



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DINAMICA DE LAS COMUNIDADES
MICROBIANAS DURANTE EL PERIODO DE
ESTABILIZACIÓN DE DIGESTORES ANAEROBIOS
DE DOS FASES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

KATHIA CONSTANCE LUENEBERG RODRÍGUEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

**TUTORA
DRA. NATHALIE CABIROL**

2009

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno. Apellido paterno: Apellido materno : Nombre(s) Teléfono: Universidad:</p> <p>Facultad o escuela: Carrera: No. de cuenta:</p>	<p>1. Datos del alumno. Lueneberg Rodríguez Kathia Constance 44 37 23 37 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 404103181</p>
<p>2. Datos del asesor. Grado: Nombre(s) Apellido paterno: Apellido materno :</p>	<p>2. Datos del asesor Dra. Nathalie Cabirol</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. Irma Aurora Rosas Pérez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. José Adelfo Escalante Lozada</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3 Dr. Juan Servando Núñez Farfán</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4 Biól. Marcelo Rojas Oropeza</p>
<p>7. Datos de la tesis. Título:</p> <p>No. de páginas: Año:</p>	<p>3. Datos de la tesis Dinámica de las comunidades microbianas durante el periodo de estabilización de digestores anaerobios de dos fases. 69 p. 2009</p>

Índice	1
Índice de figuras	2
Índice de tablas	3
Índice de abreviaturas	4
Resumen	5
1. Introducción	6
2. Marco Teórico	8
2.1 Tratamiento de aguas y lodos residuales	8
2.1.1 Tratamiento de aguas residuales	8
2.1.2 Tratamiento de lodos residuales	9
2.2 Digestión anaerobia	10
2.2.1 Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia	12
2.2.2 Ingeniería de la digestión anaerobia	13
2.2.3 Bioquímica de la digestión anaerobia	17
2.2.4 Microbiología de la digestión anaerobia	21
2.3 Importancia del estudio de la dinámica de comunidades microbianas	31
3. Justificación, objetivos e hipótesis	35
4. Métodos	36
4.1 Biorreactor anaerobio de doble fase	36
4.2 Extracción de ADN	39
4.3 Amplificación de ADN	39
4.4 Método de separación por TGGE	41
4.5 Análisis de datos	42
5. Resultados	45
5.1 Rangos ponderados de riqueza	45
5.2 Dinámica microbiana	48
5.3 Huella genética y secuenciación	51
6. Discusión	55
7. Conclusión	59
8. Referencias	61
9. Anexos	68
9.1 Anexo 1	68
9.2 Anexo 2	69

Índice de figuras

Figura 1 Esquema general de la digestión anaerobia. Modificado de Aiyuk *et al.*, 2006.

Figura 2 Árbol filogenético del dominio Bacteria. (Madigan *et al.*, 2002).

Figura 3 Árbol filogenético del dominio Archaea. (Madigan *et al.*, 2002).

Figura 4 Cadena alimenticia anaerobia para la conversión de materia orgánica en CH₄. Modificado de Liu y Whitman, 2008.

Figura 5 Diagrama del digestor de doble fase.

Figura 6 Patrones de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) para el dominio Bacteria.

Figura 7 Patrones de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) para el dominio Archaea.

Figura 8 Perfiles de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) de Bacteria, *Moving Window Analysis* (MWA), valores porcentuales de la tasa de cambio (Δ_t).

Figura 9 Perfiles de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) de Archaea, *Moving Window Analysis* (MWA), valores porcentuales de la tasa de cambio (Δ_t).

Figura 10 Perfiles de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) de Archaea.

Figura 11 Árbol filogenético obtenido a partir de las muestras del dominio Archaea.

Índice de tablas

Tabla 1 Emisión de compuestos orgánicos volátiles (COV) durante compostaje aerobio y durante la maduración después de la digestión anaerobia

Tabla 2 Diferencias entre los dominios Bacteria y Archaea (Madigan *et al.*, 2002).

Tabla 3 Grupos taxonómicos de metanógenas modificado de Liu y Whitman, 2008.

Tabla 4 Datos experimentales obtenidos durante la fase de estabilización de cada biodigestor del sistema de digestión de dos fases.

Tabla 5 Cebadores utilizados en el PCR.

Tabla 6 Condiciones de PCR para cada dominio microbiano.

Tabla 7 Valores ponderados de riqueza (R_p).

Índice de abreviaturas

ADN Acido desoxirribonucléico
ADNr Acido desoxirribonucléico ribosomal
AT Acidogénico termofílico
CoA Coenzima A
CoM Coenzima M
COV Compuestos orgánicos volátiles
GDF Gobierno del Distrito Federal
H₄MPT Tetrahidrometanopterinina
M1 Metanogénico-mesofílico 1
M2 Metanogénico-mesofílico 2
MFR Metanofurano
MWA Ventana corrediza
OHPA Acetógenas productoras obligadas de hidrógeno
OTU Unidad operacional taxonómica
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
pH potencial de hidrogeno
RFV remoción de la fracción volátil
R_r Rangos ponderados de riqueza
SS Sólidos suspendidos
SSV Sólidos suspendidos volátiles
SSF Sólidos suspendidos fijos
SST Sólidos suspendidos totales
T_g Gradiente de temperatura
TGGE Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
TRH Tiempo de retención hidráulica
 Δ_t Tasa de cambio

Resumen

La eficiencia de los procesos biológicos de tratamiento de lodos residuales está condicionada por la aclimatación y estabilidad del ecosistema microbiano presente en el biorreactor. Al aclimatar a las poblaciones microbianas, su metabolismo cambia y no es seguro que se reproduzcan óptimamente con las nuevas condiciones del medio, lo que podría provocar inestabilidad en todo el proceso. Frecuentemente sólo se evalúan los parámetros funcionales, pero recientemente se han hecho intentos para relacionar la funcionalidad del proceso de ingeniería con la estructura de la comunidad microbiana. En la actualidad se utilizan técnicas moleculares para la identificación de grupos microbianos específicos en una población mezclada, a diferentes niveles filogenéticos, uno de estas técnicas es la electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) que se utiliza para monitorear temporal y espacialmente los cambios en las comunidades microbianas, es decir, su dinámica. En general, la intensidad relativa de cada banda y su posición en el perfil de TGGE representan la diversidad relativa de una población dominante en particular. Por lo tanto, pueden ser calculadas la diversidad y dinámica de la comunidad. En este trabajo fue inoculado un digestor de doble fase a escala laboratorio con lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales. Se analizaron las comunidades de los dominios Bacteria y Archaea, durante la fase de estabilización del digestor (102 días). Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) así como electroforesis en gel con gradiente de temperatura TGGE, para la detección de unidades taxonómicas y el posterior estudio de diversidad y dinámica de las comunidades microbianas, para conocer su estabilidad. Los fragmentos de ADNr 16S dominantes del dominio Archaea fueron secuenciados. El dominio bacteriano presentó mayor diversidad y menor nivel de dinámica, a diferencia del dominio Archaea que tuvo menor riqueza y mayor nivel de dinámica. Las secuencias dominantes de Archaea están relacionadas con los géneros *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanothermobacter* y *Methanobrevibacter*.

1. Introducción

La contaminación ambiental, el calentamiento global, las limitadas reservas de combustibles fósiles y el incremento constante de desechos, constituyen hoy problemas prioritarios en las agendas organizacionales y sociales (Kalia *et al.*, 2008). Por ello se han adoptado políticas ambientales dirigidas al control de la contaminación, la reutilización de los recursos y la regulación de ésta.

En ese sentido, el tratamiento efectivo de lodos provenientes del tratamiento de aguas residuales es de gran importancia para evitar problemas de contaminación y de salud, así como para la reutilización de dos productos de interés económico, por un lado el biogás, energía renovable que produce electricidad verde, calor o combustible vehicular, por otro lado el sustrato digerido comúnmente llamado biosólido, que pueden ser utilizado como mejorador del suelo (Jiménez-Cisneros, 2001; Holm-Nielsen *et al.*, 2009).

Hasta la fecha el proceso de tratamiento anaerobio es el más utilizado tanto en aguas como lodos residuales municipales e industriales por las ventajas ambientales, energéticas y económicas que ofrece. El tratamiento anaerobio puede llevarse a cabo con diferentes condiciones y una de ellas, la digestión anaerobia en doble fase, se desarrolló durante la década de 1970 por Ghosh y colaboradores (1975) y se caracteriza por la separación física de las etapas que la componen; este tipo de digestión tiene como beneficios la reducción de sólidos volátiles, mayor eliminación de microorganismos patógenos, mejor estabilidad del proceso de digestión y mayor producción de metano (Ghosh *et al.*, 2000; Aiyuk *et al.*, 2006).

Uno de los campos asociados a la digestión anaerobia que ha avanzado más en los últimos años es la microbiología del proceso, ya que es necesario el conocimiento de la ecología y funcionamiento de la comunidad microbiana para tener mayor control del proceso biológico. Se han realizado esfuerzos

considerables para entender la estructura de la comunidad microbiana utilizando técnicas moleculares: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que tiene como blanco al gen ADNr 16S, seguido del análisis de la secuencia de las clonas resultantes, entre otros. Los estudios microbiológicos recientes se centran no sólo en la descripción de la comunidad microbiana en un tiempo operacional en particular, sino también en el cambio de la comunidad microbiana (dinámica poblacional) del lodo anaerobio en diferentes tiempos operacionales (Muyzer *et al.*, 1993; Narihiro y Sekiguchi, 2007).

En este contexto, el propósito de este trabajo fue determinar la diversidad y estabilidad de los dominios microbianos Bacteria y Archaea, en lodos anaerobios de la planta de tratamiento de aguas residuales del Cerro de la Estrella, durante su estabilización en un biorreactor de doble fase, con el fin de tener un mejor control del proceso, mejorar la eficiencia del mismo.

2. Marco Teórico

2.1 Tratamiento de aguas y lodos residuales

2.1.1 Tratamiento de aguas residuales

La acumulación y estancamiento de aguas residuales favorece la descomposición anaerobia de la materia orgánica que contiene. Esto conduce a la generación de gran cantidad de gases mal olientes, así como la proliferación de microorganismos patógenos y parásitos por contaminación fecal u otro y la dispersión de compuestos tóxicos (Metcalf y Eddy, 1996). Esto se manifiesta en problemas de salud pública y daño al ambiente. Para prevención de estos daños y la reutilización el agua residual debe ser tratada. El término “tratamiento de agua” es un concepto amplio que implica la combinación de procesos y operaciones unitarias para modificar la calidad del agua hasta el grado requerido para el uso o disposición a la cual se destina (Jiménez-Cisneros, 2001).

El tratamiento de aguas consta de varias etapas:

- 1) Primaria por métodos físicos y químicos
- 2) Secundaria por procesos biológicos
- 3) Terciaria para la desinfección final del agua residual

Todos los sistemas de tratamiento de aguas residuales generan como subproductos, residuos sólidos y/o semisólidos (lodos), en los cuales se concentran los contaminantes, presentes en dichas aguas. El tratamiento y confinamiento adecuado de los lodos obtenidos del agua residual es muy importante, ya que evita problemas sanitarios y ambientales (Jiménez-Cisneros, 2001).

2.1.2 Tratamiento de lodos residuales

El lodo residual suele ser líquido o semilíquido, con un contenido de sólidos variable entre 0.25 y 12% en peso, dependiendo de su procedencia y de los procesos de tratamiento. Los lodos se clasifican por su procedencia en municipales e industriales, los lodos municipales se generan en las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales o domésticas, son primordialmente una combinación de material orgánico del cual 10 al 40% son sólidos, que incluyen madera, papel y plástico, contiene ácidos, grasas, y aceites provenientes de algunas industrias, pueden encontrarse residuos de metales, vidrio, rocas, etc. Este tipo de lodos tiene concentraciones de carbono orgánico total de 80-290 mg/l, nitrógeno total de 20-85 mg/l y fósforo total de 4-15 mg/l. Los sólidos de los lodos ya sean orgánicos e inorgánicos se denominan sólidos suspendidos (SS) cuya medida esta en mg/l o por ciento de sólidos. Los sólidos suspendidos totales (SST) es la materia total del lodo. Sólidos suspendidos fijos (SSF) se refiere a la materia inorgánica. Sólidos suspendidos volátiles (SSV) es la materia orgánica presente en el lodo, que se calcina $550\pm 50^{\circ}$ (Metcalf y Eddy, 1996).

Durante el tratamiento de lodos residuales, se emplean una serie de operaciones unitarias como: espesamiento, estabilización, acondicionamiento y deshidratación. La estabilización de los lodos residuales se entiende como el proceso mediante el cual se busca eliminar los microorganismos patógenos y parásitos, disminuir la fracción volátil de la materia orgánica, reducir o eliminar el potencial de putrefacción del lodo y consecutivamente, eliminar los problemas de malos olores y atracción de vectores que puedan propagar enfermedades. La deshidratación del lodo permite disminuir su volumen, lo cual facilita el confinamiento. De este modo se acondiciona el lodo para su reutilización o evacuación final (Metcalf y Eddy, 1996). Los métodos de estabilización disponibles son los siguientes:

1. Reducción biológica del contenido de la materia orgánica, mediante digestión aerobia o anaerobia.
2. Adición de agentes químicos para hacer el lodo inadecuado para la supervivencia de los microorganismos, como es el tratamiento alcalino con amoníaco, con cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y/o con cal viva (CaO) (Tratamiento a pH elevado).
3. Oxidación química de la materia orgánica.
4. Procesos térmicos como el acondicionamiento y secado térmico, incineración, pirolisis o combustión por deficiencia de aire.
5. Lagunas, es decir, almacenamiento a largo plazo del fango líquido digerido.
6. Composta a temperaturas superiores a 55°C .
7. Pasteurización.
8. Radiación de alta energía (Vesilind, 2003).

De estos métodos de estabilización, la reducción biológica mediante digestión anaerobia es hasta la fecha el más utilizado en todo el mundo para tratar los lodos residuales (Nishio *et al.*, 2007).

2.2 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es el proceso metabólico por el cual la materia orgánica se degrada hasta moléculas sencillas por la actividad simultánea o secuencial de microorganismos anaerobios facultativos o estrictos. La tecnología ambiental ha logrado obtener ventajas de las relaciones de interdependencia que existen entre las especies que integran el consorcio microbiano, ofreciendo el potencial de reducir los costos de tratamiento y la producción de energía en forma de metano (CH_4), mediante la degradación de los desechos orgánicos (Balch *et al.*, 1979; Narihiro *et al.*, 2007). La digestión anaerobia se resume en la siguiente figura (Fig. 1):

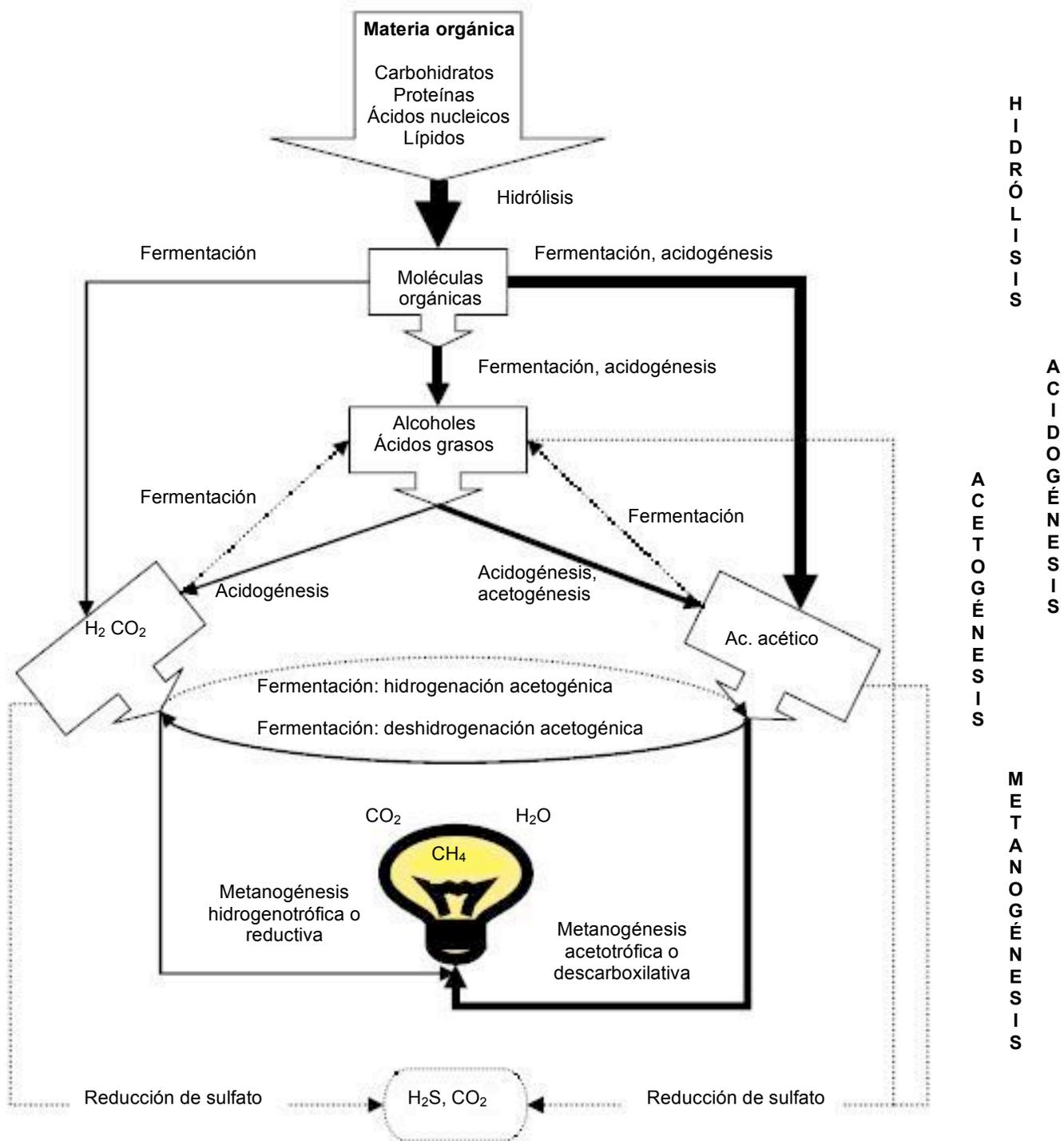


Fig. 1 Esquema general de la digestión anaerobia. Modificado de Aiyuk *et al.*, 2006.

2.1.1 Ventajas y desventajas de la digestión anaerobia

Comparado con otros métodos de estabilización de lodos residuales, la vía anaerobia presenta las siguientes ventajas y desventajas:

Ventajas de la digestión anaerobia

- Producción de lodo significativamente baja.
- Elimina malos olores.
- Disminuye sustancialmente la utilización de combustibles fósiles.
- Disminuye sustancialmente los índices de patógenos y en termofilia también los parásitos.
- Produce un biosólido sanitizado y fertilizante rico en nutrientes.
- Integrada a un post-tratamiento se pueden recuperar productos útiles como amonio y sulfuro.
- Maximiza los beneficios del reciclaje.
- Proceso productor neto de energía.
- En consecuencia el proceso no utiliza electricidad u otros combustibles minerales.
- Genera combustible en forma de biogas renovable, en altas concentraciones y de alta calidad.
- La integración a un post-tratamiento recupera productos útiles.
- Tiene requerimientos nutricionales bajos.
- Puede ser aplicado prácticamente en cualquier lugar y a cualquier escala.
- Su aplicación es adecuada en áreas residenciales e industriales con buen potencial para cerrar ciclos hidrológicos.
- Plantas pequeñas y sencillas no requieren de un operador y su mantenimiento es mínimo (Aiyuk *et al.*, 2006).

Desventajas de la digestión anaerobia

- Los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia son sensibles a los cambios en el ambiente por lo tanto el proceso es susceptible a alteraciones.
- El proceso genera un efluente secundario de baja calidad. Los sobrenadantes comúnmente contiene una demanda de oxígeno y una concentración de sólidos suspendidos alta, así como nitrógeno y fósforo. Estos efluentes podrían requerir tratamiento adicional.
- Los reactores deben proveer un tiempo de retención de más de 10 días para estabilizar el lodo efectivamente (esto en reactores mesofílicos que son los más comunes). Esto limita la velocidad con la cual el sistema puede adaptarse a los cambios de carga residual, temperatura y otras condiciones ambientales.
- El costo capital inicial es alto porque los digestores tecnificados requieren estar acondicionados con sistemas de alimentación, calentamiento y mezclado del lodo.
- Plantas altamente tecnificadas requieren personal especializado y laboratorios (Turovskiy y Mathai, 2006).

2.1.2 Ingeniería de la digestión anaerobia

El proceso de digestión anaerobia se ha utilizado en el tratamiento de aguas y lodos residuales desde hace más de un siglo. Se lleva a cabo en reactores, tanques cerrados para excluir el oxígeno disuelto y asegurar el desarrollo de condiciones anaerobias. En general tienen forma cilíndrica con una base cónica y son típicamente construidos con concreto o acero. Sin embargo, otros materiales y configuraciones pueden ser utilizados. El tamaño varía entre los 10 y 40 m de diámetro y de 5 a 10 m de profundidad. Los reactores usualmente están aislados para evitar la pérdida de calor; además cuentan con un sistema de mezclado que incrementa la homogeneidad del medio donde se lleva a cabo la reacción y reducir

la resistencia a la transferencia de materia. También cuentan con un sistema de calentamiento, para mantener la temperatura constante y cerca de los valores óptimos para la biomasa. El CH₄ producido por el sistema generalmente es utilizado para el funcionamiento de las calderas que proveen el calor necesario a los reactores (Grady *et al.*, 1999).

La digestión anaerobia tiene ventaja sobre el compostaje aerobio, la incineración o la combinación de la digestión y el compostaje en el tratamiento de lodos residuales municipales, debido principalmente a la mejora de su balance energético, la tecnología anaeróbica recupera energía suficiente para la operación de todo el reactor, mientras que el compostaje y la incineración son netos consumidores de energía. Así mismo durante el proceso aerobio se producen grandes e incontroladas emisiones de compuestos volátiles, como cetonas, aldehídos, amoníaco y CH₄ como fue encontrado por Pier y Kelly (1997). Estos resultados han sido corroborados por varios autores, De Baere (1999) (Tabla 1), Baldasano y Soriano (1999), Edelmann *et al.* (1999), Kübler y Rumphorst (1999) y Smet *et al.* (1999). Por lo que en términos de calentamiento global el cual se utiliza comúnmente como un valor de referencia de balance ecológico, la digestión anaerobia califica mejor que cualquier otro procedimiento para estabilizar lodos municipales (Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

Tabla 1 Emisión de compuestos orgánicos volátiles (COV) durante compostaje aerobio y durante la maduración después de la digestión anaerobia, expresados en gr/ton de biosólido (extraído de De Baere (1999)).

Compuesto	Tratamiento Aerobio	Maduración después de tratamiento anaerobio
Alcoholes	283.6	0.033
Cetonas	150.4	0.466
Terpenos	82.4	2.2
Esteres	52.7	0.003
Sulfuros orgánicos	9.3	0.202
Aldehídos	7.5	0.086
Éteres	2.6	0.027
COV totales	588.5	3.017
NH ₃	158.9	97.6
Total	747.4	100.6

Al pasar los años se han generado cuatro variantes básicas de la digestión anaerobia para el tratamiento de lodos residuales: de baja tasa, de alta tasa, en dos etapas y en dos fases. Adicionalmente la digestión anaerobia puede ser operada en cuatro regímenes de temperatura: psicrófila ≤ 25 °C mesofílica de 25 a 40 °C, termofílica de 50 a 57 °C e hipertermófila ≥ 70 °C, este régimen sólo se encuentra en la naturaleza (Bruce, 1984; Madigan *et al.*, 2002; Turovskiy y Mathai, 2006).

El proceso de baja tasa conocido también como convencional, se lleva a cabo en un tanque sin calentamiento y sin mezclado; presenta tiempos de retención hidráulica largos, entre 90 y 400 días, y soportan cargas bajas recomendadas entre 0.5 y 1.0 kgSSV/m³d; un ejemplo de esta variante son los tanques sépticos. En los reactores de alta tasa, se aplica un mezclado al medio de reacción, ya sea mediante agitación mecánica, por la recirculación de gas o líquido o una combinación de ambos. Además, esta variante cuenta con un sistema de calentamiento que lleva la temperatura del digestor entre 30 y 40°C. En dichos procesos, las cargas van de 1.6 a 3.2 KgSSV/m³.d con tiempos de

retención hidráulica de 10 a 20 días; esta es la variante más utilizada en las plantas de tratamiento anaerobio. En el proceso de dos etapas, los sustratos residuales pueden ser reducidos en la segunda etapa del proceso, llevándose a cabo las mismas reacciones que en la primera etapa pero con diferente tiempo de retención (Gunaseelan, 1997)

Particularmente la digestión anaerobia en dos fases se desarrolló durante la década de 1970 por Ghosh y colaboradores (1975) y se caracteriza por la separación física de las etapas que la componen, es decir, que las etapas de hidrólisis y acidogénesis se llevan a cabo en un primer digester denominado acidogénico: este digester está diseñado para un tiempo de retención de 1 a 2 días, esta fase puede ser operada ya sea mesofílica o termofilicamente; el pH en el reactor es de 5.5 a 6.5. Las dos etapas restantes, acetogénesis y metanogénesis se llevan a cabo en un segundo digester denominado metanogénico, el cual está diseñado para un tiempo de retención de 10 días y opera en el rango de temperatura meso o termofílico. Ambos digestores están conectados en serie (Turovskiy y Mathai, 2006).

Los digestores anaerobios que tratan lodos residuales municipales han experimentado problemas de operación asociados con la acumulación de arena o grava en el fondo del reactor y acumulación de espuma en la superficie, lo cual debe ser removido frecuentemente. Por lo que las configuraciones de los biorreactores han cambiado para solucionar estos problemas, este es el caso del digester en forma de huevo, el cual por tener un diámetro mayor en el centro con respecto a los extremos superior e inferior y una pendiente abrupta, mejora las características de mezclado, evitando así la sedimentación y la acumulación de espuma en la superficie (Grady *et al.*, 1999).

La separación de las etapas resulta en el mejoramiento del sistema de digestión anaerobia en comparación con la digestión anaerobia de una sola fase, por distintas razones:

- Reducción de sólidos volátiles, porque permite la creación de un ambiente óptimo para los formadores de ácidos.
- Incrementa la producción de gases.
- Presentan un contenido más alto de CH₄ en el producto final del biogás.
- Mayor eliminación de microorganismos patógenos.
- Menor generación de espuma.
- Menor contenido de sulfato en el gas.
- Mejor estabilidad del proceso de digestión anaerobia (Ghosh *et al.*, 2000).

2.1.3 Bioquímica de la digestión anaerobia

La remoción de demanda química de oxígeno (DQO) es completada por la conversión de materia orgánica en CH₄, dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O). El proceso anaerobio involucra una compleja serie de reacciones bioquímicas y se puede dividir en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Batstone *et al.*, 2002).

Hidrólisis

Los conceptos de desintegración, solubilización e hidrólisis enzimática son usualmente expresados por el término cinético general de hidrólisis. Durante esta etapa se reduce el tamaño de moléculas complejas solubles e insolubles como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos que no pueden ser directamente metabolizados por los microorganismos anaerobios. La hidrólisis de polímeros orgánicos es llevada a cabo por enzimas extracelulares (proteinasas, celulasas, lipasas y amilasas), producidas por microorganismos fermentativos primarios. Esto facilita el transporte a través de la membrana celular para el metabolismo de los monómeros generados (aminoácidos, monosacáridos, ácidos grasos de cadena larga y glicerol) (Vavilin *et al.*, 2008).

Cuando un proceso se compone de una secuencia de reacciones, la tasa completa es determinada por la reacción más lenta a la cual se le llama paso limitante. La hidrólisis es considerada el paso limitante del proceso de digestión anaerobia con materia orgánica suspendida (Vavilin *et al.*, 2008).

Acidogénesis

En esta etapa los monómeros generados anteriormente son degradados mediante reacciones fermentativas, en donde los compuestos orgánicos funcionan como aceptores y donadores de electrones. Los principales productos de esta etapa son ácidos grasos volátiles (AGV), que funcionan como intermediarios degradativos, por ejemplo ácido propiónico, n-butírico, n-valérico, caprónico y láctico. Así como los precursores directos para la formación de CH₄, que son el ácido acético, hidrógeno (H₂) y CO₂ (Grady *et al.*, 1999).

El H₂ es muy importante para el adecuado funcionamiento del proceso anaerobio, ya que de no encontrarse en los niveles óptimos puede producir fallas. Presiones menores a las adecuadas provocaría que todas las reacciones que utilizan H₂ como aceptor o donador de electrones no se llevaran a cabo. Sin embargo las altas presiones parciales de H₂ inhiben el crecimiento celular (Cirne *et al.*, 2007; Kalia *et al.*, 2008).

Acetogénesis

El ácido acético es el mayor intermediario en la cadena alimenticia anaerobia. Diversos sustratos como CO₂, H₂, carbohidratos, alcoholes, ácidos descarboxílicos, aldehídos, compuestos aromáticos y algunos sustratos halogenados pueden ser oxidados y producir reductores utilizables para la reducción de CO₂ a acetato, por medio de la ruta del acetil- CoA, mejor conocida como ruta heterofermentadora. Cuando las hexosas son convertidas exclusivamente a acetato, la reacción fermentativa es llamada homoacetogénesis (Müller, 2003).

Metanogénesis

La formación de CH₄, último producto de la digestión anaerobia está limitado a tres tipos de precursores: CO₂, compuestos que contengan un grupo metilo y acetato (Liu y Whitman, 2008).

Cuando la metanogénesis es mediada por el CO₂ como precursor se denomina hidrogenotrófica o hidrogenófila y se utiliza H₂ como principal donador de electrones. También se puede utilizar formato como donador de electrones; en este caso cuatro moléculas de formato se oxidan a CO₂. En la metanogénesis hidrogenófila, el CO₂ es reducido secuencialmente a CH₄ a través de los niveles formil, metileno y metilo; esto se lleva a cabo a través de la ruta de coenzimas portadoras de compuestos de un átomo de carbono; las tres unidades acarreadoras son el metanofurano (MFR), la tetrahidrometanopterin (H₄MPT) y la coenzima M (H-S-CoM o CoM). Otras veces se pueden utilizar alcoholes secundarios, como 2-propanol, 2-butanol y ciclopentanol como donadores de electrones, ya que son oxidados hasta cetonas. En casos raros se utiliza CO como reductor (Liu y Whitman, 2008).

Reacciones de la metanogénesis hidrogenotrófica

A partir de dióxido de carbono $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$

A partir de formato $4\text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

A partir de isopropanol $\text{CO}_2 + 4\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_4 + 4\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$

A partir de monóxido de carbono $4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$

El segundo tipo es la metanogénesis metilotrófica, que incluye metanol, metilaminas y sulfatos metilados como precursores para la formación de CH₄. Durante este tipo de metanogénesis los compuestos metilados son transferidos a una proteína que presenta un sistema de anillos de tetrapirrol y posteriormente a CoM; secuencialmente el compuesto metil-CoM entra a la vía de la metanogénesis

y es reducido a CH₄. En la mayoría de los casos, los electrones requeridos se obtienen de la oxidación adicional de grupos metilo a CO₂ (Liu y Whitman, 2008).

Reacciones de la metanogénesis metilotrónica

A partir de metanol	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
A partir de metanol e hidrogeno	$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$
A partir de metildisulfuro	$2(\text{CH}_3)_2\text{-S} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{S}$
A partir de metilamina	$4\text{CH}_3\text{-NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4\text{NH}_3$
A partir de dimetilamina	$2(\text{CH}_3)_2\text{-NH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$
A partir de trimetilamina	$4(\text{CH}_3)_3\text{-N} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_3$
A partir de cloruro de metilamonio	$4\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4\text{NH}_4\text{Cl}$

El tercer tipo es la metanogénesis acetotrónica o acetoclástica, donde el precursor principal es el ácido acético. En ambientes naturales dos terceras partes del CH₄ generado biológicamente deriva del acetato. Durante este tipo de metanogénesis se lleva a cabo una reacción que rompe a la molécula de acetato, oxidando el grupo carboxilo a CO₂ y reduciendo el grupo metilo a CH₄. El acetato se activa como acetil CoA por catálisis de la acetil-CoA sintetasa. El complejo monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) cataliza la ruptura del acetil- CoA; este complejo posee un componente hierro-cobre y otro hierro-azufre, los cuales le permiten tener niveles de oxidación adecuados (Liu y Whitman, 2008).

Reacción de la metanogénesis acetotrónica



2.1.4 Microbiología de la digestión anaerobia

La estabilización biológica de los lodos residuales por digestión anaerobia es llevada a cabo por un consorcio microbiano integrado por los dominios Bacteria y Archaea, unidos en una compleja red alimenticia (Nielsen *et al.*, 2004).

Las bacterias y archaeas se clasifican como procariontes, microorganismos que se caracterizan por la ausencia de envoltura nuclear y de organelos rodeados por membranas, esto les confiere una morfología más simple y un tamaño más pequeño (1-5 μm). Los microorganismos procariotas se caracterizan también por ser evolutivamente más antiguos (Woese, 1987).

El dominio Bacteria está integrado por 17 linajes filogenéticos distintos (Fig. 2) y la mayoría de sus integrantes se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes tanto aerobios como anaerobios. Se encuentran comúnmente en el suelo, agua, tracto digestivo de animales, entre otros ambientes. Los grupos más representativos en la digestión anaerobia son: Proteobacteria, Bacterias Gram-positivas, Nitrospira, Cianobacterias, Citofaga, Termotogales y Bacterias verdes (Woese, 1987; Madigan *et al.*, 2002).

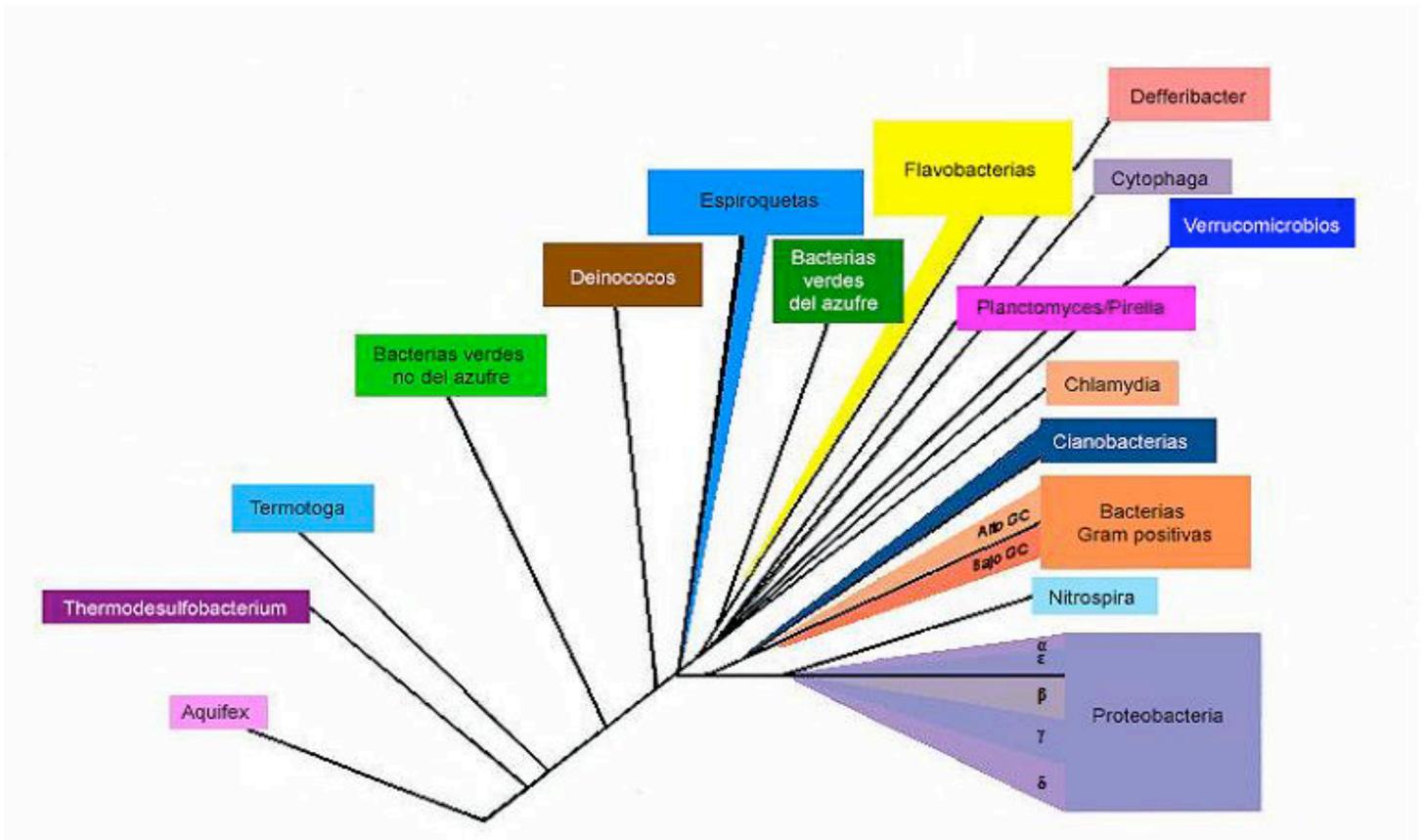


Fig. 2 Árbol filogenético del dominio Bacteria. Datos obtenidos de la Base de Datos del Proyecto de Secuenciación del Ribosoma (Ribosomal Database Project) (Madigan *et al.*, 2002).

En el dominio Archaea existen tres linajes filogenéticos principales (Fig. 3) que pueden ser aerobios o anaerobios. Sin embargo, la mayor parte de sus integrantes están restringidos a ambientes anaerobios y se desarrollan bajo condiciones extremas de temperatura, salinidad, alcalinidad y acidez. El único grupo representativo en la digestión anaerobia es Euryarchaeota (Woese, 1987; Madigan *et al.*, 2002).

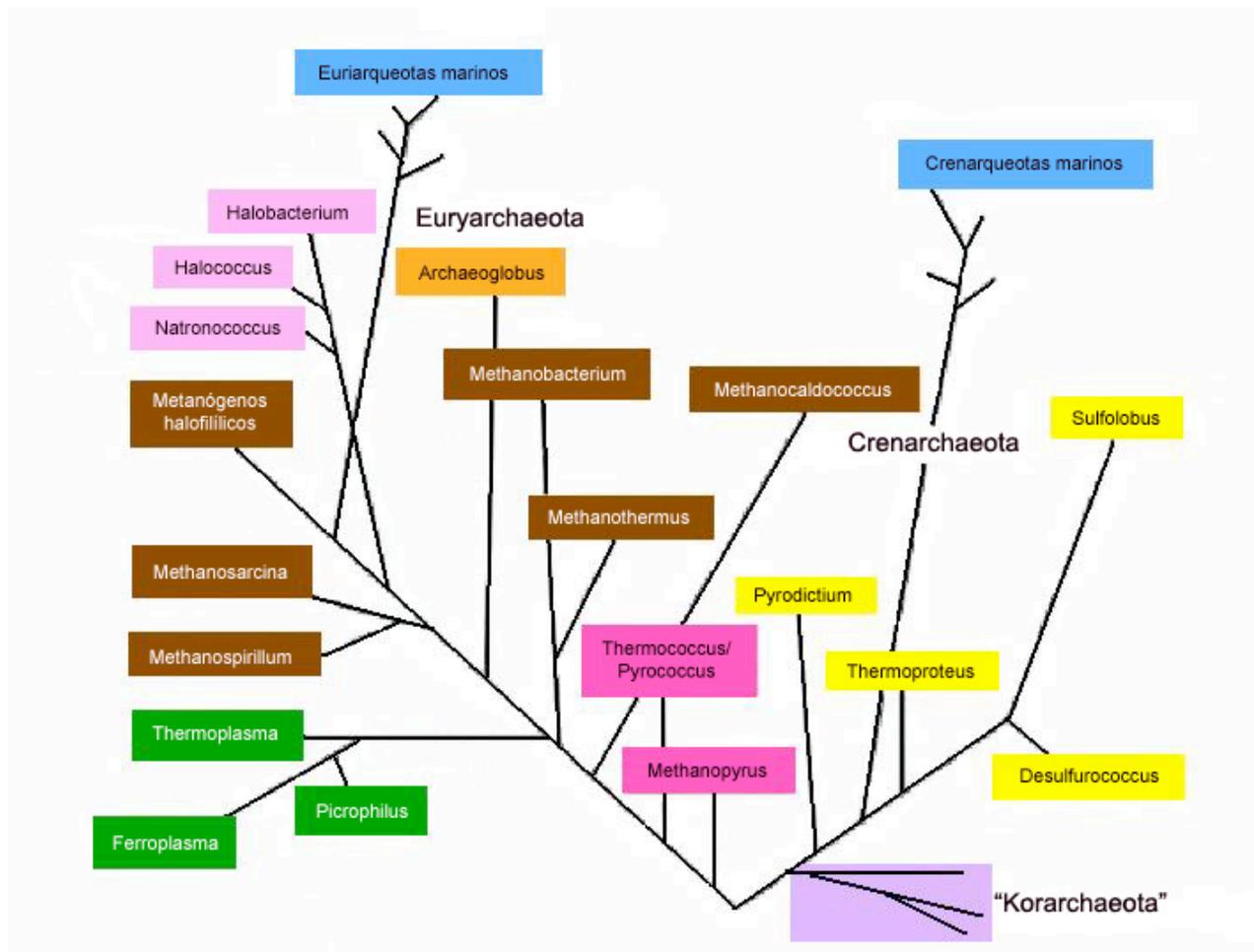


Fig. 3 Árbol filogenético del dominio Archaea. Datos obtenidos de la Base de Datos del Proyecto de Secuenciación del Ribosoma (Ribosomal Database Project) (Madigan *et al.*, 2002).

Los dos dominios procariotas son significativamente diferentes (Tabla 2), tanto en su constitución celular como en su evolución. Habitan distintos nichos ecológicos, evolucionan a diferentes tasas y muestran diferencias en la versatilidad metabólica y la plasticidad molecular (Woese, 1987).

Tabla 2 Diferencias entre los dominios Bacteria y Archaea (Madigan *et al.*, 2002).

Característica	Bacteria	Archaea
Histonas presentes	No	Si
tRNA iniciador	Formilmetionina	Metionina
Requerimiento de factores de transcripción	No	Si
Estructura del promotor	Secuencias -10 y -35 (Caja Pribnow)	Caja TATA
RNA polimerasa	1(4 subunidades)	Varias (8-12 subunidades cada una)
Sensibilidad ribosómica a la toxina diftérica	No	Si
Sensibilidad a cloramfenicol, estreptomicina y kanamicina	Si	No
Metanogénesis	No	Si
Nitrificación	Si	No
Fotosíntesis basada en clorofila	Si	No

La operación estable de la digestión anaerobia requiere de un equilibrio dinámico entre tres principales comunidades microbianas funcionales: fermentadora, acetógena y metanógena, integradas por los dominios Bacteria y Archaea (Fig. 4) (Ariesyady *et al.*, 2007). Estas comunidades microbianas están constituidas por una gran variedad de grupos taxonómicos organizados en gránulos o flóculos, es decir, que forman densos agregados como resultado de sus propiedades auto-inmovilizadoras (Sekiguchi *et al.*, 1998; Satoh *et al.*, 2007). Esto les permite el acceso inmediato a los productos que utilizan como fuentes de energía, ya que el proceso de digestión anaerobia se caracteriza por que los productos de desecho de unas bacterias son la fuente de energía de otras.

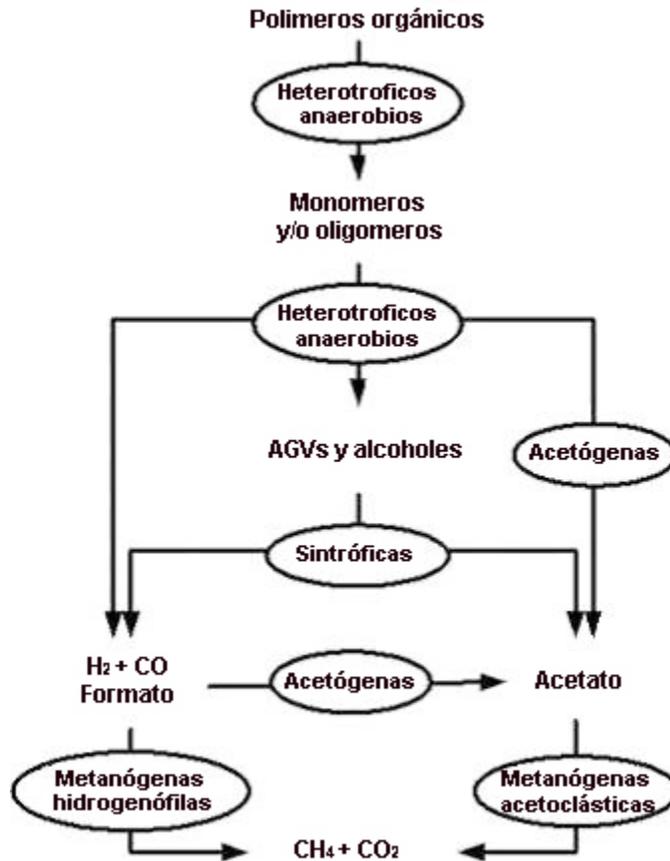


Fig. 4 Cadena alimenticia anaerobia para la conversión de materia orgánica en CH₄. Modificado de Liu y Whitman, 2008.

La primera comunidad funcional de microorganismos presentan una mayor actividad durante el inicio del proceso (hidrólisis), ya que degrada sustancias poliméricas complejas principalmente lípidos, carbohidratos y proteínas a bloques estructurales fundamentales como glucosa, aminoácidos y ácidos grasos (Ariesyady *et al.*, 2007; Cirne *et al.*, 2007).

Los microorganismos anaerobios conocidos por su capacidad de degradar polímeros complejos de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa, xilanas y amilasa) se pueden encontrar principalmente en los géneros *Acetovibrio*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, el género *Cytophaga* también tienen la habilidad de degradar macromoléculas complejas como celulosa y quitina (Cirne *et al.*, 2007).

Posteriormente los monómeros de azúcares son degradados por *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* (Mara y Horan, 2003).

Miembros del género *Spirochaeta* también se encuentran bien caracterizados en lodos negros, ricos en ácido sulfhídrico (H₂S), ya que fermentan azúcares siguiendo la vía glucolítica (Madigan *et al.*, 2002; Ariesyady *et al.*, 2007). Se ha comprobado que miembros del phylum Chloroflexi (bacterias verdes no sulfuradas), también utilizan glucosa como fuente de carbono y proveen una columna estabilizadora para los agregados microbianos, lo que ayuda a mantener su rigidez y compactibilidad. También se han visto implicados en sistemas de remoción biológica de nutrientes (Björnsson *et al.*, 2002; Ariesyady *et al.*, 2007).

Los aminoácidos son el principal producto de la hidrólisis de proteínas. Especies de los géneros como *Clostridium*, *Peptococcus*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Streptococcus*, *Acidaminobacter*, *Aminomonas*, *Aminobacterium*, *Aminovorans* han demostrado degradar proteínas y aminoácidos anaerobicamente. La mayoría de las bacterias que degradan aminoácidos están afiliadas con el phylum Firmicutes (bacterias Gram-positivas de bajo GC). Se ha encontrado evidencia que indica que miembros del phylum Bacteroides también se relacionan con la degradación de proteínas y aminoácidos, así también varios géneros del phylum Proteobacteria y Deferribacteres (Tang *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2007).

Hasta el momento se conocen sólo 10 especies y/o subespecies de bacterias que sintróficamente degradan lípidos y el principal producto de la hidrólisis de los mismos, ácidos grasos de cadena larga y corta; pertenecen a las familias Syntrophomonadaceae y Syntrophaceae, que pertenecen al phylum Firmicutes (bacterias Gram-positivas de bajo GC) y al orden Syntrophobacterales que pertenece al phylum Proteobacteria. También se ha encontrado crecimiento de Bacteroides y Espiroquetas en lodos enriquecidos con ácidos grasos de cadena larga (Nielsen *et al.*, 2002; Hatamoto *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007).

El número de estudios con el propósito de identificar a los microorganismos hidrolíticos del proceso de digestión anaerobia son hasta ahora muy limitados (Cirne *et al.*, 2007).

La segunda comunidad funcional es la más activa y diversa en cuanto a sus funciones y sustratos utilizados. Secuencialmente fermentan los productos producidos por la primera comunidad microbiana a ácidos grasos, acetato e hidrógeno (Ariesyady *et al.*, 2007). La mayoría de los grupos taxonómicos que integran la primera comunidad microbiana, participan directamente en la segunda comunidad de microorganismos, por la naturaleza de los productos generados a partir de las reacciones metabólicas que realizan se reconocen como bacterias acidogénicas (Mara y Horan, 2003).

Algunos de los microorganismos más representativos son los pertenecientes a los géneros *Acidaminobacter*, *Acetovibrio*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Desulforomonas*, *Desulfobacter*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Smithella*, *Streptococcus*, *Butyrivibrio* y otros géneros pertenecientes a los phyla Proteobacteria y Firmicutes, que generan AGV, alcoholes, metilaminas y otros sustratos que serán utilizados para la formación de acetato y CH₄ (Díaz *et al.*, 2006; Ariesyady *et al.*, 2007).

Los miembros más susceptibles a los cambios ambientales en los digestores de lodos anaerobios son aquellos que utilizan ácidos grasos como fuente de carbono. La acumulación de estos ácidos orgánicos causa la disminución de pH, lo cual tiene un impacto adverso en toda la comunidad microbiana (Ariesyady *et al.*, 2007).

Dentro de esta comunidad funcional, también se encuentran las bacterias sulfatorreductoras, que son capaces de usar sulfato como aceptor terminal de electrones para su crecimiento, utilizando un compuesto orgánico (lactato y/o

acetato) o H_2 como donador de electrones. Los géneros encontrados en lodos anaerobios son *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Thermodesulfovibrio* entre otros (Freeman *et al.*, 2008).

Los organismos capaces de catalizar la síntesis reductiva de acetato a partir de compuestos como CO_2 y CO son llamados homoacetógenos y son bacterias estrictamente anaerobias, los géneros más representativos en digestores anaerobios son *Clostridium*, *Acetoanaerobium*, *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Butribacterium*, *Paleobacter*, *Treponema* y *Halophaga* (Drake *et al.*, 2002; Müller, 2003, libro nuevo). Existe otro tipo de bacterias acetógenas que se caracterizan por la producción obligada de H_2 y por su participación en la degradación de compuestos aromáticos, se denominan OHPA (*Obligate Hydrogen Producing Acetogens*): *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Syntrophospora* y *Syntrophus* (Madigan *et al.*, 2002). Estas bacterias son capaces de crecer en ambientes con bajas concentraciones de H_2 . La interacción mutualista entre las OHPA y la especies consumidoras de hidrogeno (metanógenas y las sulfatorreductoras) se ha denominado sintrofia y es decisiva para una digestión anaerobia eficiente. Esta relación sintrófica tienen un equilibrio muy frágil, aun la mínima perturbación puede desencadenar efectos inhibitorios. Específicamente las metanógenas son inhibidas por ácidos grasos (sustrato de las OHPA) y las OHPA son inhibidas por el H_2 (un sustrato de las metanógenas); el aumento en los niveles de cualquiera de los dos sustratos, eventualmente generará la inhibición de ambos grupos (Mara y Horan, 2003).

Las bacterias acetógenas compiten con fermentadores primarios por compuestos monoméricos y con fermentadores secundarios por productos de la fermentación como lactato, etanol y H_2 . En el caso del H_2 , las acetógenas también compiten con las archaeas metanógenas (Drake *et al.*, 2002).

La importancia de esta segunda comunidad funcional no sólo radica en el hecho que sus miembros son quienes mantienen los niveles ideales de pH

mediante el consumo óptimo de AGV, sino también al hecho de mantener un equilibrio perfecto entre los productores y consumidores de H₂ (Kalia *et al.*, 2008).

Finalmente la tercera comunidad microbiana está conformada por microorganismos metanógenos, los cuales producen CH₄ como producto final de su respiración. Todos los metanógenos son estrictamente archaeas anaerobias oxígeno-sensibles, que pertenecen al phylum Euryarchaeota (Liu y Whitman, 2008).

Las archaeas metanógenas son un grupo filogenéticamente diverso, con un metabolismo energético a partir de CO₂, H₂, formato, metanol, metilaminas y/o acetato (Tabla 3). Están clasificadas en 5 ordenes bien establecidos Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales y Methanopyrales, pero sólo algunos géneros se encuentran representados en digestores anaerobios *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanothermobacter*, *Methanococcus*, *Methanomicrobium*, *Methanocolleus*, *Methanofollis*, *Methanospirillum*, *Methanocorpusculum*, *Methanosarcina*, *Methanosaeta* (Liu y Whitman, 2008; Thauer *et al.*, 2008).

Tabla 3 Grupos taxonómicos de metanógenas modificado de Liu y Whitman, 2008.

Orden	Familia	Género	Sustrato
Methanobacteriales	Methanothermaceae	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter</i> <i>Methanosphaera</i>	CO ₂ /H ₂ , formato CO ₂ /H ₂ , formato CO ₂ /H ₂ + metanol
	Methanobacteriaceae	<i>Methanothermobacter</i> <i>Methanothermus</i>	CO ₂ /H ₂ , formato CO ₂ /H ₂
Methanococcales	Methanocaldococcaceae	<i>Methanococcus</i> <i>Methanothermococcus</i>	CO ₂ /H ₂ , formato CO ₂ /H ₂ , formato
	Methanococcaceae	<i>Methanocaldococcus</i> <i>Methanotorris</i>	CO ₂ /H ₂ CO ₂ /H ₂
Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanomicrobium</i> <i>Methanoculleus</i> <i>Methanofollis</i>	CO ₂ /H ₂ , formato CO ₂ /H ₂ , formato CO ₂ /H ₂ , formato

		<i>Methanogenium</i>	CO ₂ /H ₂ , formato
		<i>Methanolacinia</i>	CO ₂ /H ₂
		<i>Methanoplanus</i>	CO ₂ /H ₂ , formato
	Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	CO ₂ /H ₂ , formato
	Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>	CO ₂ /H ₂ , formato
		<i>Methanocalculus</i>	CO ₂ /H ₂ , formato
Methanosarcinales	Methanosaetaceae	<i>Methanosarcina</i>	(CO ₂ /H ₂), MeNH ₂ , Acetato
		<i>Methanococcoides</i>	MeNH ₂
		<i>Methanohalobium</i>	MeNH ₂
		<i>Methanohalophilus</i>	MeNH ₂
		<i>Methanolobus</i>	MeNH ₂
		<i>Methanomethylovorans</i>	Acetato
	Methanosarcinaceae	<i>Methanimicrococcus</i>	CO ₂ /H ₂ + MeNH ₂
		<i>Methanosalsum</i>	MeNH ₂
		<i>Methanosaeta</i>	MeNH ₂
Methanopyrales	Methanopyraceae	<i>Methanopyrus</i>	CO ₂ /H ₂

MeNH₂ metilamina

Sólo dos géneros son conocidos por usar acetato como sustrato; por lo tanto se denominan metanógenas acetoclásticas: *Methanosarcina* y *Methanosaeta*. La primera es relativamente generalista, ya que utiliza preferentemente como sustratos metanol y metilaminas que el acetato y muchas especies de este género utilizan H₂ y presentan tasas de crecimiento más rápidas. Por el contrario el género *Methanosaeta* son especialistas que sólo utilizan acetato como sustrato con tasas de crecimiento más lentas (Thauer *et al.*, 2008).

Las archaeas metanógenas que utilizan como sustratos CO₂/H₂ y formato son conocidas como hidrogenófilas. Una gran variedad de este tipo de metanógenas pertenecen a los órdenes Methanomicrobiales y Methanobacteriales. Bajos niveles de H₂ indican una eficiente metanogénesis hidrogenotrófica y usualmente se asocian con una actividad estable (<10 Pa) (Thauer *et al.*, 2008). Las archaeas metanógenas hidrogenófilas que utilizan formato como donador de electrones se encuentran entre los microorganismos con tasas de crecimiento más rápidas dentro de la comunidad microbiana de digestores anaerobios (Thauer *et al.*, 2008).

La composición de las comunidades microbianas dependen de varios factores físicos y químicos como son: el origen del lodo, ya sea municipal o industrial, tiempo de retención hidráulica y celular, temperatura y condiciones redox, entre otros. Lo que hace que los ecosistemas microbianos de cada planta de tratamiento y de cada biorreactor sean únicos y su estudio es de suma importancia para mejoras futuras en la biotecnología ambiental (Lozada *et al.*, 2004; Daims *et al.*, 2006).

2.3 Importancia del estudio de la dinámica de comunidades microbianas

La eficiencia de los procesos biológicos de tratamiento de lodos residuales está condicionada por la aclimatación y estabilidad del ecosistema microbiano presente. La falta de control en el rendimiento del proceso o la calidad del producto final suele ser consecuencia del escaso conocimiento sobre influencia que tienen los factores ambientales o biológicos en la estructura y dinámica de las comunidades microbianas responsables de llevar a cabo las diferentes reacciones de la digestión anaerobia (Lozada *et al.*, 2004).

El primer paso para biodegradar materia orgánica en una planta de tratamiento de lodos residuales es la aclimatación de los microorganismos a las nuevas condiciones ambientales, al aclimatar a las poblaciones microbianas, su metabolismo cambia y no es seguro que se reproduzcan óptimamente con las nuevas condiciones del medio, lo que podría provocar inestabilidad en todo el proceso (Andrade-Moreno y Buitrón, 2004).

La estabilidad de un ecosistema microbiano abarca un amplio espectro de definiciones. Estas definiciones se dividen en dos componentes: las propiedades funcionales del ecosistema y el cambio a través del tiempo de la composición de la comunidad. Frecuentemente sólo se evalúan los parámetros funcionales, pero recientemente se han hecho intentos para relacionar la funcionalidad del proceso

de ingeniería con la estructura de la comunidad microbiana (Fernández *et al.*, 1999; Wittebolle *et al.*, 2008).

Los métodos de cultivo utilizados tradicionalmente para caracterizar la estructura de las comunidades microbianas en el tratamiento de desechos residuales, consumen mucho tiempo y son muy laboriosos. Recientes técnicas moleculares han sido aplicadas a la identificación de grupos microbianos específicos en una población mezclada, a diferentes niveles filogenéticos, lo cual reduce el tiempo y simplifica el experimento (Liu *et al.*, 2002). Dichas técnicas aplicadas al análisis de comunidades microbianas se pueden englobar en tres grandes grupos.

El primero incluye aquellos métodos que se basan en la amplificación de genes concretos (normalmente de la subunidad de ADNr 16S en el caso de Bacteria y Archaea), clonación y secuenciación, de forma que se consiga la identificación de la mayoría de los microorganismos o filotipos presentes en una determinada comunidad. En este grupo quedaría incluido también el análisis del metagenoma o biblioteca genómica completa, de toda la comunidad. Un segundo grupo abarca las técnicas basadas en la amplificación del ADN (tanto de forma dirigida, como “aleatoria”) y su posterior evaluación, ya sea mediante digestión con endonucleasas de restricción y/o electroforesis. Normalmente, con esta estrategia se pretende conseguir un perfil o “huella genética” comparable entre distintos estadios del proceso o entre diferentes condiciones. El tercer grupo incluye todas las técnicas basadas en la hibridación de ácidos nucleicos debido a su similitud. Por lo tanto, los tres grupos de técnicas moleculares descritas no son mutuamente excluyentes sino que son y deben ser consideradas como complementarias. Lo ideal sería la utilización conjunta de varias de ellas cuando el trabajo lo requiera (Cabirol *et al.*, *in press*).

En 1993 nuevas metodologías de huella genética fueron integradas a la microbiología ambiental por Muyzer, la electroforesis en gel con gradiente de

desnaturalización (DGGE) y su homólogo, electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE). Estas técnicas permiten la separación de los fragmentos de ADN de tamaño similar pero con distinta secuencia de pares de bases (Gómez-Villalba *et al.*, 2006).

La TGGE se utiliza para proveer un perfil que representa la estructura genética y la diversidad de una comunidad microbiana en un ambiente específico, con una alta versatilidad, fiabilidad y reproducibilidad (Muyzer and Smalla, 1998). En general, la intensidad relativa de cada banda y su posición en el perfil de TGGE representan la abundancia relativa de una población dominante en particular. Por lo que se puede monitorear temporal y espacialmente los cambios en las comunidades microbianas y así pueden ser calculadas la diversidad y dinámica de la comunidad (Mertens *et al.*, 2005; Wittebole *et al.*, 2005).

Sin embargo, hay algunas desventajas asociadas a las técnicas moleculares que deben ser tomadas en consideración para proveer una interpretación válida de los resultados (Head *et al.*, 1998). La mayor limitación está relacionada con el muestreo, la recuperación de ácidos nucleicos y la elección del método de extracción de ADN, la cual tiene una influencia significativa en la generación de perfiles de comunidades microbianas, en términos de la detección de ribotipos. La amplificación de los genes ADNr 16S por PCR es otra fuente de sesgo, que puede afectar los resultados de la cuantificación de diversidad; diferencias pequeñas en las secuencias de regiones conservadas pueden resultar en la amplificación selectiva de algunas secuencias, también considerando que la llamada universalidad de los cebadores utilizados comúnmente no es absoluta (Ben-Dov *et al.*, 2006). Para el TGGE, el número e intensidad de las bandas en un gel, no necesariamente da una imagen exacta de la comunidad microbiana, debido a que un organismo puede producir más de una banda por los múltiples y heterogéneos operones de ADNr (el número de copias de genes de ADNr en el genoma de diferentes organismos puede variar entre 1 y 14) (Head *et al.*, 1998). Además, las secuencias parciales del gen ADNr 16S no siempre permiten la

discriminación entre especies y una banda puede representar dos o más especies, con secuencias parciales idénticas. También, los genes ADNr 16S de una mezcla se presentan en concentraciones muy diferentes, las secuencias menos abundantes no son amplificadas lo suficiente, para ser visualizadas como bandas en un gel de TGGE. De igual forma, se ha reportado que secuencias heteroduplex, originadas por la recombinación de hebras individuales complementarias, derivadas de diferentes fuentes y normalmente generadas durante los últimos ciclos del PCR, no migran tanto como los fragmentos normales porque éstos se desnaturalizan a diferentes temperaturas, alterando la fiabilidad del patrón (Muyzer y Smalla, 1998; Boon *et al.*, 2002). Es por estas deficiencias, inherentes a todas las técnicas moleculares que los parámetros calculados de las huellas genéticas deben ser interpretados como un indicador y no como una medida absoluta del grado de diversidad de una comunidad bacteriana (Marzorati *et al.*, 2008). Además debe considerarse que las huellas genéticas basadas en ADN solo nos dan una idea de las células más abundantes, ya sean activas, dominantes, atenuadas o muertas, por lo que con este tipo de estudio es imposible conocer la funcionalidad de cada grupo bacteriano (Boon *et al.*, 2002)

3. Justificación, objetivos e hipótesis

Justificación

El análisis de diversidad y estabilidad microbiana de los lodos provenientes de la planta de tratamiento del Cerro de la Estrella de la Ciudad de México, permitirá el entendimiento del nexo entre la diversidad microbiana y la estabilidad funcional, lo que permitirá tener mayor control del proceso.

Objetivo General

Determinar la diversidad, estructura y estabilidad microbiana de los dominios Bacteria y Archaea de lodos anaerobios tratados en un biodigestor de doble fase, para el entendimiento del nexo entre la diversidad bacteriana y la estabilidad funcional del proceso de digestión anaerobia.

Objetivos Particulares

- Extraer el ácido desoxirribonucleico (ADN) total en muestras de lodos del reactor acidogénico y del reactor metanogénico que constituyen el digestor anaerobio de doble fase, a diferentes tiempos.
- Realizar huellas genéticas del dominio Bacteria y del dominio Archaea en el reactor acidogénico y en el reactor metanogénico, mediante PCR y TGGE, para el estudio de la dinámica microbiana.
- Identificar las bandas más características y secuenciar los fragmentos amplificados para hacer una reconstrucción filogenética y estudio de la diversidad microbiana.

Hipótesis

En base a los datos físico-químicos pensaríamos que el biodigestor M1 presentará una diversidad y estabilidad bacteriana mayor y por el contrario el biodigestor AT tendrá una comunidad inestable.

4. Métodos

4.1 Reactor anaerobio de doble fase

Los lodos residuales (primarios y secundarios) utilizados en este estudio provienen de la planta de tratamiento de aguas municipales, que se ubica en el Cerro de la Estrella, en la delegación Iztapalapa de la Ciudad de México. Esta planta comenzó su operación en 1971, produciendo inicialmente un caudal a nivel secundario de 2 mil litros por segundo. Desde 1994 su capacidad ha aumentado hasta 4 mil litros de agua a nivel terciario. El tratamiento de las aguas residuales en este lugar se efectúa mediante el proceso biológico convencional de lodos activados y filtración con arena, grava y antracita, más desinfección con cloro (GDF, 2008).

Para estabilizar estos lodos, se operó un biorreactor de doble fase a escala laboratorio acidogénico-termofílico (55° C) /metanogénico-mesofílico (35° C) en semi-continuo, completamente mezclado en forma de columna, con un volumen total de 4 l y un volumen útil 2 l (Fig. 5). La primera fase del arreglo tuvo un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 1 día. El biodigestor fue alimentado con lodo combinado (60 y 40% en peso de sólidos totales de lodo primario y secundario, respectivamente). En este reactor se llevó a cabo un proceso de predigestión (fase acidogénica, AT) y con su influente se alimentó a dos biodigestores anaerobios mesofílicos en forma de huevo en semi-batch (alimentación puntual diaria) con volumen total de 8 l y un volumen útil de 5 l. Los biodigestores mesofílicos (M1 y M2) se operaron en paralelo con TRH de 13 y 10 días, respectivamente. La actividad físico-química de los lodos, de cada biodigestor en su fase de estabilización se obtuvo en un estudio previo (Tabla 4).

Las muestras de los tres biodigestores se obtuvieron al mismo tiempo, los días 0, 2, 4, 9, 18, 32, 46, 74, 102 del proceso de digestión anaerobia.

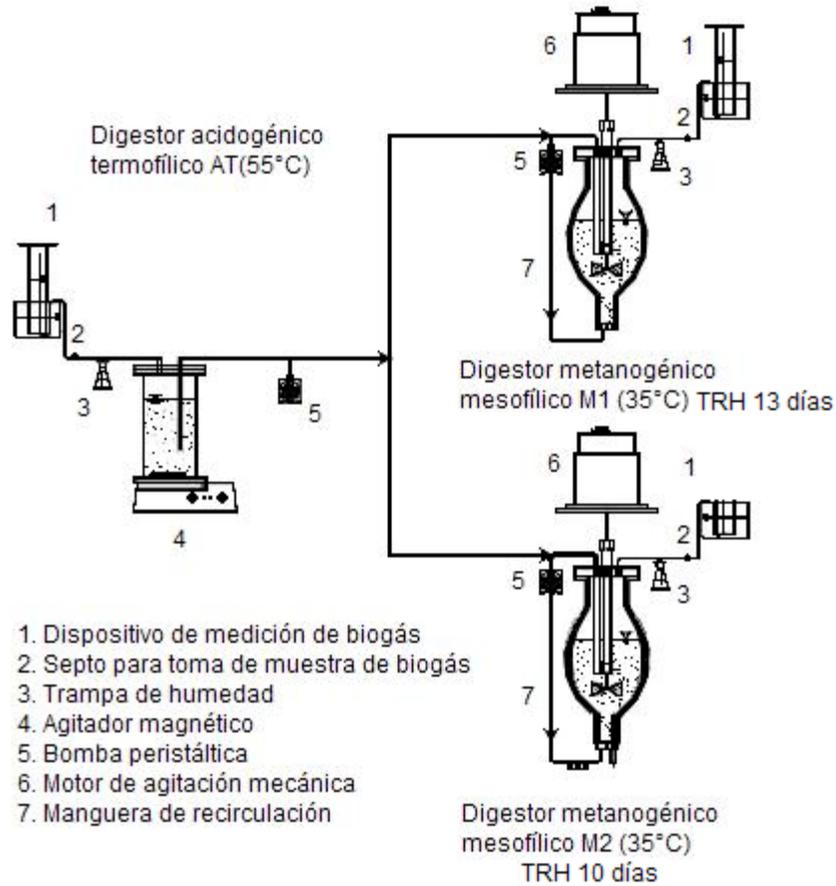


Fig. 5 Diagrama del biorreactor de doble fase, constituido por un biodigestor Acidogénico-Termodílico (AT) y dos biodigestores Metanogénicos-Mesofílicos (M1 con un tiempo de retención de 13 días y M2 con un tiempo de retención de 10 días).

Tabla 4 Datos experimentales obtenidos durante la fase de estabilización de cada biodigestor del sistema de digestión de dos fases, los valores están representados como promedio \pm desviación estándar.

	Lodo crudo	AT	M1	M2
TRH (días)	0	1	13	10
pH	6.4	6.38 \pm 0.18	7.64 \pm 0.17	7.37 \pm 0.36
Alc. (mg CaCO ³ /l)	3587	2863 \pm 602	6069 \pm 873	5916 \pm 903
Coef. Alcalinidad (α)	0.3	0.25 \pm 0.06	0.44 \pm 0.07	0.37 \pm 0.07
Ácido acético (mg/l)	ND	982 \pm 142	1601 \pm 493	2393 \pm 622
Ácido Propiónico (mg/l)	ND	331 \pm 97	195 \pm 108	774 \pm 141
Ácido i-butírico (mg/l)	ND	266 \pm 29	215 \pm 200	428 \pm 83
Ácido Butírico (mg/l)	ND	299 \pm 28	79 \pm 37	256 \pm 129
AGV Total (mg/l)	ND	1878 \pm 296	2090 \pm 838	3851 \pm 975
SST (g/l)	66.06	45.11 \pm 3.9	45.55 \pm 11.1	45.71 \pm 13.5
SSV (g/l)	36.24	22.18 \pm 3.1	25.19 \pm 7.5	25.70 \pm 8.2
%SSV/SST	55	49	55	56
% RFV	ND	21.57	22.17	20.04
Biogás (l/día)		1.49 \pm 0.4	3.07 \pm 1.4	2.72 \pm 1.6
% CH ₄		ND	64	53

ND: No determinado, RFV: Remoción de fracción volátil

Alcalinidad α (valor alfa): Es la capacidad amortiguadora de un sistema para mantener un determinado pH mediante el complejo ácido-base. El valor óptimo es de 0.5. Tal sistema contiene carbonatos en forma de ión HCO₃⁻ que neutralizan a los ácidos (principalmente grasos) en solución. Debido a que las bacterias acidógenas tienen una actividad más alta que la metanogénicas, la producción de ácidos grasos puede rebasar el balance ácido-base, en consecuencia, puede provocar una acidificación en el sistema (Tomoyuki, et al., 2006).

4.2 Extracción de ADN

La obtención de ADN total se realizó por el método de Sekiguchi y colaboradores (1998), de las muestras tomadas los días 0, 2, 4, 9, 18, 32, 46, 74, 102 del proceso de digestión anaerobia. Esto se realizó macerando las células con nitrógeno líquido y en el caso de Archaea, prescindiendo de la digestión con lisozima en función de las características de la pared celular de las archaeas. El método detallado se encuentra en el anexo 1. Se corroboró la cantidad de ADN extraído por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% TAE 1X y por espectrofotometría a 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Más Instrumentos, México).

4.3 Amplificación de ADN

Se amplificó la región variable V3 del gen ADNr 16S microbiano por PCR, utilizando cebadores para las regiones conservadas de los genes ADNr 16S tanto para el dominio Bacteria como para el dominio Archaea (Tabla 5), a una concentración de 20 μ M; cada reacción contenía 100ng de ADN total. La reacción de PCR se realizó en el termociclador *Mastercycler ep gradient S* (Eppendorf, Más Instrumentos, México). Las condiciones de PCR se describen en la siguiente tabla (Tabla 6). Cada producto de PCR incluyendo controles negativos, se observaron en un gel de agarosa 1.5% TAE 1X.

Tabla 5 Cebadores utilizados en el PCR.

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Blanco	Referencia
341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	Bacteria	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Bacteria	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
PARC340f	CCCTACGGGG(C/T)GCA(G/C)CAG	Archaea	Øvreås <i>et al.</i> , 1997
parcH519R	TTACCGCGGC(G/T)GCTG	Archaea	Øvreås <i>et al.</i> , 1997
Grapa GC	CGCCCGCCGCGCGGCGGGC GGGCGGGGGCACGGGGG		Muyzer <i>et al.</i> , 1993

Grapa GC fue agregada al extremo 5' de los primers 341f y PARC340f.

Tabla 6 Condiciones de PCR para cada dominio microbiano.

	Bacteria		Archaea		
Iniciación	94° C	5 min	94° C	4 min	
Se agregó enzima (<i>hot start</i>)	80° C		80° C		
Desnaturalización	94° C	1 min	94° C	1 min	} 30 ciclos
Alineamiento	51.6° C	1 min	58° C	1:30 min	
Elongación	72° C	1 min	72° C	1 min	
Elongación final	72° C	10 min	72° C	7 min	

4.4 Método de separación por Electroforesis en gel con gradiente de temperatura, TGGE

Los productos de PCR con la longitud correcta (Bacteria, 250 pb y Archaea, 140 pb), se utilizaron como templados en la subsiguiente TGGE por medio del *DCode Universal Mutation Detection System* (BioRad, México), con las siguientes características: gel de polibis-acrilamida al 8% para Bacteria y 10% para Archaea, TAE 1.25X, 20 µl de ADN amplificado, urea 7M para templados de Bacteria y 8M para templados de Archaea. El gradiente de temperatura para templados de Bacteria fue de 57 a 68°C y para Archaea fue de 56 a 66°C. La velocidad de temperatura para Bacteria fue de 2.0°C/h y para Archaea fue de 1.7°C/h. El voltaje para ambos templados fue de 130 V. Las bandas de ADN seleccionadas fueron cortadas, reamplificadas y purificadas con *QIA quick PCR Purification Kit*. La secuenciación de nucleótidos de las bandas de ADN, fueron determinadas por un secuenciador automático, utilizando el método de la cadena terminal dideoxi, en el secuenciador *Applied Biosystems ABI* modelo 373 (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Los fragmentos de ADN de doble cadena obtenidos por PCR son sometidos a un ambiente gradual de desnaturalización por temperatura y las cadenas de los fragmentos se separan parcialmente a temperaturas específicas llamadas dominios de desnaturalización, creando moléculas con una movilidad reducida (Muyzer *et al.*, 1998). Este comportamiento se correlaciona con la composición de pares de bases de la secuencia (contenido de guanina + citosina) y también con la posición de las grasas de GC en la molécula. Varios autores muestran que el porcentaje del contenido de GC puede ser usado para estudiar la diversidad y el cambio de una comunidad microbiana, aunque no haya correlación taxonómica (Torsvik *et al.*, 1990; Ovreås *et al.*, 1998; Nüsslein and Tiedje, 1999; Apajalahti *et al.*, 2001).

4.5 Análisis de datos

Subsecuentemente los geles y perfiles de TGGE fueron fotografiados con un *Gel Doc 2000 System* (BioRad, México) y procesados con el programa *Quantity One*. Este programa consta de: delimitación de las diferentes bandas, sustracción de fondo, marcador asistido de normalización, el cual incluye compensación de las diferencias de intensidad entre los carriles y asigna las diferentes bandas de cada carril.

El tipo de patrón obtenido por TGGE se puede analizar por el gradiente de temperatura que es cubierto por la huella misma. Entonces es posible tener un patrón con una cobertura baja, media o completa. Esta distribución de bandas puede ser correlacionada con el gradiente de desnaturalización por temperatura que es necesario para representar la diversidad total de la muestra (en los límites de la técnica) y después puede ser correlacionada con las características del ambiente analizado. De hecho, si un ambiente es muy habitable, puede albergar a muchos diferentes microorganismos y mucha variabilidad genética; por lo que, se necesitaría un gradiente amplio para describir la diversidad microbiana total. Por otro lado, si el ambiente es adverso o exclusivo, pocos microorganismos serán parte de la comunidad microbiana y por lo tanto será usado un gradiente de desnaturalización más pequeño para describir la diversidad total, esto tiene que ver con la capacidad de carga del ambiente concepto de capacidad de carga (número de individuos que los recursos de un ambiente puede soportar) de un ambiente determinado (Marzorati *et al.*, 2008).

El porcentaje en el contenido de GC en los genes ADNr 16s bacterianos puede variar entre 45 y 65%. De este modo, el patrón podrá mostrar un número determinado de bandas con variabilidad de GC (en términos de porcentaje y en términos de la posición de los fragmentos de GC en el gen ADNr 16s) dependiendo de la variabilidad genética y la capacidad de carga del ambiente estudiado, este concepto puede ser expresado matemáticamente definiendo un

índice para los rangos ponderados de riqueza (R_r) que es el número total de bandas, multiplicado por el porcentaje del gradiente de desnaturalización por temperatura necesario para describir la diversidad total de la muestra analizada. De acuerdo a la siguiente formula:

$$R_r = N^2 * (T_g / 100^\circ \text{C})$$

Donde el cuadrado del número total de bandas (N) multiplicado por la fracción entre el gradiente de temperatura (T_g), que comprende entre la primera y la última banda del patrón y 100°C , que teóricamente es el número máximo de desnaturalización. R_r se representó como el promedio y la desviación estándar para cada uno de los patrones de TGGE, en donde los rango establecidos son $R_r < 10$ se refiere a un nivel de riqueza bajo, cuando el valor de R_r se encuentra entre 10 y 30 el nivel de riqueza es medio y si $R_r > 30$ el nivel de riqueza de la comunidad será alto (Marzorati *et al.*, 2008).

Se realizó una matriz de similitud de las curvas densiométricas de los patrones de las bandas calculando el coeficiente de correlación de Pearson (producto-momento) y fueron utilizadas para realizar el análisis de “ventana-corrediza” (*Moving-Window Analysis*, MWA). El MWA consiste en unir los puntos, en una grafica de evolución en el tiempo, de los valores de correlación de dos fechas consecutivas analizadas y es útil cuando se evalúa la estabilidad de una comunidad microbiana. El promedio de la tasa de cambio porcentual (Δ_t) fue calculado como el promedio y desviación estándar de los valores de la curva del MWA, sustraídos de los valores de similitud 100%. Entre más grandes son los valores de similitud de los patrones de TGGE de un tiempo con respecto al anterior, más bajo son los puntos en el MWA y los valores de Δ_t (Possemiers *et al.*, 2004; Wittebole *et al.*, 2005).

Cada secuencia de ADN fue analizada en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el algoritmo

BLAST y específicamente con el programa BLASTN. El alineamiento de las secuencias y la construcción de los árboles filogenéticos se realizó mediante los programas *BioEdit 3.2* y *Phylip 4.0*.

5. Resultados

La fase de estabilización por digestión anaerobia, en el biorreactor de doble fase acidogénico-termofílico / metanogénico-mesofílico, se llevó a cabo durante 102 días, de los cuales se tomaron muestras los días 0, 2, 4, 9, 18, 32, 46, 74 y 102 de cada biodigestor (AT, M1 y M2). A partir de estas muestras se amplificó la región hipervariable V3 del gen ADNr 16S de los dominios Bacteria y Archaea, por medio de la técnica de PCR, para posteriormente separar los amplificados por temperatura con la técnica de TGGE.

Las bandas en los perfiles de TGGE corresponden a diferentes fragmentos del gen ADNr 16S. De esta forma reflejan las diferentes unidades operacionales taxonómicas (OTUs) encontradas en los reactores AT, M1 y M2. A partir de estos perfiles de TGGE se obtuvieron dos parámetros, rango ponderado de riqueza y la dinámica de la comunidad microbiana correspondiente. Además se secuenciaron muestras del dominio Archaea para la construcción de un árbol filogenético.

5.1 Rangos ponderados de riqueza (R_r)

Los perfiles de TGGE obtenidos a partir de los cebadores universales para el dominio Bacteria (Fig. 6), muestran entre sí, valores de R_r similares, AT = 33.33 ± 6.3 , M1 = 35.33 ± 7.6 y M2 = 26.92 ± 8.6 . Los dos primeros (AT y M1) se consideran dentro del rango alto, a diferencia de M2 que se encuentra en el rango medio.

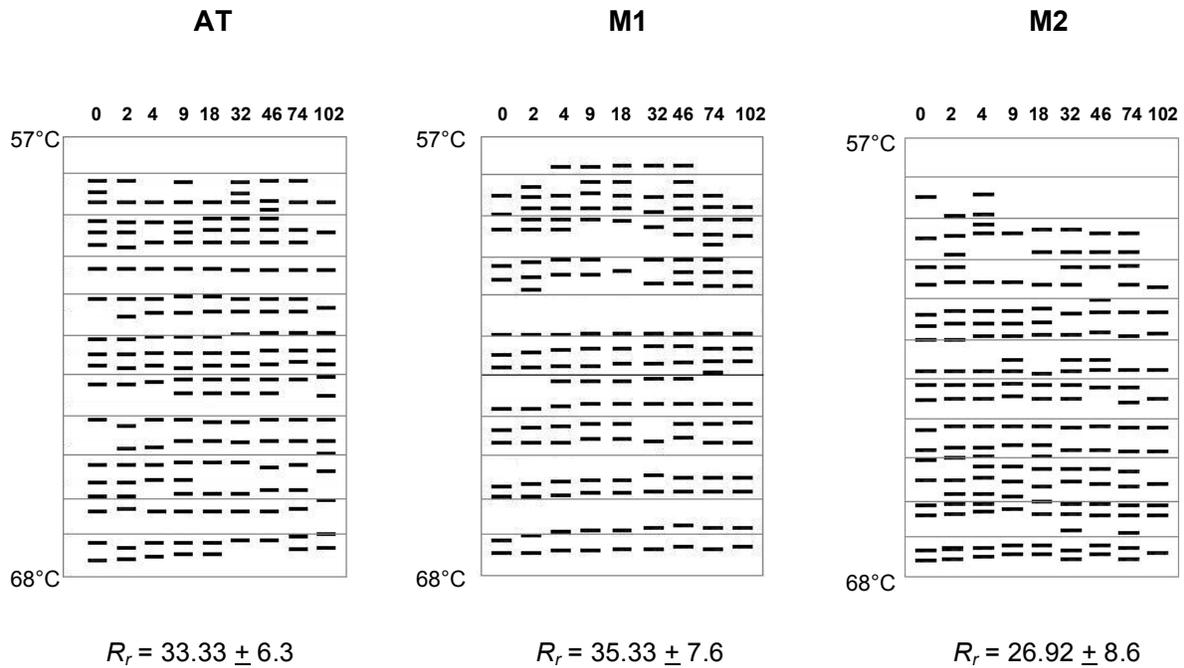


Fig. 6 Patrones de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) con cebadores universales para el dominio Bacteria. Biodigestores Acidogénico-Termofílico (AT), Metanogénico-Mesofílico 1 (M1), Metanogénico-Mesofílico 2 (M2). Valores ponderados de riqueza (R_r), promedio \pm desviación estándar. Las líneas horizontales representan el gradiente de temperatura (57°C – 68°C).

Los perfiles de TGGE de los tres biodigestores, obtenidos a partir de los cebadores universales para el dominio Archaea (Fig. 7), muestran valores de R_r bajo, AT = 3.38 ± 3.1 , M1 = 4.58 ± 5.0 y M2 = 8.78 ± 6.5 . Aun así podemos apreciar una clara diferencia entre los biodigestores AT y M1 con respecto al M2, el cual presenta un R_r del doble.

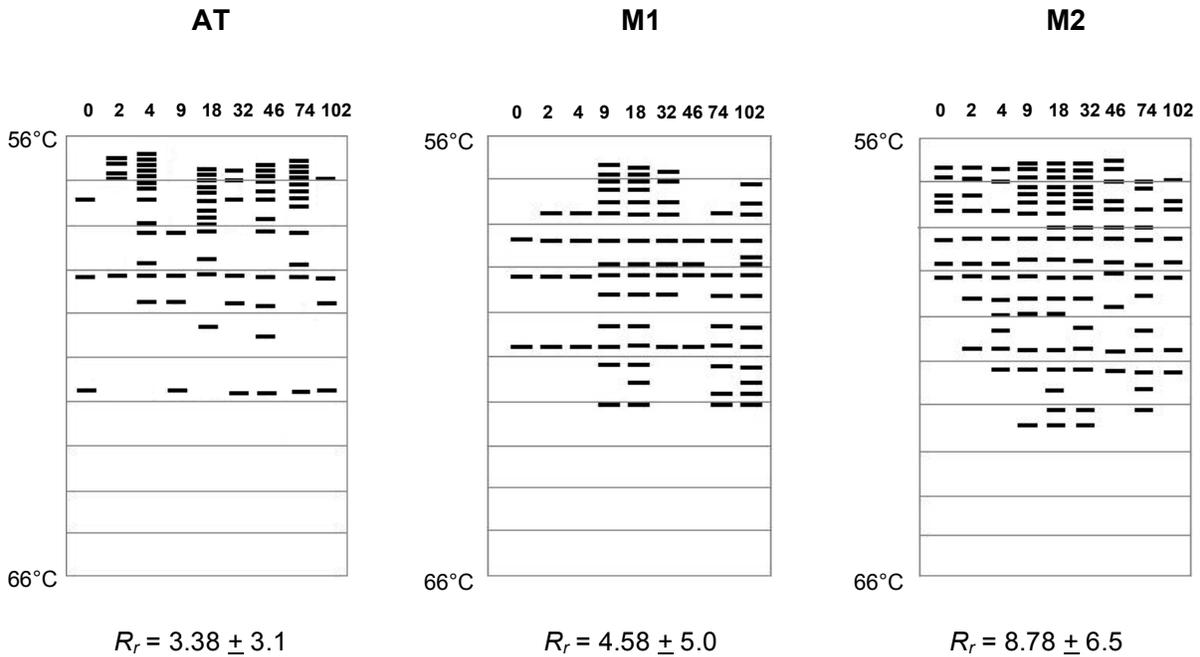


Fig. 7 Patrones de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) con cebadores universales para el dominio Archaea. Biodigestores Acidogénico-Termofílico (AT), Metanogénico-Mesofílico 1 (M1), Metanogénico-Mesofílico 2 (M2). Valores ponderados de riqueza (R_r), promedio \pm desviación estándar. Las líneas horizontales representan el gradiente de temperatura (56°C – 66°C).

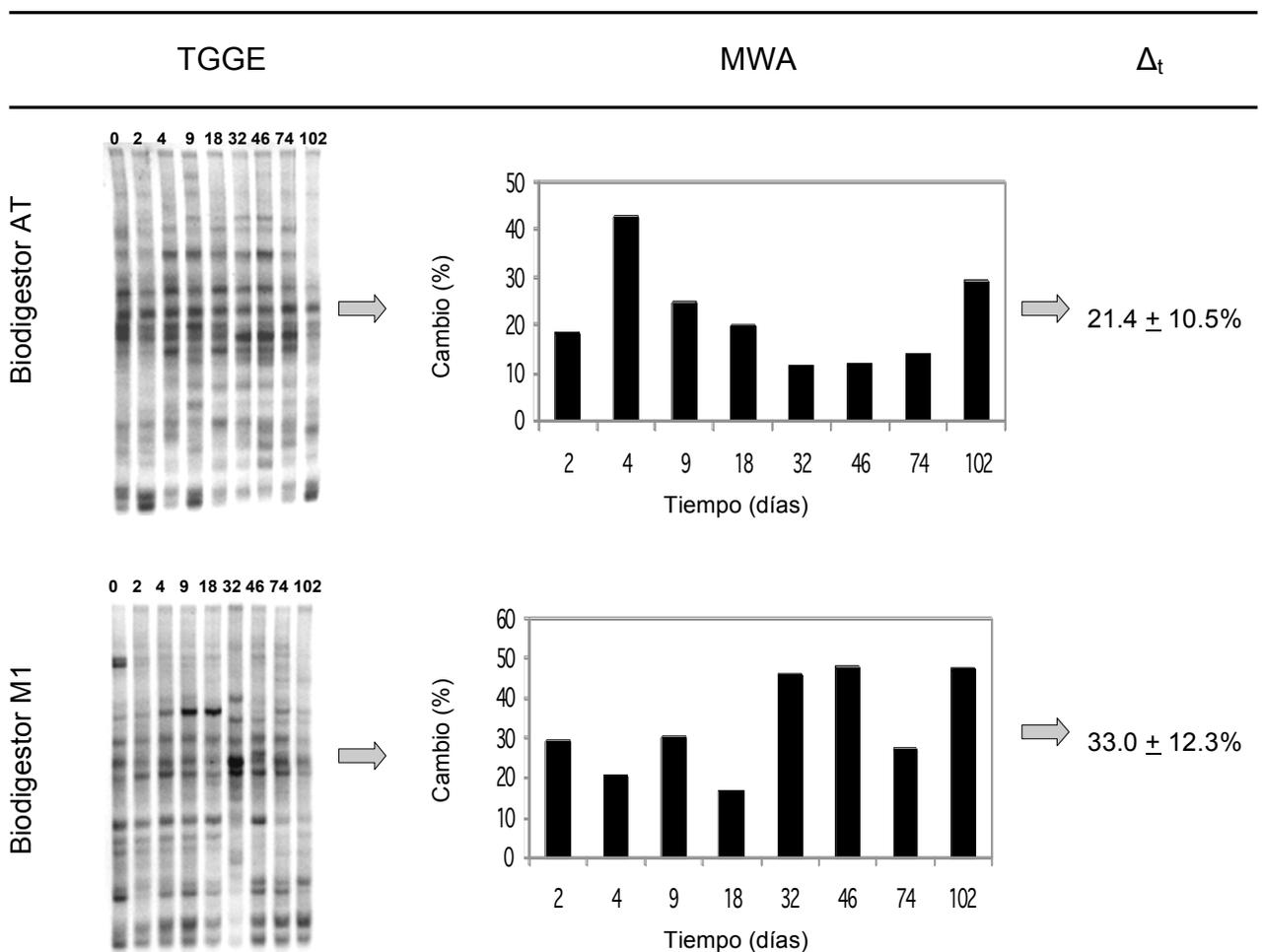
Si comparamos los perfiles de TGGE y los datos de R_r (Tabla 7), observamos que la comunidad microbiana integrada por bacterias es más abundante y diversa que la comunidad integrada por archaeas.

Tabla 7 Valores ponderados de riqueza (R_r), promedio \pm desviación estándar, de los dominios Bacteria y Archaea, en los respectivos Biodigestores, Acidogénico-Termofílico (AT), Metanogénico-Mesofílico 1 (M1), Metanogénico-Mesofílico 2 (M2).

	Bacteria	Archaea
AT	33.33 \pm 6.3	3.38 \pm 3.1
M1	35.33 \pm 7.6	4.58 \pm 5.0
M2	26.92 \pm 8.6	8.78 \pm 6.5

5.2 Dinámica (Dy)

Para analizar la dinámica microbiana tanto en el dominio Bacteria como en el dominio Archaea, de cada uno de los biodigestores se utilizó el método de análisis de “ventana-corrediza” (*Moving Window Analysis*, MWA) y a partir de estos datos se obtuvo el promedio de la tasa de cambio porcentual (Δ_t) para cada uno de los perfiles de TGGE.



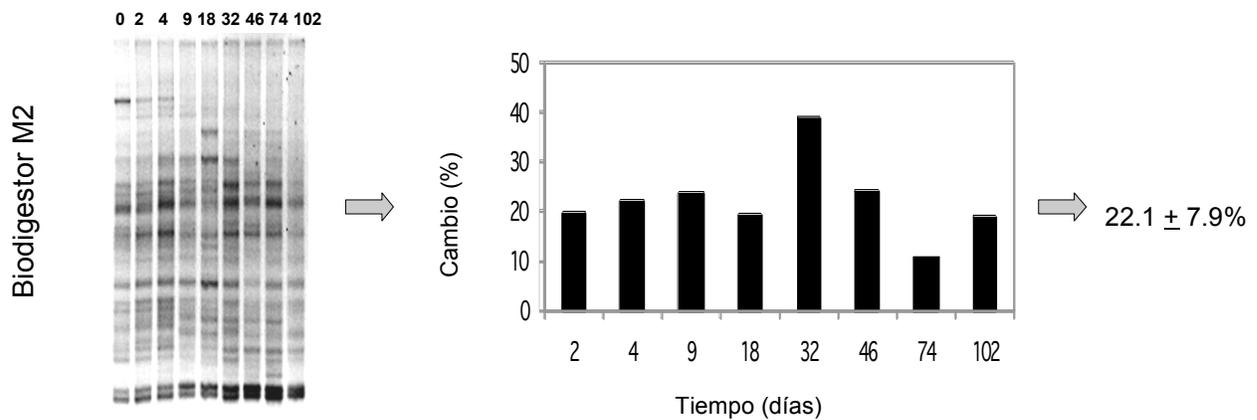


Fig. 8 Perfiles de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) de los fragmentos del gen ADNr 16S de Bacteria, *Moving Window Analysis* (MWA), de los valores porcentuales de cambio en el tiempo, del dominio Bacteria. Valores porcentuales de la tasa de cambio (Δ_t), expresados como el promedio \pm la desviación estándar para evaluar el nivel de dinamismo de la comunidad bacteriana, de los Biodigestores Acidogénico-Termofílico (AT), Metanogénico-Mesofílico 1 (M1) y Metanogénico-Mesofílico 2 (M2).

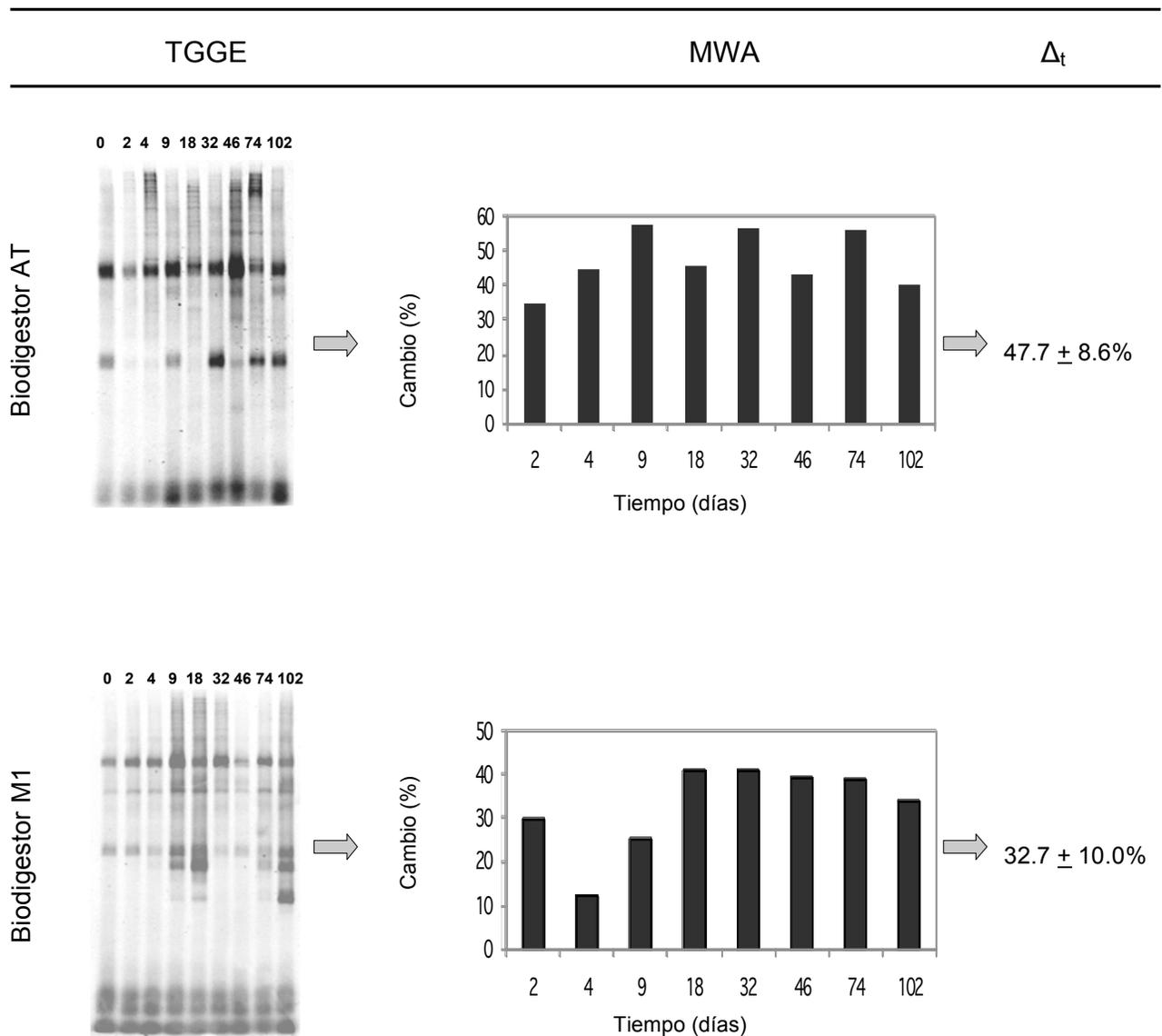
Los niveles de dinámica para los dos dominios Bacteria y Archaea (Fig. 8 y 9), presentan valores de Δ_t mayores del 20%, en los tres biodigestores (Marzorati *et al.*, 2008). Sin embargo, hay claras diferencias entre comunidades y reactores.

En la comunidad bacteriana (Fig. 8), se puede observar que la tasa porcentual de cambio en el biodigestor M1 ($33.0 \pm 12.3\%$) fue mayor que en los biodigestores AT y M2 (AT = $21.4 \pm 10.5\%$; M2 = $22.1 \pm 7.9\%$), siendo el biodigestor AT el que presenta el Δ_t más bajo.

Sin embargo, en la comunidad de Archaea (Fig. 9), el reactor AT presentó la tasa porcentual de cambio más alta (AT = $47.7 \pm 8.6\%$) y los otros dos biodigestores obtuvieron valores de Δ_t similares (M1= $32.7 \pm 10.0\%$; M2 = $31.8 \pm 8.9\%$).

Al comparar los valores de Δ_t entre comunidades, observamos que en el biodigestor AT la comunidad de Archaea tiene un promedio de cambio de

alrededor de 50%, lo cual representa más del doble del promedio de cambio de la comunidad bacteriana que es de aproximadamente 20%. El biodigestor M1 tiene un cambio promedio de 30% para ambas comunidades. Finalmente el biodigestor M2 también presenta diferencias entre el cambio promedio para las dos comunidades, siendo la bacteriana de alrededor de 20% y la de Archaea de 30%.



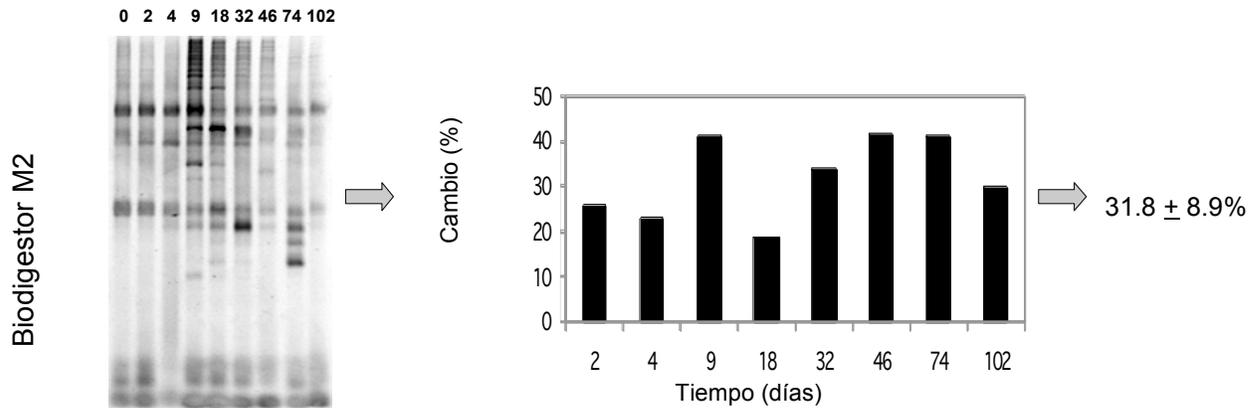


Fig. 9 Perfiles de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE), de los fragmentos del gen ADNr 16S de Archaea, *Moving Window Analysis* (MWA), de los valores porcentuales de cambio en el tiempo, del dominio Archaea. Valores porcentuales de la tasa de cambio (Δ_t), expresados como el promedio \pm la desviación, para evaluar el nivel de dinamismo de la comunidad del dominio Archaea de los Biodigestores Acidogénico-Termofílico (AT), Metanogénico-Mesofílico 1 (M1) y Metanogénico-Mesofílico 2 (M2).

5.3 Huella genética y secuenciación en el dominio Archaea

Los perfiles de huella genética de Archaea observados en AT, M1 y M2 presentan similitudes, aunque se observa un aumento de número de bandas desde el perfil AT hasta el perfil M2 (Fig. 10). Las bandas más representativas de cada uno de los geles de TGGE fueron cortadas para su posterior secuenciación. Un total de 20 bandas fueron extraídas de los geles de TGGE de la comunidad de Archaea de los biodigestores M1 y M2, de las cuales 17 fueron reamplificadas con éxito y secuenciadas en su totalidad (no fue posible la reamplificación de las muestras k, n, p). Otras 8 bandas fueron extraídas del gel de TGGE del biodigestor AT de las cuales todas fueron reamplificadas con éxito y secuenciadas completamente. Las secuencias se utilizaron para construir un árbol filogenético, con el objetivo de conocer la estructura de la comunidad microbiana (Fig. 11). Algunas bandas, físicamente separadas en el gel produjeron secuencias de ADN idénticas.

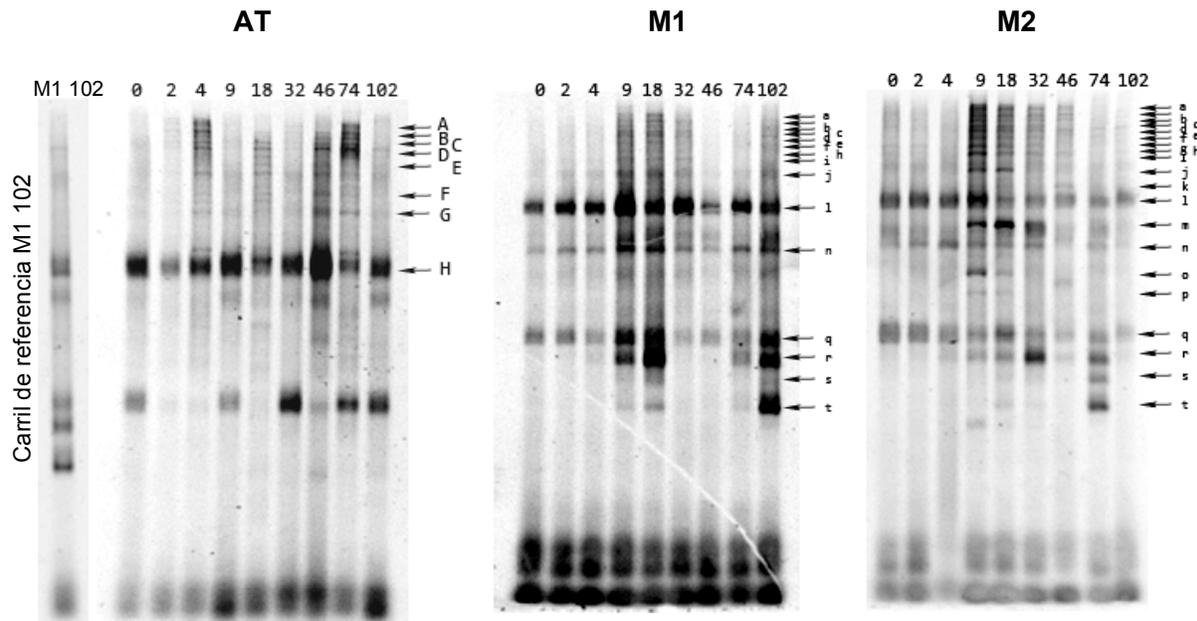
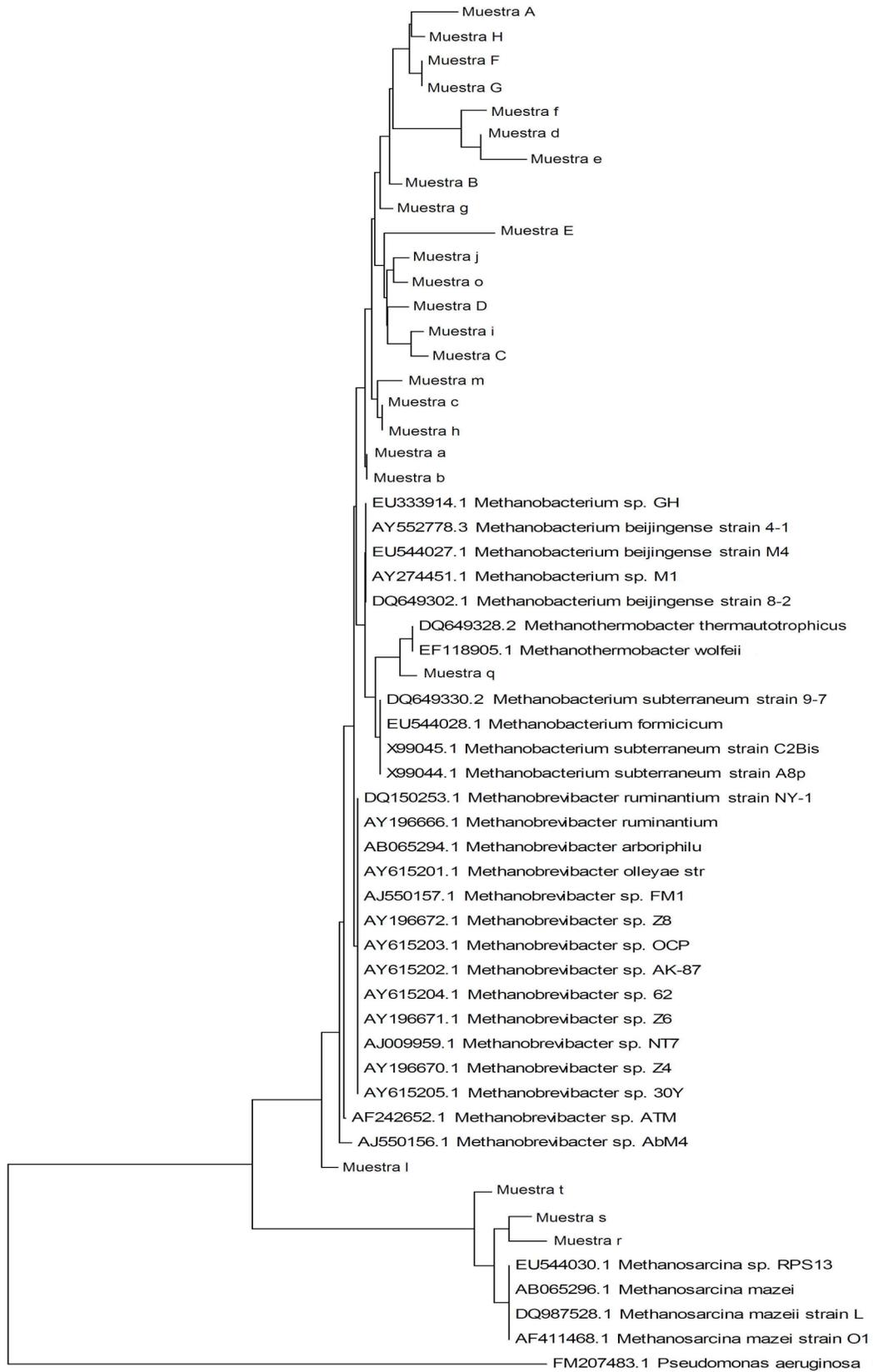


Fig. 10 Perfiles de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) de los fragmentos de la región hipervariable V3 del gen ADNr 16S de Archaea. Las flechas nombradas indican las bandas que fueron reamplificadas y secuenciadas para el análisis filogenético. Las bandas del biodigestor Acidogénico-Termofílico (AT) fueron nombradas de A hasta H y las bandas de los biodigestores Metanogénico-Mesofílico 1 y 2 (M1 y M2) fueron nombradas de a hasta t.

Se obtuvieron un total de 25 secuencias, en los tres reactores, con un porcentaje de similitud > 90%, de las 17 muestras de los biodigestores M1 y M2, doce están relacionadas con el género *Methanobacterium* (muestras a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, m, o), tres muestras están relacionadas con el género *Methanosarcina* (muestras r, s, t), una muestra está emparentada con el género *Methanobrevibacter* (muestra l) y otra muestra con el género *Methanothermobacter* (muestra q). La comunidad en el biodigestor AT estuvo integrada únicamente por un género metanógeno: *Methanobacterium* (muestras A, B, C, D, E, F, G, H).

No se realizó el mismo análisis filogenético para el dominio Bacteria por ambigüedades en la secuencia de nucleótidos, crucial para la identificación de grupos filogenéticos específicos. Lo que probablemente se deba a una reamplificación errónea, o a la degradación del material genético.



0.05

Fig. 11 Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias de ADN obtenidas a partir de cebadores universales del dominio Archaea de los tres biodigestores, Acidogénico-Termofílico (AT), Metanogénico-Mesofílico 1 (M1), Metanogénico-Mesofílico 2 (M2) y los ordenes Methanomicrobiales y Methanosarcinales. El árbol fue construido utilizando el método Neighbor-Joining, utilizando una secuencia parcial del gen ADNr 16S. Se muestran los números de acceso del DDBJ/EMBL/GenBank. El árbol fue construido utilizando a *Pseudomonas aureginosa* como grupo externo.

6. Discusión

En este estudio se analizó la diversidad y estabilidad microbiana, específicamente de los dominios Bacteria y Archaea de un biodigestor de doble fase en su etapa de estabilización, mediante la técnica de PCR-TGGE. La diversidad de las comunidades microbianas se describió en base al número de OTUs detectadas en el perfil de TGGE y la estabilidad en base a la tasa de cambio y nivel de dinámica que presentaron las comunidades. Los resultados muestran que el ecosistema microbiano en general, es muy diverso en los tres biodigestores (AT, M1 y M2) que componen la doble fase. La alta diversidad microbiana es sólo una imagen, de la alta diversidad funcional, la cual es atribuida a la complejidad del sustrato proveniente de agua residual municipal (Godon *et al.*, 1997; Chouari *et al.*, 2005). Esto concuerda con un ambiente muy habitable, es decir que tiene una gran capacidad de carga, esto se refiere al número máximo de individuos que un ambiente puede mantener, de acuerdo con sus condiciones y con la cantidad de recursos que ofrece (Marzorati *et al.*, 2008; Caravias *et al.*, 2009).

Cuando comparamos la diversidad de los dos dominios microbianos, es claro que la comunidad de Bacteria tiene mayor diversidad que la comunidad de Archaea en los tres biodigestores de acuerdo con los valores de R_r (Tabla 7). Estos resultados son afines a lo encontrado por diferentes autores (Godon *et al.*, 1997; Chachkiani *et al.*, 2004; Ariesyady *et al.*, 2007), y puede estar relacionado al hecho, que sólo dos tipos funcionales de archaeas metanógenas son conocidas en la cadena trófica de la digestión anaerobia, las acetoclásticas y las hidrogenófilas. Los miembros del dominio Bacteria, realizan todas las otras funciones de la cadena (hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis). Así mismo, la tasa de crecimiento de las bacterias fermentadoras y acetógenas (excluyendo principalmente las sintrofas) es más rápida que la tasa de crecimiento de microorganismos metanógenos (Yu *et al.*, 2002; Ariesyady *et al.*, 2007).

En base a los resultados de R_r (Tabla 7), podemos observar que la actividad fisicoquímica de los lodos, no está relacionada con la diversidad de la comunidad microbiana de cada biodigestor. Ya que el biodigestor M2 presenta la diversidad más baja para el dominio Bacteria y sin embargo tuvo una producción de AGVs mucho mayor que los otros dos digestores (AT y M1) (Tabla 4), de igual manera M2 es el que presenta una mayor diversidad para el dominio Archaea y sin embargo tuvo una producción de CH_4 menor que M1 (Tabla 4), la producción menor de CH_4 podría deberse al bajo coeficiente de alcalinidad (α) que presenta el digestor M2, ya que los valores de $\alpha < 0.5$, implican la acidificación del medio y la acidez inhibe la metanogénesis (Liu *et al.*, 2004).

En cuanto a la estabilidad de la comunidad, sabemos que entre mayor sea la cantidad de OTUs que llegan a aparecer por unidad de tiempo y en proporción al número de OTUs ya detectado, mayor puede ser el cambio de la comunidad microbiana original; de este modo la comunidad será más dinámica y la estabilidad global del proceso disminuirá (Marzorati *et al.*, 2008). Los resultados de este parámetro muestran que en general la comunidad microbiana tiene un alto nivel de dinámica, pues todos los perfiles de TGGE muestran tasas de cambio mayores al 20% (Marzorati *et al.*, 2008) (Fig. 8 y 9). Este nivel se caracteriza porque muchas poblaciones dominantes aparecen y desaparecen de la comunidad (Marzorati *et al.*, 2008; Wittebolle *et al.*, 2008). Esto tiene un impacto negativo sobre la eficiencia del sistema ya que el equilibrio entre los sustratos es muy frágil y si éste se pierde puede ocasionar la inhibición de algunas reacciones importantes para el correcto funcionamiento del proceso.

Al comparar los resultados entre los dominios microbianos, observamos que en promedio el dominio Archaea tuvo un valor de Δ_t mayor que el dominio Bacteria, es decir que la comunidad de Archaea fue menos estable que la comunidad de Bacteria, esto sugiere que nuevas especies bacterianas son capaces de desarrollarse en la comunidad, sin interferir con la funcionalidad del sistema (Marzorati *et al.*, 2008). Sin embargo se ha encontrado que las

comunidades altamente dinámicas pueden mantener una función estable en el ecosistema (Fernández *et al.*, 1999).

Entonces podemos correlacionar el funcionamiento de los biodigestores con la estabilidad de los ecosistemas microbianos de cada uno de ellos, por ejemplo en AT, la comunidad bacteriana fue más estable que la comunidad integrada por archaeas, esto pudiera deberse a que fue el que presentó un α más baja, y como se menciona antes la acidificación del medio inhibe la metanogénesis, lo cual podría estar provocando la falta de estabilidad de la comunidad de archaeas en este biodigestor. Además se ha encontrado que las altas temperaturas y bajos TRH afectan claramente la estructura y actividad de la comunidad microbiana (Nielsen *et al.*, 2003). Así mismo se sabe que las comunidades mesofílicas son más estables que las comunidades termofílicas y las comunidades microbianas más estables son menos susceptibles a los cambios ambientales (Sekiguchi *et al.*, 1998; Mladenovska y Ahring, 2000). Estos factores físicos, químicos y biológicos pudieron haber influido en la estabilidad de todo el ecosistema, provocando que en AT la generación de AGVs fuera menor que en los otros dos biodigestores y que el pH no fuera suficientemente ácido. Sin embargo en M1, la tasa de cambio en ambas comunidades (Bacteria y Archaea) fue muy parecida lo cual nos dice, que hubo un equilibrio en la estabilidad entre ambos dominios y probablemente por eso fue el biodigestor metanogénico que presentó el valor de α más cercano al óptimo para la producción de CH₄ y en efecto fue el que tuvo una producción mayor de este gas. Finalmente en M2 observamos que la comunidad bacteriana fue más estable que la comunidad de archaeas, esto puede ser la causa por la que el valor de α es bajo y el contenido de AGVs es alto, sin embargo tuvo un TRH más corto que M1. La figura muestra (Fig. 9) que al final del proceso la comunidad de archaeas comenzaba a estabilizarse, lo cual sugiere que 13 días es el TRH mínimo necesario para alcanzar un equilibrio en la estabilidad de ambas comunidades, obteniendo así la máxima eficiencia bajo estas condiciones de operación particulares y con lodos provenientes exclusivamente de la planta de tratamiento de aguas residuales del Cerro de la Estrella de la Ciudad de México.

El estudio filogenético de la comunidad de Archaea nos permitió conocer la estructura de la comunidad microbiana. Los resultados muestran que en los biodigestores metanógenos M1 y M2, el 70% de las OTUs identificadas están relacionadas con el genero *Methanobacterium*, 18% con *Methanosarcina*, 6% con *Methanobrevibacter* y otro 6% con *Methanothermobacter*. A diferencia de la comunidad del biodigestor AT en donde el 100% de las OTUs estuvieron emparentadas con *Methanobacterium*, por lo que podemos decir que la comunidad de Archaea es más diversa en los biodigestores mesofílicos que en el biodigestor termofílico. Esto concuerda con la mayoría de los estudios basados en la clonación del gen ADNr 16S ya que sugieren que los géneros metanógenos predominantes en biorreactores anaerobios son exactamente los que encontramos en este estudio (Sekiguchi *et al.*, 2001). A partir de esto podemos apuntar a que la mayoría del metano generado fue producido por metanógenas hidrogenófilas (*Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* y *Methanothermobacter*), y no por metanógenas acetatoclásticas (*Methanosarcina*). Esto posiblemente se deba a la competencia con bacterias consumidoras de ácido acético o por altas presiones parciales de H₂ en los biodigestores, que se ha encontrado acelera el metabolismo de estas metanógenas.

7. Conclusión

Hemos caracterizado cualitativamente la estructura de las comunidades bacteriana y *archaeana* en un biorreactor de lodos anaerobios de doble fase mediante el análisis de huella genética del gen ADNr 16S. Basándonos en los resultados experimentales se establecieron las siguientes conclusiones:

Se cumplió parcialmente el objetivo de este trabajo, ya que pudimos conocer la diversidad, dinámica y estructura de la comunidad de archaeas, pero no se logró obtener la estructura de la comunidad bacteriana del biorreactor de doble fase, lo cual era decisivo para poder entender el nexo entre la diversidad y estabilidad microbiana con la funcionalidad de este sistema en particular. Por lo que consideramos conveniente hacer estudios más detallados en este respecto, como por ejemplo estudios basados en ARN para conocer la actividad específica de cada comunidad.

La actividad fisicoquímica de los lodos está relacionada con la estabilidad del ecosistema microbiano presente en cada biodigestor y no con la diversidad de este.

El TRH mínimo para la estabilización del ecosistema microbiano en los biodigestores metanogénicos-mesofílicos, operados bajo estas condiciones es de 13 días, pero sabemos que el TRH debería ser menor.

La estructura de la comunidad de archaeas estuvo relacionada con los géneros *Methanobacterium* en su mayoría, así como *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter* y *Methanothermobacter*.

Las técnicas moleculares utilizadas son confiables hasta cierto punto, además de ser relativamente económicas y rápidas. La metodología de análisis

fue correcta, precisa y puede utilizarse como un parámetro de comparación en diferentes estudios, ampliando la capacidad de obtener información de las técnicas de huella genética como lo es el TGGE.

9. Anexos

9.1 Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN para lodo anaerobio. Modificado de Sekiguchi *et al.* 1998

- Tomar 0.5 g de muestra y congelar a -20°C .
- Lavar y homogenizar con 2 ml de TEN (Tris/HCl, pH 7.5 , EDTA 50 mM y NaCl 0.5 M) pH 8.
- Centrifugar durante 30 min a 7500 rpm y decantar el sobrenadante.
- En un mortero con pistilo previamente lavado, esterilizado y congelado a -20°C por lo menos 1 hora antes de usarse, congelar la muestra con nitrógeno líquido (N_2 líquido) y macerarla hasta obtener un polvo fino.
- Recuperar la muestra en tubos estériles con 2 ml de TEN (Tris/EDTA/NaCl) pH 8.0.
- Agregar proteinasa K (concentración final de 2 mg/ml) e incubar 40 min a 37°C con agitación ocasional.
- Agregar 200 μl de SDS 2% y agitar suavemente.
- Congelar en N_2 líquido y descongelar a 65°C en un baño de agua. Repetir el ciclo "congelación-descongelación" 3 veces.
- Adicionar un volumen igual de fenol (saturado c/10 mM Tris/HCl, pH 8), mezclar suavemente y centrifugar durante 5 min a 14000 rpm y temperatura ambiente. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio. Repetir esta etapa 4 veces.
- Adicionar un volumen igual de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (1:1), mezclar suavemente y centrifugar durante 5 min a 14000 rpm y temperatura ambiente.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio y precipitar los ácidos nucleicos por adición de 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 0.25 volúmenes de acetato de sodio (3 M, pH 5.2), refrigerar por lo menos 2 hrs a -20°C .
- Centrifugar durante 20 min a 7500 rpm y 4°C . Lavar la pastilla con etanol al 70% (centrifugando durante 5 min a 14000 rpm).
- Resuspender el ADN en 200 μl de ddH₂O durante al menos 1 hora a 4°C .
- Agregar ARNasa e incubar 30 min a 37°C , (concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Precipitar los ácidos nucleicos con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 0.25 volúmenes de acetato de sodio (3 M, pH 7.2), refrigerar por lo menos 2 hrs a -20°C .
- Centrifugar durante 20 min a 7500 rpm y 4°C . Lavar la pastilla con etanol al 70% (centrifugando durante 5 min a 14000 rpm).
- Disolver el ADN en 200 μl de ddH₂O estéril.
- Determinar la concentración de ADN de la muestra por espectrofotometría y/o electroforesis.

9.2 Anexo 2

Protocolo de electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

Es necesario un día antes del experimento

- Lavar las placas de vidrio con una esponja suave y jabón diluido. Enjuagar bien con agua, y luego con agua destilada. Dejar secar al aire libre, sobre un soporte.

Instalación del sistema y preparación del gel

- Proteger la mesa de trabajo con hoja de papel.
- Limpiar con alcohol el alineador, los dos separadores grises y el peine.
- Limpiar las placas de vidrio con isopropanol.
- Poner un poco de vaselina en la esquina interior de los dos vidrios, y de los dos separadores.
- Sobre la placa grande, instalar los separadores de cada lado del alineador de tal manera que estén paralelos. Poner la placa chica.
- Cuando estén alineados, poner los sujetadores.
- Nivelar la base blanca.
- Instalar el juego de placas de manera vertical en dicha base hasta que todo el material (placas y separadores) estén en contacto con ella. Cerrar los sujetadores y quitar el alineador, para formar un molde muy delgado.
- Colocar el peine con 45° de inclinación para evitar la formación de burbujas.
- Instalar el juego de placas sobre la goma.
- Diluir en 20 ml de ddH₂O, 3.893 g de acrilamida y 0.107 g de bisacrilamida y tapar.
- Agregar 1 ml de TAE 50X
- Agregar 19.2 g de Urea para obtener una concentración final de 8 M.
- Medir el volumen de la solución (aproximadamente 40 ml).
- Filtrar y desgasificar durante 10 min la solución.
- Agregar 400 ml de hipersulfato de amonio al 10% y agitar.
- Agregar 30 ml de TEMED y agitar.
- Vaciar lentamente la solución de acrilamida dentro del molde formado por las placas con una pipeta de 5 ml.
- Dejar que polimerice el gel durante 1 h
- Poner en la cámara de TGGE 175 ml de TAE 50X y aforara a 7 l.
- Cargar las muestras con una punta de extremo plano.
- Establecer los parámetros de temperatura, voltaje y velocidad para el corrimiento de gel.

8. Referencias

Aiyuk, S., Forrez, I., De Kempener, L., van Haandel, A., Verstraete, W. 2006. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates-A review. *Bioresource Technology*. 97: 2225-2241.

Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B. 2003. Applications of the anaerobic digestion process. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 82: 1-33.

Apajalahti, J.H.A., Kettunen, A., Bedford, M.R., and Holben, W.E. 2001. Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5656–5667.

Ariesyadi, H.D., Tsukasa, I., Okabe, S. 2007. Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Research*. 41: 1554-1568.

Balch, W., Fox, G., Magrum, L., Wolfe, R. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*. 43(2): 260-296.

Baldasano, J. M., Soriano, C., 1999. Emission of greenhouse gases from anaerobic digestion processes. Comparison with other MSW treatments. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes*, Barcelona, vol. 2. *Gràfiques* 92: 274-277.

Batstone, D.J., Keller, K., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. 2002. *Anaerobic Digestion Model No. 1. Scientific and Technical Report No. 13*. IWA Publishing, Cornwall, UK.

Ben-Dov, E., Shapiro, O.H., Siboni, N., Kushmaro, A. 2006. Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Applied Environmental Microbiology*. 72: 6902-6906.

Björnsson, L., Hugenholtz, P., Tyson, G. W., Blackall, L.L. 2002. Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*. 148: 2309-2318.

Bruce, A. 1984. *Sewage sludge stabilization and disinfection*. WRC Ellis Horwood Limited. U.K.

Boon, N., De Windt, W., Verstraete, W., Top, E.M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S

rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different waste-water treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 39: 101-112.

Cabirol, N., Rojas-Oropeza, M., Fernández, F.J. *Biología molecular: Herramienta para estudios de ecología microbiana aplicada a estudios ambientales*. En: "Impacto de las Nuevas Tecnologías de la Biología Molecular en el Conocimiento del Funcionamiento Celular y del Organismo", Ediciones Culturales de México D.F., Editores F. Fierro y M. Veregara, ISBN *in press*.

Chachkiani, M., Dabert, P., Abzianidze, T., Partskhaladze, G., Tsiklauri, L., Dudaui, T., Godon, J.J. 2004. 16S r DNA characterization of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*. 93: 227-232.

Chouari, R., Paslier, D.L., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., Sghir, A. 2005. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology*. 7:1104-1115.

Cirne, D.G., Lehtomäki, A., Björnsson, L., Blackall, L.L. 2007. Hydrolysis and microbial community analysis in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 516-527.

De Baere, L., 1999. Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the art. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes*, Barcelona, vol. 1. *Gràfiques* 92: 290-299.

Díaz, C., Baena, S., Fardeau, M.-L., Patel, B.K.C. 2007. *Aminiphilus circumscriptus* gen. nov., sp. Nov., an anaerobic amino-acid-degrading bacterium from an upflow anaerobic sludge reactor. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology*. 57: 1914-1918.

Díaz, E.E., Stams, A.J.A., Amils, R., Sanz, J.L. 2006. Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4942-4949.

Drake, H.L., Küsel, K., Matthies, C. 2002. Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 203-213.

Droste, R.L. 1997. *Theory and Practice of Water and wastewater treatment*, 1st Ed., John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.

Fernandez, A., Huang, S. Y., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., Tiedje, J. 1999. How stable is stable? Function versus community composition. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 3697-3704.

Freeman, S.A., Sierra-Álvarez, R., Altinbas, M., Hollingsworth, J., Stams, A.J.M., Smidt, H. 2008. Molecular Characterization of mesophilic and thermophilic sulfate reducing microbial communities in expanded granular sludge bed (EGSB) reactors. *Biodegradation*. 19: 161-177.

Ghosh, S., Pohland, F.G. 1974. Kinetics of substrate assimilation and product formation in anaerobic digestion. *Journal of Water pollution*. 46(4): 748-759.

Ghosh, S., Henry, M.P., Sajjad, A., Mensinger, M.C., Arora, J.L. 2000. Pilot-scale gasification of municipal solid wastes by high-rate and two-phase anaerobic digestion (TPAD). *Water Science and Technology*. 41(3): 101-110.

Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(7): 2802-2813.

Gómez-Villalba, B., Calvo, C., Vilchez, R., González-López, J., Rodelas, B. 2006. TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater. *Environmental Biotechnology*. 72: 393-400.

Grady, L., Daigger, G.T., Lim, H.C. 1999. *Biological wastewater treatment*, 2nd Ed., Marcel Dekker, Inc. U.S.A.

Gunaseelan, V.W. 1997. Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review. *Biomass & Bioenergy*. 13: 83-114.

Hatamoto, M., Imachi, H., Yashiro, Y., Ohashi, A., Harada, H. 2007. Diversity of anaerobic microorganisms involved in long-chain fatty acid degradation in methanogenic sludges as revealed by RNA-based stable isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(13): 4119-4127.

Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W. 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiology Ecology*. 35: 1-21.

Jiménez Cisneros, B.E. 2001. *La Contaminación Ambiental en México. Causas, efectos y tecnología apropiada*. Editorial Limusa, México.

Kalia, V.C., Purohit, H. J. 2008. Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 403-419.

Kübler, H., Rumphorst, M., 1999. Evaluation of process for treatment of biowaste under the aspects of energy balance and CO₂ emission. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes, Barcelona*, vol. 1. *Gráficas 92*: 405-410.

Liu, J., Olsson, G., Mattiasson, B. 2004. On-line monitoring of a two-stage anaerobic digestion process using a BOD analyser. *Journal of biotechnology*. 109: 263-275.

Liu, W.T., Chan, O.C., Fang, H. 2002. Microbial community dynamics during start-up of acidogenic anaerobic reactors. *Water Research*. 36: 3203-3210.

Liu, Y., Whitman, W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of metanogénica archaea. *Annals of the New York Academy of Science*. 1125: 171-189.

Lozada, M., Itria, R.F., Figuerola, E.L.M., Tullio, L.A., Erijman, L. 2004. Dinámica, selección y estabilidad de poblaciones bacterianas en barros activados. 5° Jornadas de Desarrollo e Innovación.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2000. Brock, *Biología de los microorganismos*, 10th Ed., Prentice Hall Iberia, España.

Mara, D., Horan, N.J. 2003. *The handbook of water and wastewater microbiology*. Academic Press. U.K.

Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*. 10(6): 1571-1581.

Mata-Alvarez, J. Macé, S. Llabrés, P. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*. 74: 3-16.

Mertens, B., Boon, N., Verstraete, W. 2005. Stereospecific effect of hexachlorocyclohexane on activity and structure of soil methanotrophic communities. *Environmental Microbiology*. 7(5): 660-669.

Metcalf, L., Eddy, H. 1996. *Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. 3ª Edición. McGraw-Hill, México.

Mladenovska, Z., Ahring, B.K. 2000. Growth kinetics of thermophilic *Methanosarcina* spp. Isolated from full-scale biogas plants treating animal manure. *FEMS Microbiology Ecology*. 31: 225-229.

Moreno-Andrade, I., Buitrón, G. 2004. Evolucion de la actividad de los microorganismos en los procesos de aclimatación y desaclimatacion al 4-clorofenol. XIV Congreso Nacional de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales AC, Mazatlán, Sinaloa, México.

Muyzer, G., Dewaal, E. C., Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 695–700.

Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 73: 127-141.

Müller, V. 2003. Energy conservation in acetogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(11): 6345-6353.

Narihiro, T., Sekiguchi, Y. 2007. Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbial update. *Biotechnology*. 18: 273-278.

Nielsen, P.H., Roslev, P., Dueholm, T.E., Nielsen, J.L. 2002. *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic-aerobic activated sludge plants. *Water Science and Technology*. 46: 73-80.

Nielsen, H.B., Mladenovska, P., Westerman, B., 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(3): 291-300.

Nishio, N., Nakashimada, Y. 2007. Recent development of anaerobic digestion processes for energy recovery. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 103(2): 105-112.

Nüsslein, K., Tiedje, J.M. 1999. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3622–3626.

Pier, P.A., Kelly, J.M., 1997. Measured and estimated methane and carbon-dioxide emissions from sawdust waste in the Tennessee Valley under alternative management strategies. *Bioresource Technology*. 61 (3): 213-220.

Possemiers, S., Verthe, K., Uyttendaele, S., Verstraete, W. 2004. PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*. 49: 495-507.

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Kazuaki, S., Ohashi, A., Harada, H., Nakamura, K. 1998. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*. 144: 2655-2665.

Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Harada, H. 2001. Recent advances in methane fermentation technology. *Environmental Biotechnology*. 12: 277-282.

Sharma, P. D. 2005. Environmental microbiology. Alpha Science. U.K.

Smet, E., Vanlangenhove, H., Debo, I., 1999. The emission of volatile compounds during the aerobic and the combined anaerobic/aerobic composting of biowaste. Atmospheric Environmental. 33 (8): 1295-1303.

Souza, D.Z., Smidt, H., Alves, M.M., Stams, A.J.M. 2007. *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57: 609-615.

Souza, D.Z., Pereira, M.A., Stams, A.J.M., Alves, M.M., Smidt, H., 2007. Microbial communities involved in anaerobic degradation of unsaturated or saturated long-chain fatty acids. Applied and Environmental Microbiology. 73(4): 1054-1064.

Tang, Y., Shigematsu, T., Morimura, S., Kida, K. 2005. Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation. Journal of Bioscience and Bioengineering. 99: 150-164.

Thauer, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W., Hedderich, R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. Nature Reviews Microbiology. 6: 579-591.

Tomoyuki, N., Kentaro, U., Tomoaki, N., Kunio, Y., Yoshio, H. 2006. Performance evaluation of high temperature steam gasification system for solid waste. Proc. 2nd TITech-KIMM Joint Workshop.

Torsvik, V., Goksøyr, J., and Daae, F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 56: 782-787.

Turovskiy, I.S., Mathai, P.K. 2006. Wastewater sludge processing. Wiley Interscience. U.S.A.

Vavilin, V.A., Fernández, B., Palatsi, J., Flotats, X. 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. Waste Management. 28: 939-951.

Vesilind, P.A. 2003. Wastewater treatment plant design. Water Environment Federation and IWA Publishing. U.S.A.

Wilderer, P.A., Bungartz, H.J., Lemmer, H., Wagner, M., Keller, J., Wuertz, S. 2002. Modern scientific methods and their potential in wastewater science and technology. Water Research. 36:370-393.

Wittebolle, L., Boon, N., Vanparys, B., Heylen, K., De Vos, P., Verstraete, W. 2005, Failure of the ammonia oxidation process in two pharmaceutical wastewater treatment plants is linked to shifts in the bacterial communities. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 997-1006.

Wittebolle, L., Vervaeren, H., Verstraete, W., Boon, N. 2008. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(1): 286-293.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution, *Microbiological Reviews*. 51: 221-271.

Yu, H.W., Hanson, A., Smith, G. 2002. Energy recovery from gas using two-phase anaerobic digestion. *Waste management*. 22: 1-5.

Ovreås, L., Forney, L., Daae, F.L., Torsvik, V. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9): 3367-3373.

Ovreås, L., Jensen, S., Daae, F.L., and Torsvik, V. 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 2739-2742.