

Caracterización microbiológica y molecular de la comunidad anaerobia durante la co-fermentación de residuos agropecuarios con adición de arcillas para la obtención de metano

Janet Jiménez-Hernández, Gilda Guerra-Rivera*, Juan Manuel Morgan-Sagastume, Adalberto Noyola-Robles**, Susanne Theuerl***, Michael Klocke*****

Centro de Estudios de Energía y Procesos Industriales. Universidad de Sancti Spíritus. Cuba. Ave. de los Mártires no. 360. Código Postal 60100. janet@suss.co.cu *Facultad de Biología. Universidad de la Habana. Calle 25 entre calles I y J, Plaza de la Revolución. La Habana. Código Postal: 10600, Cuba. **Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar S/N Edificio 5, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Código Postal 04510, México, D.F. ***Leibniz Institute for Agricultural Engineering Potsdam-Bornim (ATB), Department Bioengineering, Max-Eyth-Allee 100, D-14469 Potsdam, Alemania.

Recibido: 3 de marzo de 2013.

Aceptado: 14 de noviembre de 2013.

Palabras clave: comunidad anaerobia, actividad metanogénica, co-fermentación, T-RFLP.

Key words: anaerobic community, methanogenic activity, co-fermentation, T-RFLP.

RESUMEN. En la fermentación anaerobia de residuos agropecuarios para la obtención de metano influyen de manera determinante las condiciones nutricionales para el establecimiento y desarrollo de la microbiota. Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la co-fermentación anaerobia de estiércol y paja residual agrícola con adición de arcillas sobre la diversidad de la comunidad microbiana que se establece a diferentes temperaturas. Para ello se desarrollaron cultivos en régimen batch, a 35 y 55 °C y se analizó la actividad metanogénica y no metanogénica, el crecimiento microbiano en medios con sustratos diferenciales (metanol, acetato y formato/H₂-CO₂) y mediante métodos moleculares como el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP). Las actividades enzimáticas hidrolíticas, glucolíticas y metanogénicas revelaron el predominio de poblaciones específicas en las condiciones de adición de arcillas y temperatura experimentadas. Las actividades hidrolíticas utilizando el sustrato celulosa mostró que en condiciones termofílicas se favorecen las poblaciones de bacterias celulolíticas termófilas. Las actividades hidrolíticas y glucolíticas fueron diferentes en ambas temperaturas. El crecimiento diferencial y el análisis de T-RFLP demostraron el efecto de la co-fermentación de estiércol y paja con adición de arcillas sobre la diversidad microbiana que se establece a las dos temperaturas. Ambos ensayos sugirieron el predominio de las metanógenas acetotróficas del orden de *Methanosarcinales* (géneros *Metanosarcinas* y *Metanosaetas*) a 35 °C, mientras que a 55 °C se constató un predominio de metanógenas hidrogenotróficas de los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales*.

ABSTRACT. The anaerobic fermentation of agriculture and manure wastes for methane production depends on nutritional conditions to establish and develop the microbial community. Hence the objective of this work was to analyze the effect of the anaerobic co-fermentation of manure and straw with clay addition on microbial community diversity at different temperature conditions. Anaerobic cultures were performed in batch at 35 and 55 °C. It was analyzed the anaerobic sludge by measuring methanogenic and non-methanogenic activity in microbial growth with differential substrates (methanol, acetate and formic acid/H₂-CO₂) as well as applying molecular techniques such terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). The results showed that methanogenic and non-methanogenic activity illustrated the microbial community behavior under specific temperature and mineral addition assayed. The hydrolytic activities using cellulose as substrate showed that under thermophilic condition cellulolytic bacteria was favored. The hydrolytic and glycolytic activities were different and at both temperatures. The differential growth and the T-RFLP analysis results showed the effect of the anaerobic co-fermentation of manure and straw with clay addition on microbial community diversity at different temperature conditions. Both assays suggest the prevalence of acetotrophic methanogens in mesophilic condition, belonging to the order *Methanosarcinales* (genera *Metanosarcina* and *Methanosaeta*) whereas at thermophilic conditions it was shown the prevalence of *Methanomicrobiales* and *Methanobacteriales* orders.

INTRODUCCIÓN

La fermentación anaerobia (FA) se ha convertido en una estrategia sustentable para el manejo adecuado de residuos, dado por el aprovechamiento energético de estos que resulta de la oxidación completa hasta la formación de biogás (principalmente metano y dióxido de carbono), además de la obtención de un lodo residual con propiedades bio-fertilizantes.^{1,2} El complejo grupo de bacterias y archaeas que realizan el proceso de fermentación es muy sensible a los cambios ambientales.^{3,4} La eficiencia de este proceso depende, por tanto, de la estabilidad de la población mixta de bacterias y archaeas anaerobias cuyo desbalance puede causar un rápido incremento en la concentración de intermediarios metabólicos (como los ácidos grasos volátiles), con la consecuente disminución en las actividades hidrolíticas acidogénicas y metanogénicas.^{5,6}

Los microorganismos metanogénicos son más sensibles a cualquier cambio en las condiciones ambientales y nutricionales que el resto de los grupos tróficos presentes en la FA,⁷ por lo que para mejorar este proceso es necesario controlar tales condiciones. La temperatura constituye un factor clave para las bacterias y las archaeas metanogénicas.⁸ La mayoría de las aplicaciones de la FA se han llevado a cabo en ambientes mesofílicos (30 a 40 °C) o termofílicos (50 a 60 °C). La FA termofílica es tan estable como la mesofílica, e incluso con ventajas como: gran velocidad de degradación, mejor separación sólido-líquido, mejor calidad microbiológica del lodo resultante, etc.⁹ Estas ventajas se fundamentan en la acelerada transferencia de H₂ interespecífica que incrementa la velocidad de reacción y en general, del metabolismo, por lo que aumenta la metanogénesis y disminuye el tiempo de retención hidráulico (TRH) en los reactores anaerobios.⁹ Para el tratamiento de residuos sólidos, sobre todo los agrícolas de naturaleza lignocelulósica, la etapa termofílica favorecería la hidrólisis de estos compuestos complejos.¹⁰ La concentración de sustrato y su naturaleza también afectan la actividad enzimática de todas las etapas y por ende, la formación del metano.⁵ A pesar de los avances en tecnología, monitoreo y control de la FA, es indispensable conocer la correlación entre la dinámica de esta comunidad microbiana y los parámetros operacionales del proceso,^{1,4} a fin de aumentar su eficiencia.

En este sentido, diferentes métodos moleculares, han permitido un mayor acercamiento a la fisiología de los microorganismos que participan en este proceso.^{4,11} El análisis de los ecosistemas utilizando métodos microbiológicos ha sido criticado en el caso de los ambientes anaerobios, debido al difícil cultivo de estos microorganismos, sin embargo⁷ la utilización de técnicas de cultivo sustrato-específicas ha sido exitosa,¹² las cuales, unidas al análisis molecular brinda una mejor interpretación de las condiciones fisiológicas y bioquímicas necesarias para la microbiota anaerobia. El análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción terminales (T-RFLP, por sus siglas en inglés) es una herramienta molecular efectiva para determinar la composición de la comunidad microbiana y la abundancia relativa de las poblaciones respectivas.^{13,14} Esta herramienta ha sido aplicada exitosamente en diferentes ecosistemas como los reactores metanogénicos.¹⁵⁻¹⁷

El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar la comunidad microbiana anaerobia que lleva a cabo la co-fermentación de sustratos complejos como el estiércol porcino y la paja de arroz con adición de arcillas residuales industriales, a diferentes temperaturas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de inóculos y sistema de fermentación.

El lodo anaerobio se obtuvo de experimentos en botellas serológicas de 60 mL, utilizando medio mínimo de crecimiento, reducido en atmósfera de nitrógeno, que contenía K₂HPO₄ 0,50 g · L⁻¹, KH₂PO₄ 0,33 g · L⁻¹, NH₄Cl 0,20 g · L⁻¹, MgCl₂·6H₂O 0,10 g · L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0,15 g · L⁻¹, NaCl 0,10 g · L⁻¹, FeSO₄·6H₂O 0,01 g · L⁻¹, Na₂S·9H₂O 0,02 g · L⁻¹, NaHCO₃ 3,0 g · L⁻¹; disolución de vitaminas 10 mL·L⁻¹, disolución de micronutrientes 10 mL · L⁻¹, Resazurina 1 mL · L⁻¹; Cisteína 1 g · L⁻¹ y Na₂S como disolución reductora. Se utilizó como inóculo lodo (mesofílico y termofílico) de reactores de laboratorios alimentados con estiércol porcino. Los sustratos utilizados fueron: estiércol porcino diluido con agua del grifo (1 : 3), residual agrícola de la cosecha de arroz (paja) y arcillas residuales del proceso de purificación de aceites básicos industriales. Las botellas se inocularon en cámara anaerobia y se incubaron a (35 ± 2) °C y (55 ± 2) °C, respectivamente, durante 21 d. Las concentraciones de los sustratos fueron, en mesofilia: 28,4 g SSV · L⁻¹ de estiércol porcino, 17,6 g SSV · L⁻¹ de residual agrícola y 8,3 g SST · L⁻¹ de arcillas, en termofilia: 20,1 g SSV · L⁻¹ de estiércol porcino, 10,2 g SSV · L⁻¹ de residual agrícola y 3,1 g SST · L⁻¹ de arcillas. Se utilizaron tres réplicas de cada condición y controles de inóculo sin sustrato. Para monitorear los sistemas de fermentación se determinaron los sólidos suspendidos totales (SST), suspendidos volátiles (SSV), el pH y la alcalinidad según los métodos estándares.¹⁸ Se determinó además la relación de alcalinidades (α) como el cociente de la alcalinidad a 5,75 entre la alcalinidad a 4,30 o alcalinidad total. La producción de metano se cuantificó por cromatografía de gases (cromatógrafo Fisher Gas Partitioner Modelo 1200, con detector de conductividad térmica, de doble columna Porapak Q y malla molecular SA y Helio como gas acarreador).

Actividad metanogénica específica (AME)

Se calculó la producción total de metano en la fase gaseosa de cada botella y se tomó la pendiente en la etapa exponencial de producción acumulada de metano en cada condición, la cual se asume que la velocidad máxima de formación de metano. El valor de la pendiente dividido por el valor de los g SSV presentes de microorganismos (inóculo) nos indica el valor de la AME, la cual fue expresada en g CH₄-DQO · g SSV⁻¹ · d⁻¹, utilizando los factores de conversión correspondientes.

Análisis microbiológico

La microbiota crecida en cada botella durante 21 d, se utilizó para re-inocular botellas similares pero con medio que contenía además de los minerales antes mencionados, sustratos específicos para distinguir los grupos tróficos.

Los sustratos utilizados fueron: celulosa (2,2 g · L⁻¹), sacarosa (2,2 g · L⁻¹), glucosa (2,2 g · L⁻¹), acetato de sodio (2,2 g · L⁻¹), metanol (2 %), mezcla de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (2 : 1 : 1), y una mezcla de formiato de sodio [2 % (p/v) y H₂-CO₂ (80:20 %)]. Todas las soluciones de sustrato fueron ajustadas previamente a pH entre 6 y 7. Se inoculó en cámara anaerobia con 1 g SSV · L⁻¹ del lodo mesofílico o lodo termofílico y se incubaron a la temperatura correspondiente. Para el caso de los grupos tróficos hidrolíticos-fermentativos y acetogénicos (sustrato: celulosa, sacarosa y glucosa) se determinó la concentración de azúcares reductores según el método Dubois (fenol-sulfúrico).¹⁹ Para los grupos acidogénicos y metanogénicos se cuantificó la producción de metano por cromatografía de gases y se determinó la AME.

Análisis molecular. Extracción de ADN y amplificación del gen *arnr 16S*.

Se aisló el ADN metagenómico utilizando el juego de reactivos extracción, Power Soil DNA Kit (Mo Bio Laboratories Inc., USA), según las instrucciones del fabricante. La amplificación del gen *ARNr 16S* de bacterias se realizó utilizando los cebadores 27f (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3')^{20,21} marcados en el extremo terminal 5' con indodicarbocianina (Cy5) y el cebador 926r (5' CCGTCAATTCMTTTRAGTTT 3')^{22,23}. Cada reacción contenía disolución amortiguadora de la enzima recombinante Taq polimerasa (1X), MgCl₂ (2 mmol . L⁻¹), cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP, 0,2 mmol . L⁻¹), cada cebador (0,4 μmol . L⁻¹), 1 UI de la enzima recombinante Taq polimerasa y 1 μL de ADN molde (aprox. 10 ng). El programa fue el siguiente: desnaturalización a 95 °C, 3 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C, 30 s alineamiento a 51 °C, 30 s, y elongación a 72 °C, 90 s. Posteriormente una etapa de extensión final a 72 °C, 8 min. Se utilizaron como controles positivos ADN genómico de cultivos puros de *Clostridium tyrobutyricum* (DSM 2637), *Escherichia coli* (DSM 1116), *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50090) y *desulfosarcina variabilis* (DSM 2060).

Para los genes *ARNr 16S* de archaeas se utilizaron los cebadores Ar109f (5' ACKGCTCAGTAACACGT 3')²⁴ marcado en el extremo terminal 5' con Cy5 y el cebador Ar912r (5' CTCCCCGCCAATTCCTTTA 3').²⁵ Las condiciones de reacción fueron similares a las descritas para bacterias, pero en este caso, se utilizaron 2,5 mmol . L⁻¹ de MgCl₂, y la temperatura de alineamiento fue 52 °C en 28 ciclos. Se utilizaron como controles positivos ADN genómico de cultivos puros de *Methanoculleus bourgenis* (DSM 3045), *Methanoculleus marisnigri* (DSM 1498), *Methanofollis liminatans* (DSM4140), *Methanomicrobium mobile* (DSM 1539) y *Methanospirillum hungatei* (DSM 864). Se utilizaron tres repeticiones para cada reacción de PCR. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el juego de reactivos QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) según las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración de cada producto de PCR por fotometría utilizando un Nanofotómetro (Implen, München, Germany). Todos los reactivos fueron suministrados por FERMENTAS, St. Leon-Rot, Germany y los cebadores por Biomers, Ulm, Germany.

Análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos terminales de restricción.

Aproximadamente 250 ng de cada producto de PCR fue digerido con 10 UI de cada una de las enzimas de restricción *MspI* y *Hin6I* (para fragmentos de bacterias) y *AluI* (para los fragmentos de archaea), en un volumen total de 20 μL a 37 °C por 4 h. Todas las enzimas fueron suministradas por FERMENTAS, St. Leon-Rot, Germany. Se utilizaron tres réplicas por cada producto de PCR procesado. Posteriormente, 0,5 μL de cada muestra de fragmentos obtenidos de la digestión, marcado en el extremo terminal 5' con Cy5 [fragmentos de restricción terminales, (FTs)], fueron separados por electroforesis capilar (GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System, Beckman Coulter, Krefeld, Germany, con detector de fluorescencia, 4,8 kV, 70 min). El análisis del electrofenograma se realizó utilizando la herramienta de software libre *T-REX*, disponible en línea: <http://trex.biohpc.org/>.²⁶ Para el subsecuente análisis, se consideraron los FTs que representaban más del 1 % de abundancia relativa en cada muestra.

Análisis estadístico.

Se aplicó la prueba t de Student con un nivel de confianza del 95 % (-p < 0,05), para evaluar la relación entre los valores de AME obtenidos en ambas temperaturas. La riqueza de especies (*Rr*) fue determinada según la metodología propuesta por Marzorati y colaboradores,²⁷ basado en la hipótesis de que cada FT correspondía al menos a una especie. La diversidad de bacterias se calculó según el índice de Shannon (*H*),²⁸ cuyo análisis de varianza (*VarH*) también fue determinado. Para evaluar la uniformidad de la distribución de las especies, se calculó el índice de equidad de Pielou²⁹ como el cociente de *H* y el valor máximo de *H* esperado (*H_{max}*). Para determinar la similitud entre la composición de la comunidad de cada sistema de fermentación se determinó el coeficiente de Jaccard según Marzorati y cols.²⁷

RESULTADOS

La co-fermentación de estiércol y paja con adición de arcillas (co-ferm EPA) en régimen *batch* indicó que la formación de metano fue diferente en cada temperatura (Fig. 1). En mesofilia (co-ferm EPA a 35 °C) se observó una fase de latencia de 10 d y la producción acumulada de metano superó los 220 mL . g_{SV}⁻¹. En termofilia (co-ferm EPA a 55 °C) la fase de latencia fue menor (4 d) y la producción acumulada de metano no superó los 185 mL.gSV⁻¹. Sin embargo, la AME calculada a partir de las gráficas de producción acumulada de metano (Fig. 1), cuyos valores promedios de 1,23 ± 0,41 para la co-ferm EPA a 35 °C y de 1,35 ± 0,26 para la co-ferm EPA a 55 °C (valor medio de AME ± desviación estándar) no mostraron diferencias significativas entre ambas temperaturas, según la prueba t-Student aplicada con un nivel de confianza del 95 %. En general, la producción de metano y los valores de AME, unido a la concentración de AGVs (< 150 ppm), el pH (6,9 - 8,0) y la α (0,65 - 0,83) indicaron la estabilidad de los procesos en cada botella y la factibilidad del uso del co-sustrato paja y las arcillas para estimular la fermentación anaerobia de estiércol porcino.³⁰

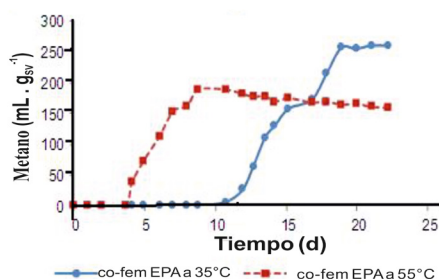


Fig. 1. Producción acumulada de metano durante la co-fermentación de estiércol y paja con adición de arcillas (co-ferm EPA) en régimen *batch* a 35 y 55 °C.

Análisis microbiológico.

La microbiota generada en estas botellas (co-ferm EPA) fue re-inoculada en medios de cultivo con los sustratos diferenciales para discernir los posibles grupos microbianos presentes en ambos ecosistemas (mesófilos o termófilos). Los grupos tróficos hidrolítico, y fermentativos mostraron similares actividades glucolíticas y sacarolíticas (Fig. 2) en ambas temperatura. Sin embargo la actividad celulolítica del lodo mesófilo (Tabla 1) no superó los 3 g DQO.g⁻¹.d⁻¹; mientras que las actividades hidrolíticas del lodo termófilo fueron similares que a las informadas por los autores.^{31,32}

Tabla 1 Actividades enzimáticas de la microbiota crecida en mesofilia y termofilia.

Actividades enzimáticas (g DQO.g ⁻¹ .d ⁻¹)	Microbiota mesófila	Microbiota termófila
Hidrolítica		
celulolítica	2,9 ± 0,2	13,8 ± 2,3
sacarolítica	7,4 ± 1,2	16,5 ± 2,2
Glucolítica	8,0 ± 1,3	17,2 ± 2,9

La actividad celulolítica fue mayor en termofilia debido probablemente al desarrollo de bacterias termófilas del phylum *Firmicutes*, frecuentes en estos ecosistemas.¹⁷ Este resultado es particularmente atractivo para la bioconversión de residuos lignocelulósicos y supone una ventaja para aumentar la biodegradabilidad anaerobia de estos compuestos complejos.¹⁰

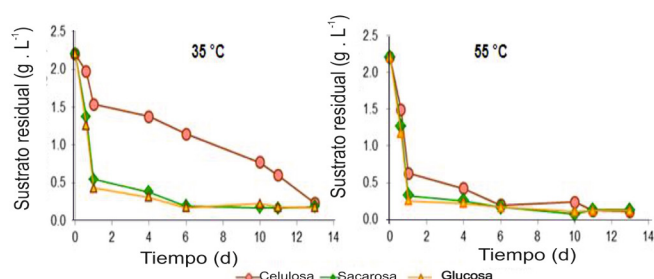


Fig. 2. Degradación de azúcares reductores por los grupos tróficos presentes en cada condición de temperatura.

Para el caso de los grupos acidogénicos y metanogénico en mesofilia se obtuvo mayor crecimiento en acetato de sodio y metanol, lo cual sugiere el predominio de los géneros *Metanosarcinas*, *Metanococoides* y *Metanosaetas* similar a lo informado por varios autores.^{12,33} En contraste, bajo condiciones termofilicas se obtuvo mayor crecimiento en acetato de sodio y la mezcla formato y H₂-CO₂, lo cual sugiere la presencia de los géneros *Metanotermococcus*, *Metanotermobacter*, *Metanomicrobium* y *Metanobrevibacter* (Fig. 3), dada la estrecha relación entre estos grupos microbianos. Estos resultados apoyan lo informado por varios autores quienes indican que los grupos tróficos que prevalecen en la fermentación anaerobia están determinados por el sustrato disponible en el medio, a una determinada temperatura.³⁴ Teniendo en cuenta que el sustrato principal es el estiércol porcino se presupone la presencia de bacterias del orden *Methanosarcinales*.¹²

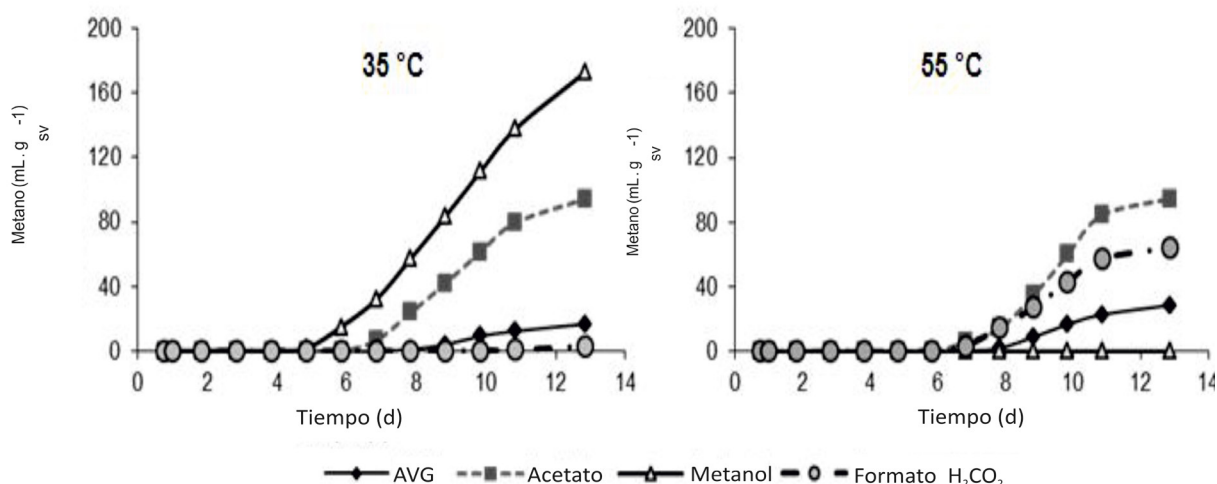


Fig. 3. Producción acumulada de metano en los reactores que contenían los sustratos diferenciales: AGV, acetato, metanol y una mezcla de formato/H₂-CO₂, en mesofilia (35 °C) y termofilia (55 °C)

Actividad metanogénica específica (AME)

La AME de los lodos (mesófilos y termófilos) calculada a partir de las gráficas de producción acumulada de metano (fig 3), mostró valores similares a los reportados por López,³¹ a partir del residual cachaza y a los rendimientos de metano obtenido por Boopathy,¹² utilizando el sustrato residual porcino (Fig. 4a). En mesofilia predominaron los degradadores de metanol (orden *Methanosarcinales*) como fue informado por Boopathy, 1996¹² para el sustrato residual porcino y en termofilia predominaron los degradadores de formato y H_2 - CO_2 (orden *Methanobacteriales*). El crecimiento en acetato, se debió a la presencia de los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* del orden *Methanosarcinales*.

Los valores de AME fueron utilizados para estimar la concentración de bacterias metanógenas en los sistemas anaerobios con sustratos diferenciales, según la correspondencia obtenida por López, 2000³¹ entre la AME y el log NMP expresado en número de células por gramo de inóculo ($N_{cel.gSV}^{-1}$). La figura 4b muestra las diferencias entre las comunidades predominantes en mesofilia y termofilia, lo cual sugiere el efecto de la temperatura sobre la composición de la población microbiana que se establece en el sistema de fermentación. Así, la relación entre AME y NMP permitió cuantificar la biomasa e inferir el predominio de determinados géneros en cada temperatura. En general, en el lodo termófilo se detectó mayor crecimiento celular, lo cual se corresponde con lo que ha sido descrito.^{2,17}

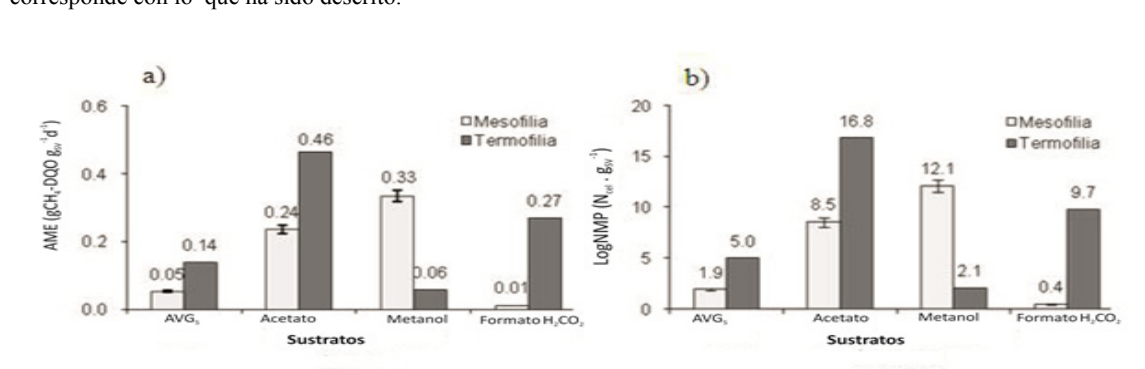


Fig. 4. a) AME de la microbiota frente a los diferentes sustratos a cada condición de temperatura. b) Número más probable de metanógenas según su AME en cada condición de temperatura.

Análisis molecular.

El análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción indicó el cambio significativo en la microbiota que se inocula con la adición de los tres sustratos (estiércol, paja y arcillas). La diversidad obtenida con ambos inóculos (mesofílico y termofílico) demostró que existe una marcada tendencia al predominio de ciertas especies con la co-fermentación. La riqueza de las comunidades microbianas en cuanto al número de especies resultó similar tanto en el sistema inoculado como en el alimentado con los tres sustratos, sin embargo, según el índice de Jaccard se obtuvo que en mesofilia el 48,4 % de las especies son similares en ambos sistemas de fermentación, a diferencia del resultado en termofilia en el que se obtuvo solo el 18,8 % de similitud, resultados que demuestran el efecto de la temperatura en la asimilación de estos co-sustratos. Es de notar que existe un 35,5 % de similitud entre los inóculos mesofílicos y termofílicos, lo cual puede ser esperado si se tiene en cuenta que ambos provienen del mismo ecosistema y fueron adaptados a cada condición de temperatura. No obstante, la estructura de la comunidad desarrollada en mesofilia con la adición de los sustratos, es significativamente diferente a la desarrollada en termofilia con solo un 13,5 % de similitud.

Dominio Bacteria.

La mayor variedad de especies ($R_r = 24$) se obtuvo en el sistema de co-fermentación en los tres sustratos en mesofilia (Meso EPA) aunque el índice de Shannon indicó que la diversidad fue mayor en los inóculos, tanto mesófilos como termófilos (Tabla 2).

Tabla 2 Análisis de la diversidad y organización de la comunidad microbiana

Sistemas de fermentación	Riqueza de spp. (Rr)	Índice de Shannon (H)	Índice de Equidad (H/H _{máx})	Varianza (Var H)
Meso i	22	2,46	0,80	0,10
Meso EPA	24	2,29	0,72	0,09
Termo i	20	2,70	0,90	0,11
Termo EPA	18	2,51	0,87	0,10

Meso i y *Termo i*: sistemas de fermentación inoculados sin sustratos en mesofilia y termofilia, respectivamente. *Meso EPA* y *Termo EPA*: sistemas de fermentación inoculados con los tres sustratos en mesofilia y termofilia, respectivamente.

La organización de la comunidad expresada como el índice de equidad tanto para los sistemas sin sustrato como para los sistemas de co-fermentación fue similar, sin embargo, si se notaron diferencias entre cada temperatura. La abundancia relativa de los FT de los sistemas inoculados sin sustrato (*Meso i* y *Termo i*) mostraron el predominio de los FT de 66, 98 y 231 pb (Fig. 5a). En los sistemas de co-fermentación de los tres sustratos se notó una tendencia (más acentuada en mesofilia) al predominio de ciertos

grupos (Fig. 5a). En este sentido, se encontró mayor abundancia relativa de los fragmentos de 89, 97 y 162 pb en mesofilia mientras que en termofilia aumentaron su abundancia los FTs de 144, 151 y 231 pb.

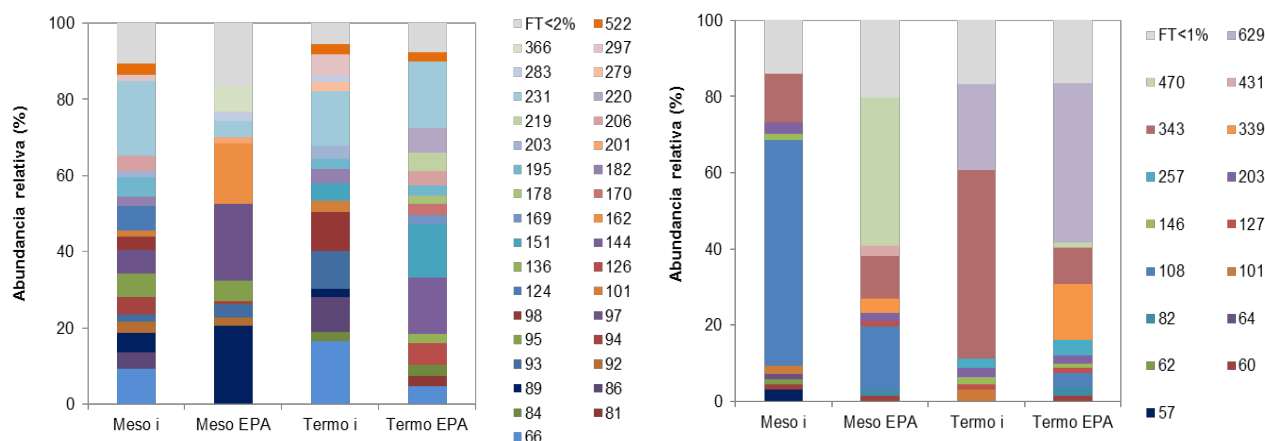


Fig. 5. Perfil de fragmentos de restricción terminales (FTs) y sus tallas en pares de bases (pb), de bacterias (a) y archaeas (b). Meso i y Termo i: sistemas de fermentación inoculados sin sustratos en mesofilia y termofilia, respectivamente. Meso EPA y Termo EPA: sistemas de fermentación inoculados con los tres sustratos en mesofilia y termofilia, respectivamente.

Dominio Archaea.

No se determinó el índice de Shannon debido al bajo número de especies obtenidas (5 - 7). En el inóculo mesófilo predominaron los FTs de 108 pb, con un 59,21 % de abundancia relativa, también se destacaron los FTs de 343 pb (12,5 % de abundancia relativa) y otros FTs de 57 y 203 pb (Fig. 5b). En la co-fermentación de los tres sustratos (Meso EPA), se redujo el predominio de los FTs de 108 pb, y se favorecieron otras especies (FTs de 431 y 470 pb este último asumiendo el predominio). En el inóculo termófilo existió un predominio de los FTs de 343 y 629 pb, aunque también se detectaron FTs de 101, 203, y 257 pb fundamentalmente. En la co-fermentación de los tres sustratos (Termo EPA) se pudo apreciar que la estructura de la comunidad se mantuvo estable, sin embargo, en este caso predominaron los FTs de 629 pb a la vez que disminuyó el predominio de los FTs de 343 pb (Fig. 5b). En este caso, también se detectaron FTs de otras tallas (82, 108, 203, 257, 339 pb). Los FTs de 108, 203 y 343 pb fueron detectados tanto en los inóculos como en los sistemas con sustrato a ambas temperaturas, lo cual sugiere que son especies importantes y forman parte de la estructura de la comunidad base, cuyo predominio varía en dependencia de las condiciones de temperatura.

DISCUSIÓN

El análisis de la microbiota formadora de metano durante la co-fermentación de estiércol y paja con la adición de arcillas en mesofilia y termofilia, mostró perfiles de fragmentos de restricción terminales diferentes tanto para bacterias como para archaeas, lo cual indica el efecto de la temperatura sobre la biodiversidad y la estructura de la comunidad microbiana.¹⁷ Con la co-fermentación de los sustratos, fundamentalmente en las archaeas, aumentó la abundancia relativa de ciertas especies dado por las nuevas condiciones nutricionales (adición de co-sustratos y minerales) que favorecen su crecimiento y desarrollo. En termofilia se corroboró la presencia de especies anaerobias hidrolíticas del phylum *Firmicutes*, (*Clostridium* sp) y del phylum *Bacteroidetes* (*Bacteroides* sp). Además a esta temperatura se observó el predominio de fragmentos terminales de restricción de 151 pb (con un abundancia relativa de 14 %) que según Rademacher y colaboradores.¹⁷ pertenecen a especies de *Clostridium*, los cuales resultaron también predominantes en reactores termofílicos de cama empacada.¹⁷ Los fragmentos predominantes de 108, 339 y 629 pb obtenido en este estudio coinciden con los fragmentos informados anteriormente por estos autores,¹⁷ cuyos estudios de secuenciación revelaron que pertenecen a especies de *Methanosaeta*, *Methanotermobacter* y *Methanosarcina*, respectivamente. Cabe señalar que en este trabajo se utilizó el mismo protocolo de caracterización molecular que siguieron Rademacher y cols,¹⁷ con el empleo del mismo juego de cebadores para los genes de ARNr 16S de bacterias y archaeas y las mismas enzimas de restricción, por lo que se asumió que los FTs pueden ser comparados.

En mesofilia el análisis de bacterias sugiere la presencia de anaerobias hidrolíticas del phylum *Firmicutes*, principalmente especies de *Clostridium* (231 pb), bacterias no cultivadas del phylum *Fusobacteria* (366 pb) y bacterias del rumen no cultivadas (201 pb), además con la co-fermentación de los tres sustratos aumentó el predominio de los fragmentos de 162 pb correspondientes a *Clostridiales*. Sin embargo, el phylum *Bacteroidetes* (*Bacteroides* sp), mantuvo un 40 % de la abundancia relativa (FTs: 89 y 97 pb) lo que demuestra su predominio en este tipo de residuos. El phylum *Bacteroidetes* también fue encontrado predominante en reactores que degradan estiércol bovino.¹⁶ En cuanto a archaeas a esta temperatura predominaron los FT de 108 y 470 pb que corresponden a las familias *Methanosarcinales* *Methanosaetaceae* y *Methanosarcinales* *Methanosarcinaceae*, respectivamente, con la co-fermentación de los tres sustratos, resultado similar a lo informado por Boopahy.¹² En termofilia abundaron las familias *Methanotermobacter* y *Methanobacterium* sp. del orden *Methanobacteriales* (339 pb) y especies de *Methanosarcina* (629 pb), lo cual se corresponde con lo descrito anteriormente respecto al predominio de este orden en la biodegradación de residuos porcinos, ya que forman parte de la microbiota intestinal de los cerdos y predominan en sus heces fecales.¹² Los FTs de 343 pb pertenecientes al orden *Methanobacteriales* según Padmasiri y cols,¹⁵ fueron detectados en todas las muestras, lo cual sugiere su estabilidad frente a cambios ambientales. Estos FTs ocuparon casi el 50 % de la abundancia relativa en el inóculo termofílico, sin embargo sus concentraciones disminuyeron cuando se adicionaron los sustratos a ambas temperaturas. En el estudio realizado por Padmasiri y cols.¹⁵ estos FTs de 343 pb fueron encontrados e identificados en reactores de membrana que trataban residuos

porcinos. Este hecho contrasta con Kim y cols,¹¹ que detectaron un predominio de los órdenes *Methanobacteriales* y *Methanomicrobiales* en reactores discontinuos que digieren residual porcino. Padmasiri y colaboradores,¹⁵ también encontraron que los fragmentos de 108 y 470 pb pertenecen a los órdenes de *Methanosarcinales*, familia *Methanosaetaceae* y *Methanosarcinales* familia *Methanosarcinales*, respectivamente, los cuales predominaron en condiciones mesofílicas.

La detección de especies del orden *Methanosarcinales*, familia *Methanosaetaceae* con FTs de 108 pb,^{15,17} predominante sobretodo en mesofilia también se corroboró con el crecimiento en acetato obtenido en ambas condiciones de temperaturas. Esto confirma el predominio de acetoclásticas metanógenas en condiciones de mesofilia. La obtención de FTs de 470 pb en mesofilia con la adición de los tres sustratos y su abundancia relativa (40 %) se corresponde con el crecimiento en metanol que se obtuvo en el ensayo del cultivo diferencial, lo cual sugiere que se trata del orden *Methanosarcinales*, similar a lo encontrado por Kim y cols,¹¹ en trabajos con la especie *Metanosarcina barkeri*. El crecimiento en formato y H₂-CO₂, obtenido en condiciones termofílicas (Fig. 3) indica que los FTs de 339 y 343 pb predominantes a esta temperatura deben corresponder a los órdenes de *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* o *Methanococcales*, similar a lo informado por otros autores,^{11,15} y cuyos sustratos específicos los enmarcan dentro del los metanógenos hidrogenotróficos. La presencia de FT de 431 pb en mesofilia en los sistemas de co-fermentación de los tres sustratos debe corresponder a especies del orden *Methanomicrobiales*, ya que en otros estudios se ha informado sobre el predominio de este orden en sistemas que tratan residuos porcinos,^{11,15} y se han identificado especies de este orden con fragmentos de esta talla (431 pb).

CONCLUSIONES

El crecimiento del lodo anaerobio con la co-fermentación de los sustratos de estiércol porcino, paja de arroz y arcillas residuales en medio diferencial favorece el desarrollo de grupos tróficos microbianos predominantes. Las actividades enzimáticas hidrolíticas, glucolíticas y metanogénicas resultan variables a considerar en el sistema anaerobio, ya que muestran el comportamiento de la microbiota y el predominio de las poblaciones en determinadas condiciones de temperatura y variación nutricional. El análisis de la microbiota en mesofilia y termofilia demostró el efecto que ejerce la temperatura sobre la asimilación de los sustratos y sobre el desarrollo de poblaciones específicas frente a sustratos complejos, lo cual estuvo en concordancia con los resultados del análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción. Este análisis demostró el predominio de las especies metanógenas acetoclásticas del orden de *Methanosarcinales*, en condiciones de mesofilia, mientras que en condiciones termofílicas predominaron especies metanógenas hidrogenotróficas de los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanobacteriales*.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Instituto de Ingeniería de la UNAM, México y al Instituto de Ingeniería Agraria de Borsdorf-Potsdam, Alemania por los recursos otorgados para esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Verstraete W, Morgan-Sagastume F, Aiyuk S, Waweru M, Rabaey K, Lissens G. Anaerobic digestion as a core technology in sustainable management of organic matter. *Water Science Technology*. 2005; 52: 59-66.
2. Ward AJ, Hobbs PJ, Holliman PJ, Jones DL. Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*. 2008; 99: 7928-7940.
3. Riviere D, Desvignes V, Pelletier E, Chaussonnerie S, Guermazi S, Weissenbach J, Li T, Camacho P, Sghir A. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J*. 2009; 3: 700-714.
4. Nettmann E, Bergmann I, Pramschüfer S, Mundt K, Plogsties V, Herrmann C, Klocke M. Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010; 76: 2540-2548.
5. Campos AE. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante co-digestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. [Tesis en opción del título de Doctor en Ciencias], Universitat de Lleida, Lérida, España; 2001.
6. Angelidaki I, Sanders W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*. 2004; 3: 117-129.
7. Barredo MS, Evison LM. Effect of propionate toxicity on methanogenic- enriched sludge. *Ethano-brevibacter Smithii*, and *Methanospirillum Hungatutti* at different pH values. *Applied Environmental Microbiology*. 1991; 57: 1764.
8. Van Lier JB, Hulsbeek J, Stams AJ, Lettinga G. Temperature susceptibility of thermophilic methanogenic sludge: implication for reactor start-up and operation. *Bioresource Technology*. 1993; 43: 227-235.
9. Gavala HN, Yenil U, Skiadas IV, Westermann P, Ahring KB. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. *Water Research*. 2003; 37: 4561-4572.
10. Zhang R, Zhang Z. Biogasification of rice straw with an anaerobic-phased solids digester system. *Bioresource Technology*. 1999; 68: 240-245.
11. Kim W, Lee S, Gu Shin S, Lee C, Hwang K, Hwang S. Methanogenic community shift in anaerobic batch digesters treating swine wastewater. *Water Research*. 2010; 44: 4900-4907.
12. Boopathy R. Isolation and characterization of a methanogenic bacterium from swine manure. *Bioresource Technology*. 1996; 55: 231-235.
13. Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63: 4516-4522.
14. Schütte UME, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, Pierson JD, et al. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 80: 365-380.

15. Padmasiri, SI, Zhang J, Fitch M, Norddahl B, Morgenroth E, Raskin L. Methanogenic population dynamics and performance of anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water research*. 2007; 41: 134-144.
16. Wang H, Tolvanen K, Lehtomaki A, Puhakka J, Rintala J. Microbial community structure in anaerobic co-digestion of grass silage and cow manure in a laboratory continuously stirred tank reactor. *Biodegradation*. 2010; 21: 135-146.
17. Rademacher A, Nolte C, Schönberg M, Klocke M. Temperature increases from 55 to 75 °C in a two-phase biogas reactor result in fundamental alterations within the bacterial and archaeal community structure. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012; 95: DOI 10.1007/s00253-012-4348-x.
18. APHA-AWWA-WPCF Standard methods for examination of water and wastewater.. 19th ed. Washington DC, USA: 1995.
19. Dubois M, Pilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956; 28: 350-356.
20. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York: 1991: p.115-147.
21. Sipos R, Szekely AJ, Palatinszky M, Revesz S, Marialigeti K, Nikolausz M. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *Microbiol Ecol*. 2007; 60: 341-350.
22. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991; 173: 697-703.
23. Després VR, Nowoisky JF, Klose M, Conrad R, Andreae MO, Pöschl U. Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. *Biogeosciences*. 2007; 4: 1127-1141.
24. Großkopf R, Janssen PH, Liesack W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64: 960-969.
25. Lueders T, Friedrich M. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66: 2732-2742.
26. Culman SW, Bukowski R, Gauch HG, Cadillo-Quiroz H, Buckley DH. Software open access T-REX: software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10: 171.
27. Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D, Verstraete W. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ Microbiol*. 2008; 10: 1571-1581.
28. Shannon CE, Weaver W. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL: 1963:
29. Pielou EC. The measurement of diversity in different types of biological colllections. *J Theor Biol*. 1966; 13: 131-144.
30. Wang G, Gavala HN, Skiadas IV, Ahring BK. Wet explosión of wheat straw and codigestion with swine manure: Effect on the methane productivity. *Waste Management*. 2009; 29: 2830-2835.
31. López M. Procedimiento de pretratamiento para mejorar la digestión anaerobia de residuos sólidos. [Tesis en opción del título de doctor en Ciencias Técnicas]. Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana; 2000.
32. Soto M, Méndez R, Lema JM. Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set-up. *Water Research*. 1993; 27(8): 1361-1376.
33. García JL, Patel BKC, Oliovier B. Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of Methanogenic Archaeas. *Anaerobe*. 2000; 6: 205-226.
34. Sánchez E, Borja R, Weiland P, Travieso L, Martín A. Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate. *Process Biochemistry*. 2001; 37: 483-489.