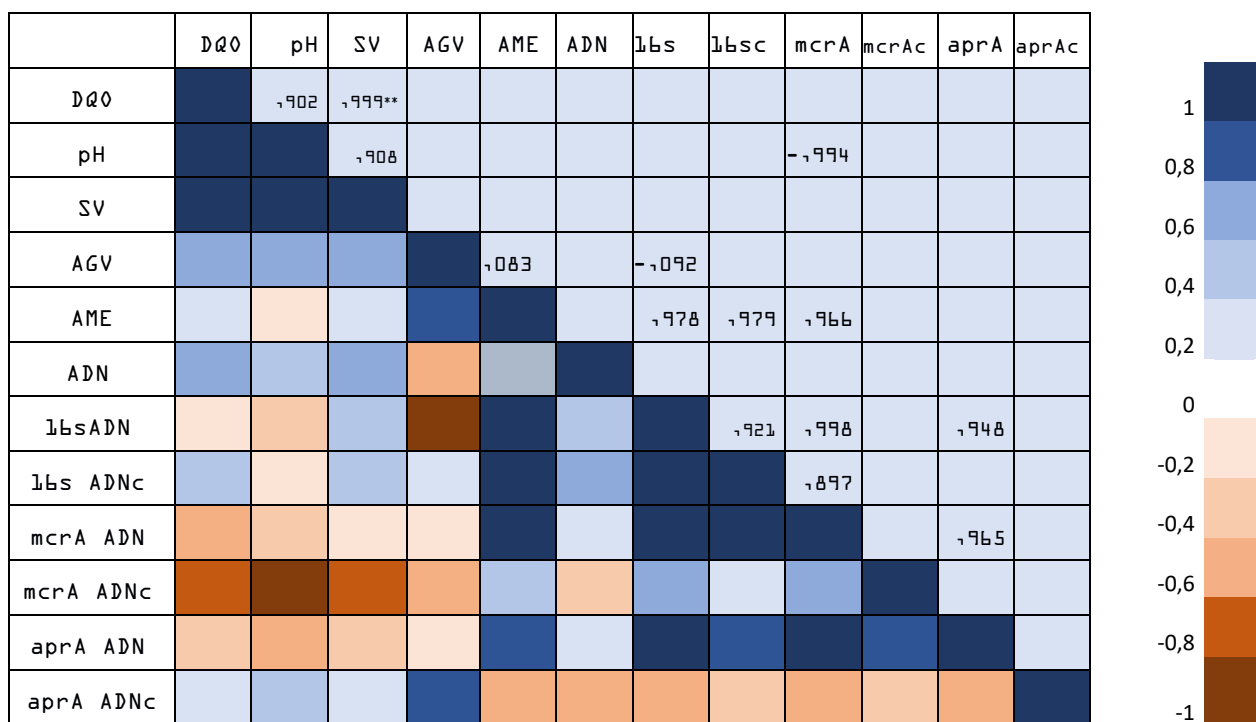


Figura 56. Mapa de correlación para el inóculo del FM.

En este mapa de correlaciones, se puede observar una correlación fuertemente positiva entre las DQO el pH y los SV. Es decir que cuando sube el pH puede subir la DQO y los SV. La AME tiene una correlación fuerte positiva con la ARNr 16S y con la abundancia relativa de las metanogénicas, esto quiere decir que las bacterias y las arquea en especial, aumentan la actividad metanogénica de este inóculo.

Por otro lado, el ADN de la 16S tiene una correlación positiva fuerte con el ADNc 16s, es decir que cuando aumenta el material genético, también aumenta la actividad de las bacterias y las arquea. Vemos que el pH ejerce una correlación negativa con la ARNr 16S, lo que significa que al disminuir levemente el pH puede aumentar levemente el material genético y su actividad.

La actividad de las arquea metanogénicas, tiene una correlación negativa fuerte con el pH. Es decir, que cuando el pH se incrementa, baja la actividad. La abundancia relativa de estas arquea, tiene una fuerte correlación positiva con la AME y la ARNr 16S. Esto quiere decir, que cuando se incrementa los genes 16S, se incrementa las metanogénicas y también su AME.

En cuanto las bacterias sulfatoreductoras, se puede evidenciar que al incrementar las bacterias y las metanogénicas, las sulfatoreductoras lo hacen también. Esto confirma el sintrofismo que existe entre estos microorganismos ya que la posibilidad de crecimiento de un grupo impulsa el crecimiento de los demás. Es interesante que la abundancia relativa de estas bacterias tiene una correlación negativa con los parámetros fisicoquímicos.

Se observa también, que la actividad de la sulfatoreductoras tiene una correlación positiva moderada con los parámetros fisicoquímicos. es decir que cuando se incrementan los valores de estos parámetros, se incrementa la actividad de estas bacterias. Además, la actividad de la aprA tiene una correlación negativa con los bioindicadores moleculares. Esto quiere decir que cuando la actividad de las metanogénicas, las hidrolíticas y acetogénicas se reduce, se incrementa la actividad de las sulfatoreductoras.

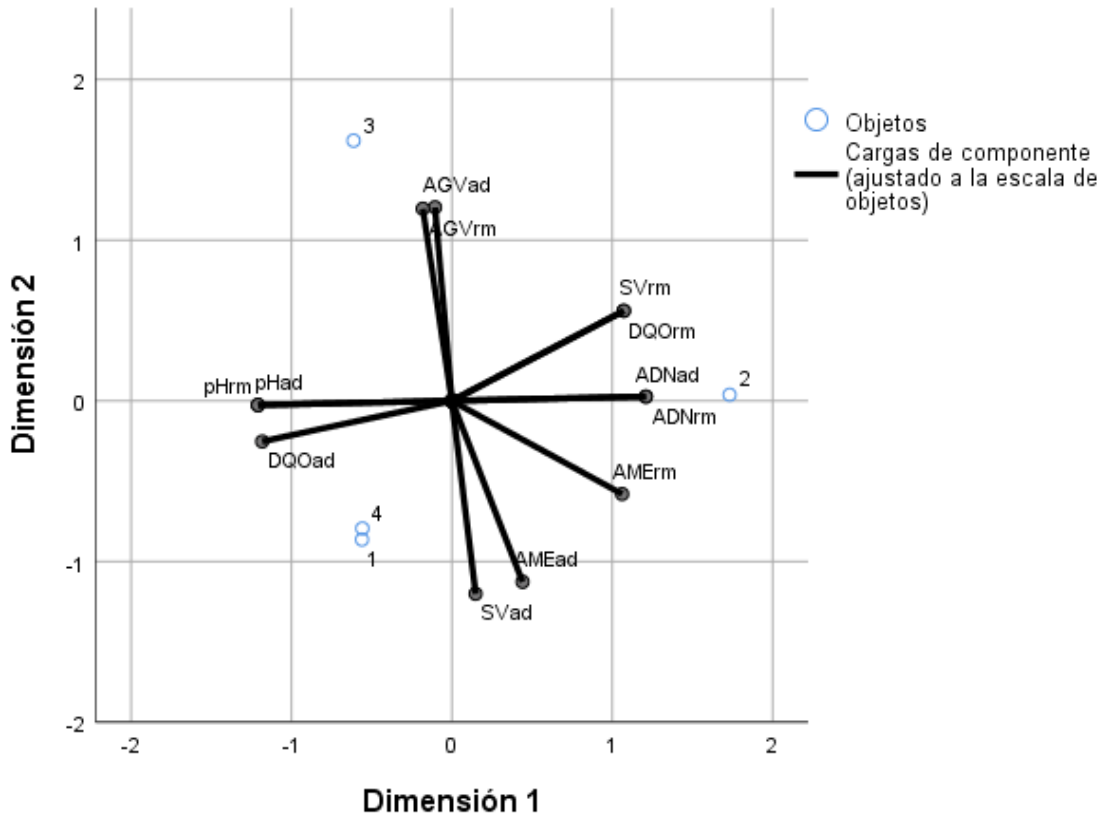
Se ha utilizado el gen aprA para detectar bacterias sulfatoreductoras. En esta investigación se ha querido indagar los resultados de estos inóculos para saber cómo interactúan con las metanogénicas. Sin embargo, no hemos realizado una investigación profunda ya que esto da para otra tesis. Para analizar los resultados de la aprA, debemos preguntarnos primero ¿Qué concentración de sulfato y de DQO se tiene? ¿si hay sulfhídrico en el biogás? ¿o si se realiza algún acondicionamiento al biogás antes de usarlo?

Cuando hay sulfato y hay sulfatoreductoras activas, además de ácido sulfhídrico en el biogás, puede haber sulfuros solubles (inhibidores de metanógenos) y/o precipitados (el FeS es un precipitado negro). La proporción de sulfuros solubles vs precipitados depende de solubilidad, pH, temperatura, presencia iones metálicos. Normalmente se habla de la competición entre sulfatoreductoras y metanógenas por el acético y CO<sub>2</sub>, pero las sulfatoreductoras también pueden competir por otros AGV's y por H<sub>2</sub> con bacterias acetogénicas y arqueas metanógenas hidrogenotróficas, respectivamente. La tasa DQO/SO<sub>4</sub><sup>4-</sup> "controla" esta competición.

En términos de la inhibición, se necesitaría saber si hay sulfuro soluble y si esta concentración está dentro de los rangos inhibitorios para las metanogénicas. No es suficiente argumentar que sólo la presencia de sulfatoreductoras activas equivale a inhibición de la metanogénesis.

#### 4.3.9. Análisis de componentes Principales

Debido a la gran cantidad de variables involucradas en esta fase de la investigación se realizó el análisis de componentes principales para reducir la dimensión de los datos y lograr interpretarlos mejor. En la figura 57, se muestra el análisis de componentes principales para los reactores RM y AD.



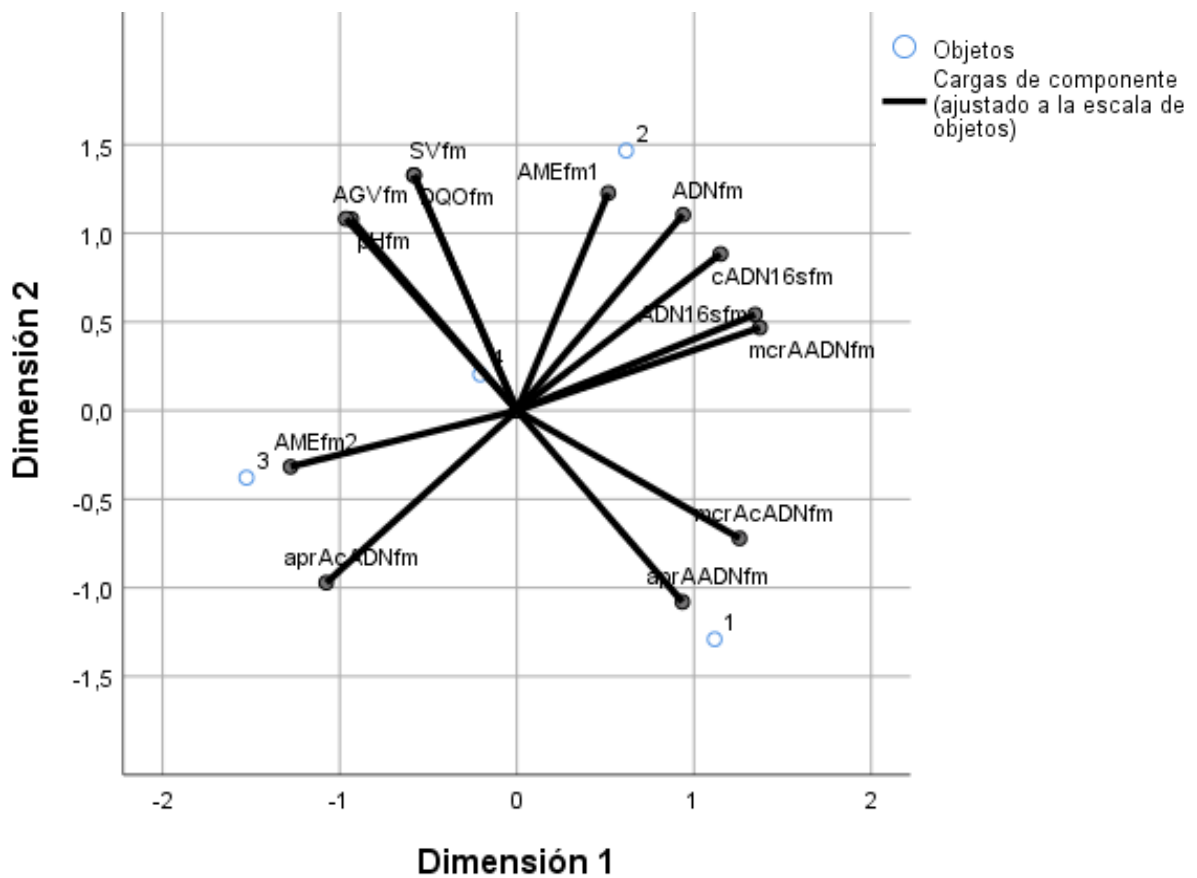
**Figura 57.** Diagrama de dispersión biespacial para los inóculos del AD y RM

En este esquema se puede observar que para la dimensión o componente 1, los SV, la DQO el ADN, la AME del reactor RM tienen a 1. Lo que significa que este componente describe las condiciones de carga orgánica y la abundancia relativa microbiana del inóculo.

Para los parámetros fisicoquímicos de AD, no existe una tendencia conjunta a un componente, lo que concuerda con el mapa de correlaciones para el reactor AD, donde no existe una correlación fuertemente positiva entre estos parámetros.

Por otro lado, los AGV de los dos reactores aparecen cercanos al valor 1 del componente 2. Esto concuerda con la correlación negativa que tienen con los demás parámetros fisicoquímicos de estos inóculos. Podría decirse, que el componente 1 describe la neutralización de estos inóculos, el comportamiento alcalino y ácido del medio, ya que, además de esto, el pH está cercano a este componente.

En la figura 58, podemos observar el análisis de componentes principales para el inóculo alimentado de FM



**Figura 58.** Diagrama de dispersión biespacial para el inóculo del FM.

En la figura 58 podemos ver como se organizan las variables por dimensión o componente. En la dimensión 1 se organizan muy próximas al 1, todos los datos referidos a los bioindicadores moleculares. Esto quiere decir que el componente 1 describe la información genética de este inóculo. Lo que concuerda con el mapa de correlaciones en el cual, los bioindicadores moleculares se correlacionan positivamente excepto con la aprA ADNc.

Para este inóculo la actividad de las sulfatoredutoras tiene una correlación negativa con los demás indicadores moleculares lo cual coincide con el mapa de correlaciones.

En la dimensión o componente 2, se observa una tendencia de los parámetros fisicoquímicos a 1. Esto nos sugiere que el componente 2 describe el control fisicoquímico del inóculo, lo que concuerda con la fuerte correlación positiva entre los parámetros fisicoquímicos.

Se ha aplicado los componentes principales en la digestión anaerobia, como lo hizo Damien et al, quienes encontraron que para el componente 1, se describe principalmente el cambio de una comunidad acetoclástica a hidrógeno utilizando una comunidad metanogénica (Damien et al., 2015).

#### **4.3.10 Discusión**

El inóculo del RM, tiene una alta actividad acidogénica, una media actividad hidrolítica y una baja actividad metanogénica igual al del control. Esto quiere decir que la adición de acetato no influyó decisivamente en el crecimiento de la metanogénicas, y que la producción de metano siguió la vía hidrogenotrófica. En cuanto al inóculo del AD, este tiene una alta actividad hidrolítica, una media actividad acidogénica y una baja actividad metanogénica. La buena AHE se debe a la alimentación de agua de matadero que contiene muchas moléculas como lípidos y proteínas para que las hidrolíticas las procesaran.

El inóculo alimentado con fango mixto (FM) tuvo una actividad acidogénica alta, una actividad hidrolítica media y una actividad metanogénica baja. Sin embargo, estas dos últimas actividades fueron sobrepasadas por el control. Lo que sugiere que este inóculo no necesita de adiciones complementarias para las hidrolíticas y las metanogénicas, pero quizás incentivando las acidogénicas se lograría una gran producción de metano como muestra este ensayo.

Para el inóculo alimentado con fango mixto (FM) existe una correlación positiva entre las actividades específicas y los bioindicadores moleculares, excepto la aprA. Esto es muy significativo, ya que, al incrementar el material genético y su actividad, vemos como las actividades específicas suben también. Esto es una muestra de que las actividades específicas pueden seguir el mismo patrón que siguen los bioindicadores moleculares y dan una idea de la actividad real que existe.

En general vemos una correlación negativa entre el ADN y los AGV. Esto quiere decir que cuando bajan los AGV, sube el ADN. Esto es significativo porque al no tener abundancia de AGV quiere decir que las arquea y las bacterias los han transformado en metano y dióxido de carbono. Es decir que, al medir los AGV's, podemos decir que tanta presencia de material genético existe en el inóculo y tomar medidas para que los AGV se mantengan en una taza estable para que también los microorganismos que no actúan en el proceso del biogás interfieran.

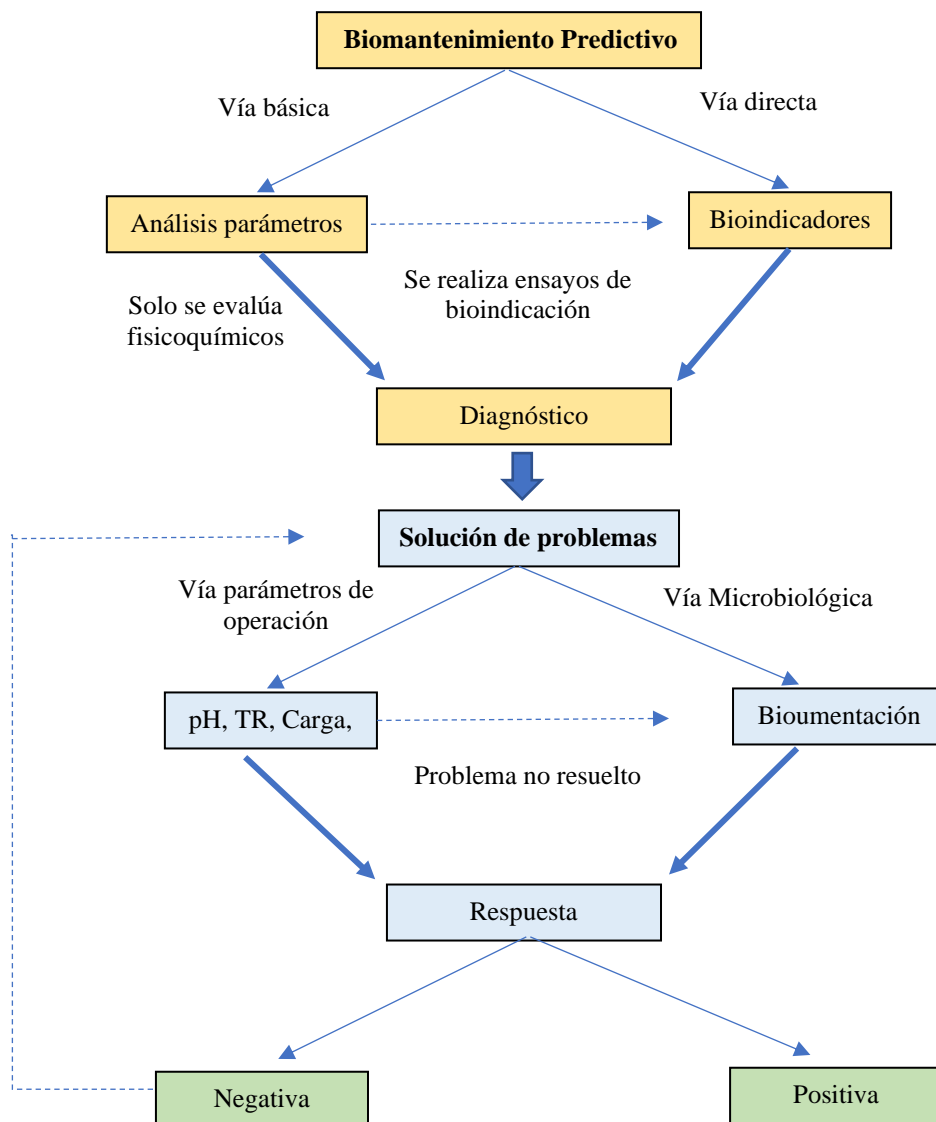
Se puede observar que, en los tres inóculos, existe una correlación negativa entre el pH y los bioindicadores moleculares. Es decir, que cuando sube el pH, baja la abundancia relativa y la actividad. Esto es significativo, ya que si el pH baja a niveles muy ácidos los microorganismos inmediatamente se inhiben y dejan de producir biogás. El pH entonces cuando baja menos 7 nos está indicando que ya está empezando la disminución de bacteria y arquea fundamentales para producir biogás. Aunque las correlaciones no pueden identificar directamente los impulsores o las barreras de la digestión anaerobia, pueden fomentar investigaciones futuras hacia el monitoreo y control de la digestión anaerobia. De hecho, varios estudios encontraron respuestas distintas de ciertas bacterias y metanógenos al pH (Zhang et al., 2019b).

Se aprecia como para la AAE que tuvo la mayor actividad en el FM, se dan los más altos resultados para la ARNr 16S. Esto es significativo, ya que se correlacionan positivamente. Entonces, con solo el dato de la AAE, podemos inferir a priori, si un inóculo tiene una gran concentración de bacterias acidogénicas y también una gran actividad entre ellas. En general los marcadores genéticos utilizados son buenas herramientas para el mantenimiento preventivo de un digestor anaerobio, ya que se va conociendo la abundancia relativa y la actividad de las bacterias y arquea en el inóculo, logrando realizar históricos de datos.



#### 4.4 Biomantenimiento predictivo

Tras realizar los ensayos de laboratorio y evaluar la utilidad de los bioindicadores, se ha realizado la guía del Biomantenimiento de un reactor anaerobio. Los diferentes pasos se exponen en la siguiente figura, los cuales inician con la revisión de los análisis fisicoquímicos y los parámetros de operación, y con ello lograr definir si vale la pena utilizar los bioindicadores. Luego de realizar los ensayos de realiza un diagnóstico con los resultados de las actividades específicas y el ADN.



**Figura 59.** Diagrama de Biomantenimiento

La solución de problemas viene encaminada a buscar el método más adecuado para reactivar el digestor anaerobio. Según sea el caso se puede optar por una solución operacional y luego una de Bioaumentación o ir directamente por la vía molecular. Luego cada tratamiento realizado tendrá su respuesta negativa o positiva. Los procesos de Bioaumentación pueden tener buenos resultados y se evita la modificación de parámetros operacionales.

En el momento de evaluar la utilidad de los bioindicadores para evaluar un inóculo anaerobio, debemos primero, guiarnos por los parámetros fisicoquímicos que existen en planta. De acuerdo con estos resultados podemos ver en la siguiente tabla si es conveniente o no, aplicar uno, ninguno o todos los bioindicadores. Las flechas hacia arriba señalan una alta concentración y las que van hacia abajo, poca concentración. El color verde da vía libre para aplicar el bioindicador, el color rojo sugiere no realizar el ensayo y el color amarillo significa que se sugiere aplicar el bioindicador, pero no es obligatorio. Por ejemplo, si se tiene un inóculo con una alta DQO a la salida del digestor sería conveniente aplicar todos los bioindicadores. Al contrario, si los SV son bajos, no realizamos ninguna actividad específica, pero podemos optar por la extracción de ADN, aunque este bioindicador no sea obligatorio como se puede apreciar en la tabla 33.

Resultados Físicoquímicos		Bioindicador			
		AHE	AAE	AME	ADN
DQO	Alta	↑	↑	↑	↑
	Baja	↓	↓	↓	↓
pH	Alta	↑	↑	↑	↑
	Baja	↓	↓	↓	↓
AGV	Alta	↑	↑	↑	↑
	Baja	↓	↓	↓	↓
Alc	Alta	↑	↑	↑	↑
	Baja	↓	↓	↓	↓
SV	Alta	↑	↑	↑	↑
	Baja	↓	↓	↓	↓

Resultados Bioindicador		Bioindicador Molecular	
		mcrA	ARNr 16S
AHE	Alta	↑	↑
	Baja	↓	↓
AAE	Alta	↑	↑
	Baja	↓	↓
AME	Alta	↑	↑
	Baja	↓	↓
ADN	Alta	↑	↑
	Baja	↓	↓

**Tabla 33.** Guía para utilizar bioindicadores

La idea principal de estas tablas es dar una guía para que los operarios o el técnico consultor logre llegar al fondo de la falla en el sistema y que, por medio de esta información, decida que bioindicadores son representativos para aplicar. Una vez realizado el diagnóstico, se tomará la decisión si se opta por una medida operacional o por una medida biológica. El proceso de Biomantenimiento acá expuesto se puede entender mejor en el siguiente diagrama de flujo, donde se observa como patrón inicial la revisión de los análisis fisicoquímicos y de los parámetros de operación para tomar la decisión de cual o cuales bioindicadores aplicar.

Luego de esto, según los resultados de las actividades específicas y la extracción de ADN se decide en función de resultados altos o bajos si se aplican los bioindicadores moleculares. Una vez obtenidos estos resultados se analizan con los demás datos y se decide que solución optar. Si la solución no ha tenido efecto, se retrocede al análisis de los datos para optar por otra solución.

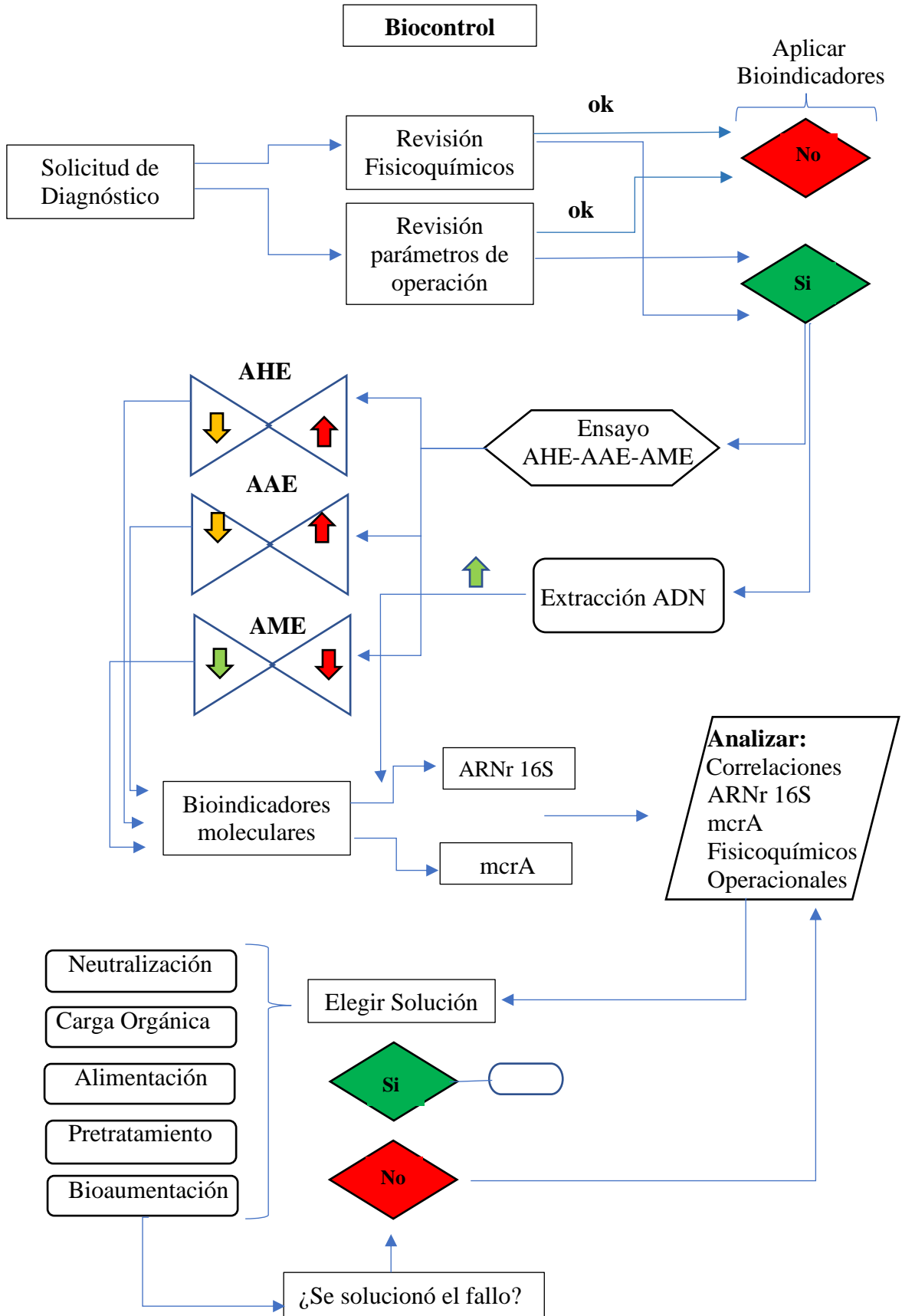


Figura 60. Diagrama de flujo de biocontrol

#### **4.4.1 Solucionario de fallas en el sistema**

Los reactores anaerobios pueden producir más biogás si realizamos un seguimiento de su comportamiento no solo a nivel químico y físico, sino ya se ha empezado a trabajar con soluciones que pasan por la microbiología. En esta investigación se incentiva las soluciones biológicas ya que los algunos casos son más económicos y no implica el cambio de operación del digestor. Sin embargo, las primeras opciones a elegir son las más compatibles con el problema a solucionar o también las más sencillas. Para esto, se ha realizado una tabla donde se relaciona los resultados de los bioindicadores con posibles soluciones de la avería.

Se puede pensar primero que todo, en el cambio de alimentación. Si por ejemplo tenemos una baja AHE se puede concluir que estas bacterias no están digiriendo bien el sustrato y puede estropear todo el proceso del biogás. Si por ejemplo el ADN obtuvo un valor alto para un inóculo anaerobio, no es conveniente realizar un cambio en la alimentación ya que hay una gran abundancia de microorganismos.

Por otro lado, si se obtiene una AAE alta es recomendable neutralizar el medio con alguna sustancia ácida, y lo mismo cuando la AAE es baja se sugiere adicionar una sustancia básica, no necesariamente tiene que ser una sustancia química, la recirculación puede restaurar el equilibrio. Así mismo se puede cambiar la carga orgánica introducida al reactor, esto puede ser útil, cuando hay una alta AHE ya que las bacterias hidrolíticas a veces no pueden digerir la concentración de sustrato alimentado.

El pretratamiento puede ser una opción cuando por ejemplo la alimentación es muy gruesa para digerir por las bacterias, se opta por realizar una trituración de la materia orgánica. También se suele utilizar la sedimentación previa para retirar sólidos grandes. Un pretratamiento que se ha estudiado recientemente es la hidrólisis térmica la cual degrada sustratos de carga orgánica alta para luego enviarlos a un reactor metanogénico, con lo cual se desarrolla mejor eficiencia en la producción de biogás.

Por su parte el proceso de biocontrol finaliza con la utilización de una medida de aumentación cuando esto sea posible y según las características del inóculo. Generalmente se utiliza la bioaumentación, adicionando enzimas o bacterias que aceleran las etapas de la digestión anaerobia. La decisión de optar por un microorganismo se puede tomar cuando el valor de todos los bioindicadores es bajo, ya que en este caso necesitamos aumentar la biomasa en el inóculo y consolidar consorcios.

Estas soluciones evaluadas son las que se utilizan normalmente para resolver inconvenientes en reactores anaerobios, sin embargo, en esta investigación se tuvo en cuenta los bioindicadores que hacen parte de todo el proceso del Biomantenimiento y el biocontrol. Se puede adicionar controles biológicos periódicos a las depuradoras con la misión de seguir el comportamiento de los microorganismos, prever posibles fallas y conocer cuál es la solución que más se adapta al inóculo que se quiere analizar.

Resultados Bioindicadores		Biocontrol									
		Alimentación		Neutralización		Tiempo de retención		Carga orgánica		Pretratamiento	Biocontrol
		Cambio alimentación	Codigestión	Adicionar base	Adicionar ácido	Aumentar TR	Disminuir TR	Aumento de carga	Disminución de carga	Pretratamiento del sustrato	Bioaumentación
AHE	Alta	✗	✗				✗		✓		
	Baja	✓	✓			✓		✓		✓	✓
AAE	Alta				✓						
	Baja	✓	✓	✓				✓		✓	✓
AME	Alta			✗	✗		✗		✗		
	Baja	✓	✓			✓		✓		✓	✓
ADN	Alta	✗	✗	✗	✗			✗			
	Baja								✗		✓
ARNr 16S	Alta			✗	✗		✗		✓		
	Baja	✓	✓					✓		✓	✓
mcrA	Alta			✗	✗		✗		✓		
	Baja	✓	✓					✓		✓	✓

Tabla 30. Soluciones enmarcadas en el biocontrol

#### **4.5 Líneas de Futuro**

Con estos resultados hallados, se pueden realizar varias investigaciones para probar el sistema de Biomantenimiento y de biocontrol. Se podría obtener varios datos de estos ensayos y establecer que tratamiento es más conveniente para un inóculo en particular. Al realizar más ensayos aplicando bioindicadores, se obtendrá más información que puede recopilarse para la gestión de un reactor anaerobio.

Sería interesante investigar más afondo con las técnicas de biología molecular, para poder experimentar con estas técnicas y lograr seleccionar aquellas más representativas, que no tengan costes tan elevados. Sin embargo, como se sabe, la tecnología se va abaratando con el tiempo y en diez años estas tecnologías podrían estar más disponibles y ser accesibles para una depuradora.

Se podrían realizar investigaciones en el ámbito de los digestores de alta carga, por ejemplo, aplicar periódicamente estos bioindicadores, y con ello, realizar un histórico del comportamiento del UASB. Esto podría ayudarnos en el desarrollo del biomantenimiento y para ir documentando los tratamientos que pueden funcionar para esta unidad en específico.

Con la información recopilada en esta investigación y sus resultados, se puede pensar en establecer una consultoría para el sector de agua residual, que se especialice en el Biomantenimiento y biocontrol de reactores anaerobios de alta y baja carga. Normalmente este tipo de servicios no son muy comunes, y la creación de una consultoría de mantenimiento podría tener buenos dividendos.

Los bioindicadores considerados en esta investigación podrían ser trabajados con más detenimiento, en especial, las actividades específicas ya que, guiándonos por las gráficas de la cuantificación de las actividades, podemos realizar mezclas de sustratos en función del incremento de la AME, de la AAE o de la AHE. En futuros trabajos se podrá analizar en más inóculos esta herramienta y probar la efectividad de la propuesta.

En cuanto a las bacterias sulfatoreductoras aún queda un campo amplio por ser descubierto. Se sabe que pueden ser inhibidoras de las metanogénicas, pero como hemos visto en esta investigación, también logran convivir con las metanogénicas sin competencia. En futuros trabajos sería interesante realizar mediciones de sulfatos y ácido sulfhídrico para tener datos que corroboren la presencia o no de las sulfatoreductoras. Así mismo, indagar las vías metabólicas que generen simbiosis o sintrofismo entre las sulfatoreductoras y las metanogénicas.

## **5.CONCLUSIONES**





## **5. Conclusiones**

Se realizó ensayos de las actividades específicas al principio de la investigación, para optimizar el método y ajustarlo a condiciones locales de laboratorio. También se llevaron a cabo ensayos del método de extracción de ADN con el fin de afinar este método para muestras de inóculos anaerobios. Estos ensayos ayudaron a que los bioindicadores fueran precisos y sensibles a las fluctuaciones ambientales y con esto revelar la dinámica de cambio del estado de un reactor anaerobio.

Luego, se evaluaron varios inóculos aplicando los bioindicadores ensayados en la primera parte de la investigación. Se obtuvieron resultados interesantes en general en todos los inóculos analizados, ocho en total. Por ejemplo, en cuatro de estos inóculos la AHE obtuvo la mejor actividad y la AAE en los otros cuatro, tiene la mejor actividad. En ningún momento la AME supero a las otras y a veces quedaba relegada incluso por el control, por lo cual en estos inóculos la actividad limitante es la AME. Aunque en general se dice que la fase limitante es la hidrolítica, la metanogénesis también puede ser el paso limitante para sustratos fácilmente degradables (Vavilin et al., 1997; Björnsson et al., 2001).

En el análisis de los resultados, se ha visto que existen correlaciones fuertes que nos podrían ayudar en el entendimiento de estos inóculos. Se ha logrado observar una gran cantidad de correlaciones negativas y positivas que nos muestran las relaciones que tienen las variables fisicoquímicas con los bioindicadores. Por ejemplo, las actividades específicas muestran correlación con los parámetros fisicoquímicos, lo cual da a las actividades un soporte adicional ya que las curvas de metano concuerdan con los datos de DQO degradados y los SV degradados.

La correlación significativa que existe entre los bioindicadores moleculares y las actividades específicas, sugieren que aplicando estos dos bioindicadores podemos saber la actividad del inóculo e indagar cual es la etapa de la digestión anaerobia que se debe mejorar en el reactor. Se han observado correlaciones positivas significativas que sugieren interacciones mutualistas como el intercambio de intermedios metabólicos y las interacciones sintróficas. Está claro que se necesita más investigación en esta área para vincular completamente la microbiología con la función del proceso y llegar a un punto en el que se pueda lograr el manejo microbiano (Rui et al., 2015).

Así mismo, se han encontrado correlaciones significativas entre los bioindicadores moleculares ADN, ARNr 16S, mcrA y aprA. Con lo cual podemos aplicar estos bioindicadores utilizando como base los parámetros fisicoquímicos, es decir que en el momento de realizar un diagnóstico se realiza teniendo todas estas variables en cuenta. Los bioindicadores moleculares demostraron ser una herramienta efectiva en el diagnóstico de inóculos anaerobios ya que nos muestra la abundancia relativa y actividad de los microorganismos, además de correlacionarse muy bien a la producción de biogás en los reactores analizados.

Podemos utilizar los bioindicadores moleculares también como análisis específicos, los cuales permiten la identificación de los riesgos de falla del proceso antes que los parámetros químicos utilizados convencionalmente (Lebuhn et al. 2015). El ADN se puede desarrollar en el laboratorio de la EDAR, pero los bioindicadores que necesiten qPCR, deben realizar en laboratorios externos por los altos costos de estos equipos.

Para obtener respuestas tempranas a posibles riesgos de inhibición, se puede utilizar las actividades específicas que nos dan datos representativos a partir del cuarto y quinto día. Se puede utilizar las extracciones de ADN que en 5 horas tienen los resultados. En cuanto a los bioindicadores moleculares, primero se debe extraer el ADN para su duplicación genética por lo cual entre dos y tres días se podría tener el resultado. Según esto, el bioindicador más rápido es la extracción de ADN, sin embargo, este solo nos dice que cantidad de microorganismos total existe en el inóculo. Se podría relacionar este resultado con los análisis fisicoquímicos, ya que tienen una correlación positiva.

Como se establece en la tercera parte de la tesis, estos bioindicadores también pueden ser parte de un conjunto de procesos en sí, que terminan en la amplificación genómica mediante la qPCR. El orden sería la ejecución primero las actividades específicas para incentivar el crecimiento microbiano, luego tomar muestras en el momento antes de que el crecimiento se estabilice. Esta muestra será congelada y posteriormente analizada para la extracción de ADN. Luego se realiza el proceso de qPCR y la obtención de genes que se quieren analizar. Si la depuradora, por ejemplo, quiere realizar un histórico con las actividades específicas no se requiere demasiados materiales ni elementos.

Al llevar un estudio histórico podremos tomar decisiones sobre la alimentación del reactor o elegir mezclas en la codigestión, que puedan incrementar la producción de metano en el reactor. Para esto, primero se evalúan por cinco días el inóculo mediante las actividades específicas y paralelamente, se realiza el ADN y luego la qPCR. Con estos tres indicadores podremos saber cuál es la actividad de las metanogénicas y si existe abundancia de microorganismos. Sin embargo, se debe indagar más en estos bioindicadores, ya que se necesita más investigación en esta área para vincular completamente la microbiología con la función del proceso y llegar a un punto en el que se pueda lograr el manejo microbiano (Carballa, Lema, 2015)

El equipamiento necesario para trabajar en las estaciones depuradoras dependería de la información que quiere recoger el jefe de planta. Si solo se quiere realizar un diagnóstico del digestor para ver el estado de la digestión anaerobia, se podría realizar las actividades específicas y la extracción de ADN en varios puntos del reactor. Con esto se tendría un perfil vertical y se empezaría a realizar un histórico de estas pruebas. Para el bioindicador de las actividades específicas se necesitaría: viales de cristal, tapones para los viales, medidor de metano, sales de potasio para utilizarlas como tampón, una incubadora y por supuesto los materiales para realizar análisis fisicoquímicos. Para la extracción de ADN se sugiere comprar un Kit de extracción de ADN y un Nanodrop para su lectura.

Si por el contrario se quiere obtener información con la ayuda de la qPCR por medio de la ARNr 16S y la *mcrA* o la *aprA* para identificar microorganismos específicos, se recomienda realizar la extracción de ADN en el laboratorio de la EDAR y luego llevarlo a un laboratorio externo que tenga el servicio de biología molecular. Sin embargo, llegará un momento en que varias depuradoras cuenten con un laboratorio de biología molecular para realizar extracciones, qPCR y secuenciación. Por ejemplo, varias empresas están desarrollando equipos para secuenciar en miniatura, uno de ellos es el llamado Minion, el cual realiza la secuenciación del ADNc. Es un aparato pequeño fácil de tener en cualquier laboratorio que permitirá saber en unos días que orden de especie tienes en tu reactor y actuar de acuerdo con la abundancia real de las arqueas y bacterias existentes en el inóculo.

Otra forma de aplicar estos bioindicadores es mediante consultoras que puedan realizar estos análisis a las depuradoras interesadas. Para ello se debería tener un laboratorio de química en el cual se puedan realizar las actividades específicas con los siguientes elementos: Viales de cristal, tapones, medidor de metano, cristalería de laboratorio, una incubadora, un agitador mecánico, pH metro, y materiales para realizar DQO, AGV, SV y ST. Por otro lado, para la parte de biología molecular se debería tener un laboratorio exclusivo para este tipo de muestras, donde se realizarían las extracciones de ADN, la medición de ADN, y la cuantificación de genes en la qPCR. Para este laboratorio se necesitaría los siguientes equipos: Kit extracción ADN, Nanodrop, Mastercycler gradient, qPCR, primers, Maxter Mix, agua para qPCR, ependorf para qPCR, una campana de extracción exclusiva para biología molecular, micropipetas, matrices de qPCR y software para el equipo qPCR. Adicional a esto, se requerirá del permiso y licencia de funcionamiento del gobierno local, para este tipo de laboratorios.

Como se ha visto, existen varios caminos para aplicar estos bioindicadores en las EDARs y en depuradoras privadas. En este momento estas técnicas se investigan principalmente en reactores a escala de laboratorio y hasta ahora no se han utilizado en plantas de biogás a gran escala, pero representan enfoques prometedores para un control de proceso exitoso (Lebuhn et al., 2015). Por esto, es una gran oportunidad de negocio y una idea innovadora, llevar estos bioindicadores a escala real y utilizarlos para sacar el mejor provecho de nuestros digestores anaerobios, ya que existen digestores en muchas actividades económicas como en el sector agrario y ganadero. Son pocas las empresas que saben de esta herramienta, la cual puede darnos diagnósticos de nuestros inóculos y de cómo incrementar su eficiencia para producir más biogás y mantener los microorganismos en buenas condiciones. Por esto, la aplicación de bioindicadores como herramientas de control y evaluación de inóculos es una idea innovadora en este campo que seguramente será explotada en el futuro cercano.

## Bibliografía

A'cs N, Bagi Z, Rakhely G, Minarovics J, Nagy K, Kovacs KL. (2015). Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium. *Bioresour Technol* 186, 286–293.

Angelidaki I, Karakashev D, Batstone DJ, Plugge CM, Stams AJM. (2011) Chapter sixteen –biomethanation and its potential. In: Amy CR, Stephen WR (eds) *Methods in enzymology*, vol 494. Academic, New York, 327–351.

Angelidaki, I. and Ellegaard, L. (2002). Anaerobic digestion in Denmark: Past, present and future. p.129-138, In: *Anaerobic digestion for sustainability in waste (water) treatment and reuse*. Proceedings of 7th FAO/SREN-Workshop, 19-22 May 2002, Moscow, Russia.

Angelidaki, I., Ahring, B.K. (1997). Anaerobic digestion in Denmark. Past, present and future. X. Flotats, ed., III curso de Ingeniería Ambiental, Univ. de Lleida, octubre de 1997, 336-342.

Alvarado A, Montañez-Hernández LE, Palacio-Molina SL, Navarro R, Lievanos- Escareño MP, Balagur N (2014). Microbial trophic interactions and mcrA gene expression in monitoring of anaerobic digesters. *Front Microbiol* 5, 597.

Alonso Antonio (2017). Ensayo de estabilización y reparación de digestores anaerobios, con residuos industriales y agroalimentarios, en un proceso de codigestión anaerobia. Tesis Universidad de Sevilla, 45-46.

Anna Schnürer. (2016). *Biogas Production: Microbiology and Technology*, Adv Biochem Eng Biotechnol DOI: 10.1007/10\_2016\_5, Springer International Publishing Switzerland, 15-25.

Archer, D.B. (1983). The microbial basis of process control in methanogenic fermentation of soluble wastes. *Enzyme Microbial Technology*, 5, 162.

A, Reich U, Klocke M (2013). Metagenome and metaproteome analysis of microbial communities in mesophilic biogas-producing batch fermentation indicate concerted plant carbohydrate degradation. *Syst Appl Microbiol* 36(5), 330–338.

Azam S, Khadem AF, van Lier JB, Zeeman G, Plugge CM (2015). Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogas production, 2523–2564.

B. Meyer, J. Kuever Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding (*aprBA*) among sulfur oxidizing prokaryotes. *Microbiology*, 153 (2007), pp. 3478-3498.

Blanca Pérez-Uz, Lucia Arregui a, Pilar Calvo a, Humbert Salvador´, Natividad Fernandez c, Eva Rodriguez c, Andre´s Zornoza d, Susana Serrano (2010). Assessment of plausible bioindicators for plant performance in advanced wastewater treatment systems *Water research* 4, 506.

- Bendixen, H. J. (1994). Safeguards against pathogens in Danish biogas plants. *Water Science and Technology*, 30, (12), 171-180.
- Benito, C. (2016). Desarrollo de la tecnología BMP para ensayos de codigestión anaerobia de residuos agroalimentarios con fangos mixtos de EDAR. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla.
- Björnsson, L., Murto, M. and Mattiasson, B (2000). Evaluation of parameters for monitoring anaerobic co-digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54.
- Bin Dong, Jing Yi, Lingling Dai, Xiaohu Dai (2013). Evaluation of several DNA extraction methods for obtain total community DNA from anaerobic digestion sludge. *Procedia Environmental Sciences* 18, 856 – 863.
- Borja R, Rincón B, Raposo F, Sánchez E, Martín A. (2004). Assessment of kinetic parameters for the mesophilic anaerobic biodegradation of two-phase olive pomace, *International biodeterioration and biodegradation journal*, Vol 5, 71-78.
- Boe, K. (2006). Online Monitoring and Control of the Biogas Process. Technical University of Denmark, 25-28.
- Brambilla M, Romano E, Cutini M, Pari L, Bisaglia C (2013). Rheological properties of manure/biomass mixtures and pumping strategies to improve ingestate formulation: a review. *Trans ASABE* 56:1905–1920131.
- Cabezas A, de Araujo JC, Callejas C, Gale`s A, Hamelin J, Marone A, Sousa DZ, Trably E, Echebehere C (2015). How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process *Rev Environ Sci Biotechnol*. doi:10.1007/s11157-015-9380-8
- Can Liu, Huan Li, Yuyao Zhanga, Qingwu Chenb (2016) Characterization of methanogenic activity during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge, *Biochemical Engineering Journal*, 15 may, 96-100.
- Cárdenas-Cleves LM, Parra-Orobio BA, Torres-Lozada P; Vásquez-Franco (2016). Perspectivas del ensayo de Potencial Bioquímico de Metano - PBM para el control del proceso de digestión anaerobia de residuos. *rev.ion*;29(1), 95-108.
- Carballa LR, Lema JM (2015). Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus Marta. *Curr Opin Biotechnol* 33, 103–111.
- Cadi, Z. (1994). “Méthanisation en bioréacteur à membrane: application a un effluent de papeterie”, Tesis doctoral, Université Claude Bernard (Lyon).
- Cirne DG, Bjeornsson L, Alves M, Mattiasson B (2006). Effects of bioaugmentation by an anaerobic lipolytic bacterium on anaerobic digestion of lipid-rich waste. *J Chem Technol Biotechnol* 81:1745, 1752 159.
- Costa KC, Leigh JA (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Curr Opin Biotechnol* 29, 70–75.

Chiva Sergio, Berlanga José, Martínez Raúl, Climent Javier (2018). Depuración de aguas residuales, La codigestión: Revisión de una realidad muy ventajosa en los aspectos medioambientales y económicos de la digestión anaerobia. Publicaciones de la Universitat de Jaume, 210-211.

Damien J. Batstone, Yang Lu, Paul D (2015). Jensen, Impact of dewatering technologies on specific methanogenic activity. *Water research* 82, 78-81.

De Vrieze JD, Saunders AM, He Y, Fang J, Nilesen PH, Verstaete W, Boon N (2015). Ammonia and temperature determine the potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. *Water Res* 75, 312–323.

Dong Lia, Lin Chena, Xiaofeng Liua, Zili Meib, Haiwei Renc, Qin Caoa, Zhiying Yana. (2017). Instability mechanisms and early warning indicators for mesophilic anaerobic digestion of vegetable waste, *Bioresource Technology*, No 245, 90–97.

Dearman, B., Marschner, P. and Bentham, R. H. (2006). Methane production and microbial Community structure in single-stage batch and sequential batch systems anaerobically codigesting food waste and biosolids. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 589-596.

De Vrieze J, Verstraete W, Boon N (2013). Repeated pulse feeding induces functional stability in anaerobic digestion. *J Microbial Biotechnol* 6, 414–424.

Drosg B (2013). Process monitoring in biogas plants. IEA Bioenergy Task 37, Technical Brochure.

Dong Li, Lin Chena, Xiaofeng Liua, Zili Meib, Haiwei Renc, Qin Caoa, Zhiying Yana, (2017). Instability mechanisms and early warning indicators for mesophilic anaerobic digestion of vegetable waste, *Bioresource Technology* 245, 90–97.

Drake HL, Grossner AS, Daniel SL (2008). Old acetogens, new light. *Ann N Y Acad Sci* 1125, 100–128.

Drake HL, Keusel K, Matthies C (2002). Ecological consequences of the polygenetic and physiological diversities of acetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 203–213.

Dugba, P.N. and Zhang, R. (1999). Treatment of dairy wastewater with two-stage anaerobic sequencing *Bioresource Technology*, 68, 225-233.

Dziewit L, Pyzik A, Romaniuk K, Sobczak A, Szczesny P, Lipinski L, Bartski D, Drewniak L (2015) Novel molecular markers for the detection of methanogens and phylogenetic analyses of methanogenic communities. *Front Microbiol* 6(649):1–11.

EurObserv'ER (2019). European Union Biogas Barometer. URL: [http://www.energiesrenouvelables.org/observ-er/stat\\_baro/observ/baro179\\_a.pdf](http://www.energiesrenouvelables.org/observ-er/stat_baro/observ/baro179_a.pdf).

Ferry JG (2011). Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex. *Curr Opin Biotechnol* 22, 351–357.

Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(1), 13-38.

FERRY, J.G. y KASTEAD, K.A., 2007. Methanogenesis. *Archaea: Molecular and Cellular Biology*. S.l.: s.n., pp. 288-314.

Felchner-Zwirello M, Winter J, Gallert C (2013). Interspecies distances between propionic acid degraders and methanogens in syntrophic consortia for optimal hydrogen transfer. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(20), 9193–9205.

Fotidis IA, Wang H, Fiedel N-R, Luo G, Karakashev DB (2014). Bioaugmentation as a solution to increase methane production from an ammonia-rich substrate. *Environ Sci Tech* 48, 7669–7676 157.

Flotats, X., Campos, E. (2005). Procesos biológicos: digestión anaerobia y compostaje, Cap. 9. In Elías X. Ed., Tratamiento y valorización energética de residuos. Díaz de Santos Ed, Barcelona. ISBN: 84-7978-694-9, 617-686.

Gagnon, N., Barret, M., Topp, E., Kalmokoff, M., Massé, D., Masse, L., & Talbot, G. (2011). A novel fingerprint method to assess the diversity of methanogens in microbial systems. *FEMS microbiology letters*, 325(2), 115-122.

Garcés, G., Wilderer, P. A., Munch, J. C., Horn, H. & Lebuhn, M. Evaluation of two methods for quantification of hsp70 mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. *Water Research* 43 (10), 2669–2678.

Gómez-romero j, González, García a., Chairez i, torres l, García-PEÑA EI. (2014). Selective adaptation of an anaerobic microbial community: Biohydrogen production by co-digestion of cheese whey and vegetables fruit waste. *Hydrogen Energy*, 39, 12541–50.

Guilherme H.R. Braz, Nuria Fernandez, Gonzalez, Juan M. Lema, Marta Carballa (2019) Organic overloading affects the microbial interactions during anaerobic digestion in sewage sludge reactors. *Chemosphere* 222, 323-332.

Gregersen, K. H. (2003) *Okonomien biogas fællesanlæg, Udvikling og status medio 2002*, Report no.150. Institute of Food and Resource Economics, Rolighedsvej 25, DK 1958, Frederiksberg C, Denmark.

Gruninger RJ, Puniya AK, Callaghan TM, Edwards JE, Youssef N, Dagar SD, Fliegerova K, Griffith GW, Forster R, Tsang A, Mcallister T, Elshahed MS (2014). Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol* 90, 1–17.

H. Campaña, A. Airasca, M. Uribe Echevarría, V. Monserrat, P. Benedetti (2015). Enzimas como indicadores bioquímicos de evolución de procesos de digestión anaerobia. *Asociación Argentina de Ingenieros químicos*, 1-10.

Hansen, K. H., Angelidaki, I. and Ahring, B. K. (1999). Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Research*, 33, (8), 1805-1810.

Hernández Francisco (2015). Biogás: 10 casos de éxito en el sector industrial: Industrias: curtiembre, láctea, cárnica, golosinas, cervecera, destilería de whisky, vitivinícola, procesamiento de verduras y frutas y papelera 8, 6.

Huyard, A., Ferran, B. and Audic, J. M. (2000). The two-phase anaerobic digestion process: sludge stabilization and pathogens reduction. *Water Science and Technology*, 42, (9), 41-47.

Hussain A, Dubey SK (2014). Specific methanogenic activity test for anaerobic treatment of phenolic wastewater. *Desalination and water Treatment*. Pp. 37-41. Epstein SS (2013) The phenomenon of microbial uncultivability. *Curr Opin Microbiology*, 116, 636–642.

Hussain A, Dubey SK (2015). Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. *Apply water science* 7, 536-542.

Hu, Z. H., Yu, H. Q. and Zhu, R. F. (2005). Influence of particle size and pH on anaerobic degradation of cellulose by ruminal microbes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55, 233-238.

Institut Català d'Energia. (2007). Producción de biogás per codigestió anaeròbia, 12- 32.

IRTA. (2008). Procedimientos de trabajo en laboratorio. Protocolo del ensayo de actividad metanogénica.IT-AS-003, 01, 1-9.

Javed M, Tare V (1999). Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water SA* 25(3), 345–350.

James Rosenblum, Michael Bisesi, Juan Castano, Abigal Tamkin, Richard Ciotola, Jiyoung Lee and Jay Martin (2015). Influence of seasonal fluctuation and loading rates on microbial and chemical indicators during semi-continuous anaerobic digestion. *Environmental technology*.36, 1308-1318.

J. Jiménez a, Y. Guardia-Puebla b, M.E. Cisneros-Ortiz c, J.M. Morgan-Sagastume c, G. Guerra d, A. Noyola c, (2015). Optimization of the specific methanogenic activity during the anaerobic co-digestion of pig manure and rice straw, using industrial clay residues as inorganic additive *Chemical Engineering Journal* 259, 703–714.

Kashyap, D. R., Dadhich, K. S. and Sharma, S. K. (2003). Biomethanation under psychrophilic conditions: a review. *Bioresource Technology*, 87, 147-153.

KIELY (1999). Gerard. *Ingeniería Ambiental*. Madrid: Mc Graw Hill, 764.

E. Koornneef, A.J.L. Macario, J.T.C. Grotenhuis, E.C. de Macario (1990) Methanogens revealed immunologically in granules from five upflow anaerobic sludge blanked bioreactors grown on different substrates. *Fems Microbiol. Ecology*, 73, 225-230.

Labatut RA, Angenent LT, Scott NR (2014). Conventional mesophilic vs. thermophilic anaerobic digestion: a trade-off between performance and stability? *Water Res* 53:249–258.



Lettinga, Gatzke (1994). Anaerobic sewage treatment. A practical guide for regions with a hot climate. Boston: Edition Jhon wiley and sons, 44-46.

Lebuhn M, WeS, Munk B, Guebitz GM (2015). Microbiology and molecular biology tools for biogas process analysis, diagnosis and control. *Biogas Sci Technol Ser Adv Biochem Eng Biotechnol* 151, 1–40.

Lebrato, J. (1990). Obtención de biogás a partir de residuos orgánicos urbanos: Experiencias en lecho fluidizado. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla.

Lozanovski A, Linder JP, Bos U (2014). Environmental evaluation and comparison of selected industrial scale biomethane production facilities across Europe. *Int J Life Cycle Assess* 19, 1823–1832.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microb Mol Biol Rev* 66, 506–577.

López Matilde, Pilar M. Villa Gómez, Rigoberto Escobedo (2004). El comportamiento de reactores anaerobios de residuos sólidos a través de ensayos microbiológicos, *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 35, No. 3, 179-185.

Li, L., He, Q.M., Wei, Y.M., He, Q., Peng, X.Y (2014). Early warning indicators for monitoring the process failure of anaerobic digestion system of food waste, *Bioresour Technol*, No 171, 491–494.

López Matilde, Pilar M. Villa Gómez, Rigoberto Escobedo (2004). El comportamiento de reactores anaerobios de residuos sólidos a través de ensayos microbiológicos, *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 35, No. 3, 179-185.

Mauky E, Jacobi HF, Liebetrau J, Nelles M (2015). Flexible biogas production for demand driven energy supply – feeding strategies and types of substrates. *Bioresour Technol* 178, 262–269 135.

Madigan, Michael, John Martinko y Jack Parker (1998). *Brock Biología de los Microorganismos*. 8º Edición, traducido de *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, Inc.

Meyer B, Kuever J. Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73:7664–7679.

Min Zhanga, Yi Zhanga, Zhengwen Lia, Chen Zhangb, Xuejun Tanb, Xiang Liua, Chunli Wana, Xue Yangb, Duu-Jong Leec (2019). Anaerobic co-digestion of food waste/excess sludge: substrates – products transformation and role of NADH as an indicator, *Journal of Environmental Management* 232,197–206.

Mori K, Kamagata Y (2014). The challenges of studying the anaerobic microbial world. *Microbes Environ* 29(4), 335–337

- Moletta, R. (1993). “La digestión anaérobica: du plus petit au plus grand”. *Biofutur*, Enero, 16-25.
- Mösche, M. y Jördening, H. (1999). “Comparison of different models of substrate and product inhibition in anaerobic digestion”. *Water Research*, 33(11), 2545-2554.
- 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°C. *FEMS Microbiol Ecol* 48, 369–378.
- McGenity TJ (eds) (2016) *Hydrocarbon and lipid microbiology protocols*, Springer protocols handbooks, Springer, Berlin. doi: 10, 20-14.
- M. Soto, R Méndez and J.M Lemas (1999). Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up, Pergamon Press Ltd, Vol. 27, 1361-1376.
- Møller, H. B., Sommer, S. G. and Ahring, B. K. (2004). Methane productivity of manure, straw and solid fraction of manure. *Biomass and Bioenergy*, 26, 485-495.
- Morris BEL, Henneberger R, Huber H, Moissl-Eichinger C (2013). Microbial syntrophy: interaction for common good. *FEMS Microbiol Rev* 37, 384–406.
- M.W. Friedrich. Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of adenosine-5'-phosphosulfate reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *J. Bacteriol.*, 184 (2002), pp. 278-289.
- Munk, C Bauer, A Gronauer and M. Leubhn. (2012) A metabolic quotient for methanogenic Archaea. *Water Science technology*.66.11, 45-48.
- Nakamura K, Tamaki H, Kang MS, Mochimaru H, Lee S-T, Nakamura K, Kamagata Y (2011). A six-well plate method: less laborious and effective methods for cultivation of obligate anaerobic microorganisms. *Microbes Environ* 26(4), 301–306.
- Narihiro T, Kamagata Y (2013). Cultivating yet-to-be cultivated microbes: the challenge continues. *Microbes Environ* 28(2):163–165.
- Na Duan, Doujiao Zhang, Benyamin Khoshnvisan, Panagiotis G. Kougias, Laura Treu, Zhidan Liu, Cong Lin, Hongbin Liu (2020). Human waste anaerobic digestion as a promising low carbon strategy: Operating performance, microbial dynamics and environmental footprint. *Journal of Cleaner Production*. 256, 9.
- Nielsen, H. B., Mladenovska, Z., Westermann, P. and Ahring, B. K. (2004). Comparison of two stage thermophilic (68°C/55°C) anaerobic digestion with one-stage thermophilic (55°C) digestion of cattle manure. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 291-300.
- Ortiz Verónica (2011). Puesta a punto de una metodología para la determinación de la actividad metanogénica específica de un fango anaerobio mediante el sistema Oxitop. Influencia de las principales variables experimentales, Universidad politécnica de Valencia, 57-67.

O. Ince, K. Anderson (1995). Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during star up of an anaerobic digestion system, Pergamon, Vol 29, No1, 349-355.

Pavan, P., Battistoni, P., Cecchi, F. and Mata-Alvarez, J. (2000). Two-phase anaerobic digestion of source sorted OFMSW (organic fraction of municipal solid waste): performance and kinetic study. *Water Science and Technology*, 41, (3), 111-118.

Poszytek K, Ciezkowak M, Sklodowska A, Drewniak L (2016). Microbial consortium with high cellulolytic activity (MCHCA) for enhanced biogas production. *Front Microbiol* 7, 324 156.

Quiñones TS, Pleochl M, Budde J, Heiermann M (2011). Enhanced methane formation through application of enzymes: results from continuous digestion tests. *Energy Fuels* (25), 5378–5386.

Quijien (2020) RNeasy® PowerMicrobiome® Kit Handbook For the isolation of total RNA from stool and gut material, Alemania, Enero.

Rice, e., Baird, r., Eaton, a. y Clesceri, L., (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. S.

Romero-Geuiza MS, Vila J, Mata-Alvarez M, Chimenos JM, Astal S (2016). The role of additives on anaerobic digestion: a review. *Renew Sustain Energy Rev* 58,1486–1499.

Rui J, Li J, Zhang S, Yan X, Wang Y, Li X (2015) The core populations and co-occurrence patterns of prokaryotic communities in household biogas digesters. *Biotechnol Biofuels* 8 (158):1–15.

Sahlstrom LA (2003). A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresour Technol* 87,161–166 130.

Sambrook, J., Fritsch, EF. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. Cold spring harbor laboratory press New York.

Soto, R Méndez and J.M Lemas (1993). Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up, Pergamon Press Ltd, Vol. 27, 1361-1376.

Sun L, Pope PB, Eijsink VGH, Schnürer A (2015). Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure. *J Microbial Biotechnol* 8, 815–827.

SUN, L., MÜLLER, B., WESTERHOLM, M. y SCHNÜRER, A., 2014. Syntrophic acetate oxidation in industrial CSTR biogas digesters. *Journal of Biotechnology*, vol. 171, no. 1, pp. 39-44. ISSN 01681656. DOI 10.1016/j.jbiotec.2013.11.016.

Schmidt, Jens, Angelidaki, I., Ahring, B. (1999). Anaerobic digestion of olive mill effluents together with different wastes. Barcelona: II International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste.

Stams, A. J. M., Plugge, C. M., De Bok, A. F. M., Van Houten, B. H. G. W., Lens, P., Dijkman, H. and Weijma, J. (2005). Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors. *Water Science and Technology*, 52, (1), 13-20.

Traversi Devora, Silvia Villa<sup>1</sup>, Marco Acri<sup>2</sup>, Biancamaria Pietrangeli, Raffaella Degan, Giorgio Gilli (2011). The role of different methanogen groups evaluated by Real-Time qPCR as high efficiency bioindicators of wet anaerobic co-digestion of organic waste. *AMB Express*, 1,28.

Universidad Politécnica de Catalunya (2007). Modulo 7 “Energía de la biomasa” España: UPC, 45.

Ueno, Y. and Tataru, M. (2008) Microbial population in a thermophilic packed-bed reactor for methanogenesis from volatile fatty acids. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 302–308.

Vanwonterghem I, Jensen PD, Ho DP, Batstone DJ, Tyson GW (2014). Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Curr Opin Biotechnol* 27, 55–64

Van Velsen, A. (1980). Effect of feed composition on digestion performance. In *anaerobic Digestion*, 120.

Van Lier, J. B. (1995). Thermophilic anaerobic wastewater treatment; Temperature aspects and process stability. Ph.D. dissertation, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

Venkiteshwaran, K., Bocher, B., Maki, J., Zitomer, D., 2015. Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function. *Microbiol. Insights* 8 (S2), 37–43.

Westerholm M, Müller B, Isaksson I, Schnürer A (2015). Trace element and temperature effects on microbial communities and links to biogas digester performance at high ammonia levels. *Biotechnol Biofuels* 8, 154.

Xavier Flotats, Belén Fernández (2008). Tratamiento anaerobio de residuos de la industria alimentaria. CIMNE. II congreso iberoamericano sobre seguridad alimentaria, 1-8.

Yi Li a, Hailan Jin a, Hongxia Li b, Jianfen Li b, (2017). Study on indicators for on-line monitoring and diagnosis of anaerobic digestion process of piggery wastewater, *Environmental Technology & Innovation* 8, 423–430.

Yamaguchi, T., Harada, H., Hisano, T., Yamazaki, S. and Tseng, I.-C. (1999) Process behavior of UASB reactor treating a wastewater containing high strength sulfate. *Water Research*, 33, (14), 3182-3190.

Zhang J, Go R-B, Qiu Y-L, Qiao J-T, Yuan X-Z, Shi X-S, Chuan-Shui Wang C-S (2015). Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresour Technol* 179, 306–313 155.

Zhang Tong. Application of molecular methods for anaerobic technology, (2010). Environmental anaerobic technology. Imperial College Press, 215-220.