



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

“SEGUIMIENTO DE LA DINÁMICA  
METANÓGENA DE DIFERENTES LODOS  
ANAEROBIOS DURANTE LA SUCESIÓN  
MICROBIANA DE MESOFÍLIA A  
TERMOFÍLIA”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ORIENTACIÓN AMBIENTAL)

P R E S E N T A:

JAIME ARTURO AVILA LICONA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NATHALIE CABIROL

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

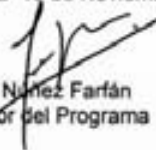
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del alumno **AVILA LICONA JAIME ARTURO** con número de cuenta **95185987** con la tesis titulada **"SEGUIMIENTO DE LA DINÁMICA METANÓGENA DE DIFERENTES LODOS ANAEROBIOS DURANTE LA SUCESIÓN MICROBIANA DE MESOFÍLIA A TERMOFÍLIA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. NATHALIE CABIROL**:

Presidente: DR. FREDERIC THALASSO  
Vocal: DRA. MARIA DEL ROCIO TORRES ALVARADO  
Secretario: DRA. NATHALIE CABIROL  
Suplente: DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO  
Suplente: DR. JOSE ADELFO ESCALANTE LOZADA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de Noviembre de 2009.



Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
RECONOCIMIENTOS .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
DEDICATORIA .....	ix
RESUMEN. ....	x
INTRODUCCIÓN. ....	1
ANTECEDENTES. ....	2
1. MARCO TEÓRICO. ....	3
1.1. Lodos residuales. ....	3
1.1.1. Clasificación de los lodos residuales. ....	3
1.1.2. Origen de los lodos residuales. ....	3
1.1.3 Características de los lodos residuales. ....	4
1.2 Métodos de estabilización de lodos residuales. ....	6
1.3 Generalidades de la digestión anaerobia. ....	7
1.3.1 Aspectos fisicoquímicos de la digestión anaerobia en sistemas de tratamiento de lodo residual. ....	8
1.3.2 Aspectos bioquímicos de la digestión anaerobia. ....	9
1.4. Arqueobacterias metanógenas. ....	15
1.4.1 Taxonomía. ....	16
1.5 Digestión anaerobia termófila. ....	17
1.6 Efecto de la temperatura sobre la comunidad arqueobacteriana en un sistema de tratamiento artificial. ....	18
1.7 Legislación para el uso y disposición de los biosólidos. ....	19
1.8 Introducción de técnicas moleculares para el estudio de las comunidades arqueobacterianas en los digestores anaerobios. ....	20
2. JUSTIFICACIÓN .....	25
3. HIPÓTESIS .....	25
4. OBJETIVOS .....	26
4.1 Objetivo general .....	26
4.2 Objetivos particulares .....	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
5.1 Primer experimento. Efecto de la termofilia sobre dos tipos de lodos mesófilos. ....	27
5.1.1 Descripción de los digestores empleados en el experimento. ....	27
5.1.2 Arranque y seguimiento de la dinámica de los lodos mesófilos a termofilia. ....	28
5.2 Segundo experimento. Efecto de la hipertermofilia (75°C) como pretratamiento en el arranque a termofilia de un lodo mesófilo. ....	29
5.3 Métodos analíticos. ....	30
5.3.1 Parámetros físicos y bioquímicos. ....	30
5.3.2 Análisis estadístico. ....	31
5.3.3 Análisis molecular: huella genética. ....	31
6. RESULTADOS. ....	34
6.1. Primer experimento. Efecto de la termofilia sobre dos tipos de lodos anaerobios mesófilos. ....	34
6.1.1 Seguimiento bioquímico durante la adecuación a termofilia. ....	34
6.1.2 Estudio de la diversidad de arqueobacterias metanógenas en la sucesión de mesofilia a termofilia. ....	43
6.2 Segundo experimento. Efecto de la hipertermofilia como pretratamiento sobre un lodo mesófilo .....	50
6.2.1 Seguimiento bioquímico y fisicoquímico durante la aclimatación a termofilia. ....	50

6.2.2 Estudio de diversidad de la comunidad de arqueobacterias en la sucesión de mesofilia a termofilia vía hipertermofilia. ....	56
7. DISCUSIÓN .....	61
7.1 Análisis bioquímico y fisicoquímico de la sucesión de mesofilia a termofilia. ....	61
7.1.1 Análisis bioquímico y fisicoquímico de lodos de diferente procedencia. ....	61
7.1.2 Análisis bioquímico y fisicoquímico de un lodo mesófilo con un pretratamiento hipertermófilo. ....	64
7.2 Análisis de la diversidad arqueobacteriana durante la sucesión de mesofilia a termofilia. ....	66
7.2.1 Análisis de la diversidad arqueobacterias en cuatro lodos de diferente procedencia .....	66
7.2.2 Diversidad arqueobacteriana en un lodo anaerobio vía un pretratamiento hipertermófilo. ....	70
8. CONCLUSIONES .....	73
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	74
ANEXOS . ....	82

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. AGENTES PATÓGENOS Y PARÁSITOS ENCONTRADOS EN LOS LODOS RESIDUALES (MENDOZA-SÁNCHEZ, 2004).	6
TABLA 2. MICROORGANISMOS QUE PARTICIPAN EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA (MENDOZA-SÁNCHEZ, 2004).	7
TABLA 3. VALORES ÓPTIMOS DE LOS PARÁMETROS EN UN LODO ANAEROBIO GRANULAR.	9
TABLA 4. REACCIONES BIOQUÍMICAS DE LAS ARQUEOBACTERIAS METANÓGENAS QUE UTILIZAN METANOL, METILAMINAS Y SULFATOS METILADOS COMO FUENTE DE CARBONO (FERRY, 1993).	15
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE LAS ARQUEOBACTERIAS METANÓGENAS (BURAK Y SHERER, 2008).	16
TABLA 6. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS ARQUEOBACTERIAS METANÓGENAS (BOONE Y GARRITY, 2001).	17
TABLA 7. RESUMEN DE LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA TERMÓFILA.	17
TABLA 8. LÍMITES PERMITIDOS DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS Y PARÁSITOS EN LOS BIOSÓLIDOS A, B Y C EN LA NOM-004-SEMARNAT-2002.	20
TABLA 9. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS INICIALES DE LOS LODOS MESÓFILOS.	27
TABLA 10. RESUMEN DE LA FRECUENCIA DE MEDICIÓN DE CADA PARÁMETRO ESTUDIADO.	29
TABLA 11. RESUMEN DE LA FRECUENCIA DE MEDICIÓN DE CADA PARÁMETRO ESTUDIADO.	30
TABLA 12. SECUENCIAS Y POSICIÓN EN <i>E. COLI</i> DE LOS CEBADORES USADOS (NIELSEN <i>ET AL.</i> , 2004).	32
TABLA 13. MEDIA ( $\bar{X}$ ) Y VARIANZA ( $S^2$ ) DE LA AME HIDROGENÓFILA ( $H_2$ ) Y ACETOCLÁSTICA ( $CH_3COOH$ ) DE LOS REACTORES EN MESOFÍLIA (0-35°C) Y TERMOFÍLIA (55°C) DURANTE 9 MESES.	34
TABLA 14. RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUCKEY-KRAMER <sub><math>\alpha=0.05</math></sub> PARA LA AME DE LOS DIFERENTES REACTORES DURANTE EL EXPERIMENTO.	36
TABLA 15. MEDIANA Y DAM DE LOS DATOS DE RIQUEZA PONDERADA ( $R_{qj}$ ) DE CADA REACTOR (M1, M8, ORI Y UAM).	44
TABLA 16. IDENTIDAD DE LAS SECUENCIAS DE LAS UTO'S SEPARADAS POR TGGE DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE V3 DEL ADNr 16S CON LAS SECUENCIAS DEPOSITADAS EN LA BASE DE DATOS ( <i>GENBANK</i> ) DE NCBI.	47
TABLA 17. MEDIA ( $\bar{X}$ ) Y VARIANZA ( $S^2$ ) DE LA AME HIDROGENÓFILA ( $H_2$ ) Y ACETOCLÁSTICA ( $CH_3COOH$ ) DE LOS CUATRO TRATAMIENTOS EN MESOFÍLIA (0-35°C) Y TERMOFÍLIA (55°C) DURANTE 4 MESES.	50
TABLA 18. RESULTADO DE LA COMPARACIÓN MÚLTIPLE DE TUCKEY-KRAMER <sub><math>\alpha=0.05</math></sub> PARA LA AME DE LOS TRATAMIENTOS DURANTE CUATRO MESES.	52
TABLA 19. MEDIANA Y DAM DE LOS DATOS DE RIQUEZA PONDERADA ( $R_{qj}$ ) DE LOS CUATRO TRATAMIENTOS.	56
TABLA 20. IDENTIDAD DE LAS SECUENCIAS DE LAS UTO'S SEPARADAS POR TGGE DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE V3 DEL ADNr 16S CON LAS SECUENCIAS DEPOSITADAS EN LA BASE DE DATOS ( <i>GENBANK</i> ) DE NCBI.	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. FLUJO GENERAL DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA EN EL CUAL SE EXHIBEN LAS 4 ETAPAS PRINCIPALES: 1. HIDRÓLISIS, 2. ACIDOGÉNESIS, 3. ACETOGÉNESIS POR BACTERIAS ACETÓGENAS PRODUCTORAS OBLIGADAS DE HIDRÓGENO (OHPA) Y BACTERIAS HOMOACETÓGENAS 4. METANOGÉNESIS, .....	10
FIGURA 2. METANOGÉNESIS HIDROGENÓFILA A PARTIR DE CO <sub>2</sub> , MF, METANOFURANO; MP, METANOPTERINA; COM, COENZIMA M; F <sub>420</sub> ox, COENZIMA F <sub>420</sub> REDUCIDA; F <sub>430</sub> , COENZIMA F <sub>430</sub> Y CoB, COENZIMA B (MADIGAN <i>ET AL.</i> , 2004), .....	13
FIGURA 3. RUTA DE LA CONVERSIÓN DE ACETATO A CO <sub>2</sub> Y CH <sub>4</sub> EN <i>M. THERMOPHILA</i> . AK, ACETATO QUINASA; PTA, FOSFOTRANSACETILASA; CA, ANHIDRASA CARBÓNICA; MCR <sup>I</sup> , METILREDUCTASA INACTIVA; MCR <sup>A</sup> , METILREDUCTASA ACTIVA; HDR, HETERODISULFURO REDUCTASA; FD, FERREDOXINA; CYT B, CITOCROMO B; H <sub>2</sub> ASA, HIDROGENADA; E <sup>-</sup> , ELECTRÓN (MODIFICADO DE FERRY, 1992), .....	14
FIGURA 4. ESQUEMA DE LAS ETAPAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, .....	21
FIGURA 5. ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL GEN ADN <sub>R</sub> 16S; REGIONES HIPERVARIABLES (V1-V9) Y CONSERVADAS (NEEF <i>ET AL.</i> , 1990), .....	22
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL REACTOR UTILIZADO EN ÉSTA INVESTIGACIÓN, .....	28
FIGURA 7. ESQUEMA QUE REPRESENTA LOS TIEMPOS A LOS QUE SE SOMETIERON LOS 4 TRATAMIENTOS A LAS DOS TEMPERATURAS 55 Y 75°C. FLECHAS ROJAS: TIEMPO EN QUE EL LOTE SE SOMETIÓ A 75 °C. FLECHA NEGRAS: TIEMPO EN QUE EL LOTE SE SOMETIÓ A 55°C, .....	30
FIGURA 8. GRÁFICAS DE LOS REACTORES QUE COMPARAN EL COMPORTAMIENTO DE LA AME (gCH <sub>4</sub> -DQO/gSSV/día) HIDROGENÓFILA Y ACETOCLÁSTICA DE LOS REACTORES EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO. TIEMPO (MESES) VS AME (gCH <sub>4</sub> -DQO/gSSV/día), .....	35
FIGURA 9A -B. VALOR PROMEDIO DE LA AME Y COEFICIENTE ALFA DE LOS LODOS ANAEROBIOS INDUSTRIALES, M1 Y M8, EN MESÓFILA (0-35°C) Y TERMOFILIA (55°C). SIMBOLOGÍA: .....	37
FIGURA 10A-B. PORCENTAJE DE CH <sub>4</sub> PRODUCIDO POR LOS LODOS ANAEROBIOS INDUSTRIALES M1 Y M8 DURANTE LOS NUEVE MESES DEL EXPERIMENTO, .....	38
FIGURA 11A-B. VALOR PROMEDIO DE AME Y COEFICIENTE ALFA DE LOS LODOS ANAEROBIOS MUNICIPALES ORI Y UAM, EN MESÓFILA (0-35°C) Y TERMOFILIA (55°C). SIMBOLOGÍA: .....	40
FIGURA 12A-B. PORCENTAJE DE CH <sub>4</sub> PRODUCIDO POR LOS LODOS ANAEROBIOS MUNICIPALES ORI Y UAM DURANTE LOS NUEVE MESES DEL EXPERIMENTO, .....	41
FIGURA 13. PATRÓN DE BANDAS DE ELECTROFORESIS EN GEL POR GRADIENTE DE TEMPERATURA (TGGE) CON CEBADORES UNIVERSALES PARA EL DOMINIO <i>ARCHAEA</i> . LOS TIEMPOS ANALIZADOS FUERON 0.5, 2.5, 3.5 Y 7 EN LOS CUATRO REACTORES ANAEROBIOS ACLIMATADOS A TERMOFILIA (M1, M8, ORI Y UAM). LAS LÍNEAS HORIZONTALES REPRESENTAN EL GRADIENTE DE TEMPERATURA (56-66°C), .....	43
FIGURA 14. PERFILES DE ELECTROFORESIS EN GEL DE GRADIENTE DE TEMPERATURA DEL GEN ADN <sub>R</sub> 16S DE <i>ARCHAEA</i> , <i>MOVING WINDOW ANALYSIS</i> (MWA), Y LOS VALORES PORCENTUALES DE CAMBIO (Δ <sub>i</sub> ). SE PRESENTA LA MÉDIA Y DAM PARA EVALUAR LA DINÁMICA DE LA COMUNIDAD DE LOS TRATAMIENTOS DURANTE EL EXPERIMENTO, .....	45
FIGURA 15. SEPARACIÓN DE AMPLICONES DE ARQUEOBACTERIAS DE LOS CUATRO REACTORES ANAEROBIOS (M1, M8, ORI Y UAM) CON TGGE. DE IZQUIERDA A DERECHA SE PRESENTAN LOS TIEMPOS 0.5, 2.5, 3.5, Y 7. GEL DE POLIACRILAMIDA 10% TEÑIDO CON SYBER-GOLD. EN CADA CARRIL SE DEPOSITÓ 15 μL DE MUESTRA. (LAS FLECHAS INDICAN LAS UTO'S OBTENIDAS CORRESPONDIENTES A LA REGIÓN HIPERVARIABLE V3 PARA EL ADN <sub>R</sub> 16S DE <i>ARCHAEA</i> ), .....	46
FIGURA 16. ÁRBOL FILOGENÉTICO <i>NEIGHBOUR-JOINING</i> BASADO EN LA SECUENCIA DE LA REGIÓN V3 DEL ADN <sub>R</sub> 16S DE <i>ARCHAEA</i> . SE MUESTRA LA POSICIÓN DE 11 SECUENCIAS PRODUCTO DE TGGE. LA BARRA INDICA UN 2% DE DIVERGENCIA ESTIMADA. LOS NÚMEROS JUNTO A LAS RAMAS INDICAN EL VALOR DE <i>BOOTSTRAP</i> CUANDO ÉSTE FUE SUPERIOR AL 50% PARA 1000 REPLICAS, .....	49
FIGURA 17. GRÁFICA DE LOS REACTORES, EN LA CUAL SE PRESENTA EL COMPORTAMIENTO DE LA AME (gCH <sub>4</sub> -DQO/gSSV/día) HIDROGENÓFILA Y ACETOCLÁSTICA DE LOS REACTORES EN EL TRANCURSO DEL EXPERIMENTO. TIEMPO (MESES) VS AME (gCH <sub>4</sub> -DQO/gSSV/día), .....	51
FIGURA 18CONTROL-C. EVOLUCIÓN AME ACETOCLÁSTICA E HIDROGENÓFILA, ASÍ COMO DEL COEFICIENTE ALFA DE LOS TRATAMIENTO CONTROL, A, B Y C. A EN MESOFILIA (35°C) Y TERMOFILIA (55°C), .....	53
FIGURA 19. PORCENTAJE DE CH <sub>4</sub> (%) DE LOS TRATAMIENTOS CONTROL, A, B Y C EN 55 °C, .....	54

FIGURA 20A-C. CONCENTRACIÓN DE AGV'S EN LOS TRATAMIENTOS CONTROL, A, B Y C. A. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO, B. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO PROPIÓNICO Y C. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO BUTÍRICO. ....	55
FIGURA 21. PATRÓN DE BANDAS OBTENIDO MEDIANTE TGGE CON CEBADORES UNIVERSALES PARA EL DOMINIO <i>ARCHAEA</i> . LOS TIEMPOS SON 0, 1, 2.5, 3.5 Y 5 MESES EN LOS CUATRO TRATAMIENTOS DEL LODO UAM ACLIMATADOS A HIPERtermofilia (75°C). ....	56
FIGURA 22. PERFILES DE ELECTROFORESIS EN GEL DE GRADIENTE DE TEMPERATURA DEL GEN ADNr 16S DE <i>ARCHAEA</i> , MWA, DE LOS VALORES PORCENTUALES DE CAMBIO ( $\Delta_r$ ). SE PRESENTA LA MEDIANA Y DAM PARA EVALUAR LA DINAMICA DE LA COMUNIDAD DE LOS TRATAMIENTOS DURANTE EL EXPERIMENTO. .	58
FIGURA 23. SEPARACIÓN DE AMPLICIONES DE ARQUEOBACTERIAS DE LOS CUATRO TRATAMIENTOS DEL LODO UAM (CONTROL, A, B Y C) CON TGGE. DE IZQUIERDA A DERECHA SE PRESENTAN LOS TIEMPOS 0, 1, 2.5, 3.5, Y 4. GEL DE POLIACRILAMIDA 10% TEÑIDO CON SYBR GOLD. EN TODOS LOS CARRILES SE AGREGARON 15 $\mu$ L DE MUESTRA. LAS FLECHAS INDICAN LAS UTO'S OBTENIDAS CORRESPONDEN A LA REGIÓN HIPERVARIABLE V3 PARA EL ADNr 16S DE <i>ARCHAE</i> . ....	59



## **RECONOCIMIENTOS**

En primer lugar quiero reconocer a CONACYT por apoyarme económicamente durante los dos años que duró este proyecto de investigación.

En segundo lugar, merece una especial mención el Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM por brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios en una maravillosa institución que tiene un nivel de primer mundo.

Quiero agradecer a la Dra. Nathalie Cabirol por ser una tutora ejemplar que con sus sabios consejos y observaciones enriqueció este proyecto. Su calidad humana y amistad hicieron que esta fase académica, a veces complicada, se tornara ligera.

Durante dos años, fue un honor tener un excelente comité tutorial que estuvo integrado por el Dr. Adelfo Escalante y el Dr. Francisco Perrino quienes me ayudaron a concluir esta etapa. Sus atinados comentarios en biología molecular y la estructura del proyecto apoyaron a reencaminar el rumbo que por un momento se perdió. No encuentro palabras para expresar el cariño y aprecio que por su generosidad fomentaron, gracias.

Una parte fundamental de la presente tesis fue la importante colaboración de la Dra. Rocío Torres que corrigió exhaustivamente el escrito visualizado muchos errores técnicos y de estilo.

El Dr. Frederic Thalasso merece un profundo reconocimiento por su acertado regaño y apoyo en todas las cuestiones de estilo de la tesis, hecho que me impulsó a mejorar y crecer como estudiante y persona.

Finalmente, el Instituto de Ingeniería de la UNAM merece una mención sobresaliente en este apartado por facilitarme el uso de sus instalaciones durante el tiempo que duró mi estancia.

## AGRADECIMIENTOS

Desde luego, siempre es complicado recordar a todas aquellas personas que colaboraron y fomentaron mi calidad humana cuyo producto es parte de este proyecto. Muchos de ellos siguen y seguirán conmigo de alguna forma en este camino, algunos de ellos ya se fueron y otros partirán. A todos aquellos que estimó, quiero, aprecio y amo les agradezco su presencia (al menos en la mente o corazón) en cada una de mis etapas tan volubles y tengo la firme confianza de que este vínculo que nos ha unido, llamado amistad, ni el tiempo ni las vicisitudes destruirán.

Agradezco en primer lugar a mis adorables padres, quienes son el todo en mi vida, son el sol y luna de mis días oscuros. Merecen estar en primer lugar porque de ellos proviene toda la fuerza y entusiasmo que se requiere para realizar mil sueños. A ellos les agradezco la oportunidad de concluir esta difícil anécdota. A Rufina y Martín, mis adorables padres, que cada día siga creciendo nuestra unión.

En segundo lugar menciono a Nathalie, que me apoyó incondicionalmente y enseñó sus dos lados, la académica y la humana. Siendo complemento de mi formación.

Es grato y un honor conocer a personas de las cuales aprendí a ser una gran persona en el ámbito profesional, dos de ellas son el Dr. Francisco Fernández Perrino y el Dr. Adelfo Escalante, quien desde un inicio me mostraron el lado amable de la investigación.

Quiero agradecer a mis hermanos: Abraham, Rodrigo, Lupita y Azucena. Por seguir dándome momentos de alegría como hace algunos ayer. El tiempo pasa y la gente cambia, pero nuestro cariño se mantiene y nos enlaza tan fuertemente que a muchos años convergimos en el mismo punto, el amor de familia y de amigos.

A mis tíos y tías, así como a Don Jorge Cordero y su familia.

A todos mis amigos “warrios” y afines, que desde hace 10 años conocí y desde entonces fomentamos nuestro aprecio como una gran familia, como una tribu que protege a cada miembro durante una jornada y que cuando llega la noche se sientan a la luz de la fogata a cantar, sollozar, reír y platicar lo vivido durante el día. Ellos son: Anidia Blanco, Edgardo Mendoza, Hiram Rosales, Leonardo Valencia, Alfredo Sánchez, Eduardo Balderas, Ángel Flores, Olga Hernández, Elva Domínguez, Gabriela Nava, Rodrigo Romero, Aldo Bernal, Edgar Flores, Orestes Genis, Minor Robles, Hugo Castellanos, Whaleeha Gudiño, Saul Contreras, Alejandra Domínguez, Gabriel Otero, Sergio Aburto, Nelía Luna y Jorge Ordoñez.

A Erandi por escuchar, relajar y consolar mi impaciencia cuando todo parecía perdido. “It's just a moment, this time will pass”. Una parte importante de mi es Rosa y Ale, mis amigos incondicionales. Extraño esas salidas bohemias y largas pláticas.

A la Dra. Ana Luisa Carreño por ser una persona que siempre me brindo de su tiempo para aconsejarme en lo académico y moral.

Agradezco a mis amiguitas y amiguitos de Ingeniería, que son: Cecilia, Kathya, Sara, Dafne, Ulises, Vladimir, Kadiya, Miguel y por supuesto a Claudia. Que siempre me sacaron una carcajada en esas tardes de trabajo y no trabajo.

A Mada y Ale, por el placer de sus interesantes y alegres platicas. Y por supuesto el gusto de habernos presentado.

A mi amiga Lyenet, que me ha divertido mucho con sus anécdotas. Así como a Hector, Paty, Luciano y Victor Luna.

Finalmente, quiero expresar toda la gama de sentimientos positivos que le dieron relieve y matices carmín a mi existencia. Palabras cortas que forman un poema escrito bajo el aire invernal y que recitamos en un eco sordo. Por todo ese amor y paciencia cultivado en días de sol, frágil como arena pero ni el vaivén del mar borrara, y que el aire esculpió en un millón de rocas. Por la ardiente flama eterna que no deja llagas y cicatriza en el corazón. Por ser mi costilla robada y mi todo en cada instante. Por acercar nuestras miradas de ciclope y desfallecernos en uno solo. Agradezco esos momentos de grandeza y que nos unirán como el río a la mar por siempre. Con amor, a mi Brenda.

## DEDICATORIA

*Muy cerca de mi ocaso, yo te bendigo,  
vida,  
porque nunca me diste ni esperanza  
fallida,  
ni trabajos injustos, ni pena inmerecida;*

*porque veo al final de mi rudo camino  
que yo fui el arquitecto de mi propio  
destino;*

*que si extraje la miel o la hiel de las cosas,  
fue porque en ellas puse hiel o mieles  
sabrosas:  
cuando planté rosales, coseché siempre  
rosas.*

*...Cierto, a mis lozanías va a seguir el  
invierno:  
¡mas tú no me dijiste que mayo fuese  
eterno!*

*Hallé sin duda largas noches de mis  
penas;  
mas no me prometiste tú sólo noches  
buenas;  
y en cambio tuve algunas santamente  
serenas...*

*Amé, fui amado, el sol acarició mi faz.  
¡Vida, nada me debes! ¡Vida, estamos en  
paz!*

*“Amado Nervo”*

*Para mis admirables Padres, Martín y  
Rufina.*

**Mi táctica es hablarte y escucharte  
construir con palabras un puente  
indestructible.**

**Mi táctica es quedarme en tu recuerdo  
no sé cómo, ni sé con qué pretexto  
pero quedarme en vos .**

**Mi táctica es ser franco  
y saber que sos franca  
y que no nos vendamos simulacros  
para que entre los dos no haya telón  
ni abismos .**

**Mi estrategia es en cambio  
más profunda y más simple**

**Mi estrategia es que un día cualquiera  
no sé cómo, ni sé con qué pretexto  
por fin me necesites.**

**“Mario Bennedetti”**

**Para mi Rosa única que espero algún día  
encontrar.**

## RESUMEN.

La digestión anaerobia termófila (55°C) es una tecnología capaz de reducir la materia orgánica, eliminar microorganismos patógenos y parásitos a un bajo costo, por tal razón es una buena opción para estabilizar los lodos producto del agua residual. Dentro del consorcio implicado en dicho proceso, las arqueobacterias metanógenas constituyen un grupo sensible a los cambios de temperatura, puesto que requieren un largo periodo de aclimatación, y por ende son causantes de fallas en los sistemas termófilos.

En la presente investigación, se analizaron dos protocolos para estudiar la dinámica de la comunidad arqueobacteriana en el arranque de reactores termófilos. El primer protocolo se diseñó para estudiar el efecto de la termofilia en la actividad metabólica y la diversidad de los dos grupos metanógenos funcionales, hidrogenófilas y acetoclásticas, procedentes de lodos industriales y municipales. Para tal efecto, se aumentó directamente la temperatura a 55°C durante 9 meses. El segundo experimento se realizó con un lodo municipal mesófilo procedente de la UAM Iztapalapa durante cuatro meses, este experimento consistió en comparar cuatro tratamientos con distinto tiempo de exposición a 75°C para después someterlos a 55°C.

Se midieron los parámetros control, AME, pH, SSV, AGV's, coeficiente alfa y proporción del biogás para conocer el comportamiento de los microorganismos involucrados. Finalmente, se introdujo la técnica molecular PCR-TGGE para conocer la diversidad de la comunidad de arqueobacterias involucrada en los procesos de la digestión anaerobia, usando secuencia de ADNr 16S con cebadores específicos para *Archaea*.

De la AME obtenida, se observó que en termofilia, las arqueas metanógenas hidrogenófilas son muy estables y producen el 70% del metano en los reactores anaerobios. De igual forma, controlando adecuadamente los parámetros fisicoquímicos se pudo obtener un lodo estable en un mes con un aumento directo a 55°C, sin necesidad de un pretratamiento.

Con respecto a los resultados de las herramientas moleculares, corroboraron los resultados de los parámetros fisicoquímicos: en que las arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas (pertenecientes a la familia *Methanobacteriaceae* y *Methanomicrobiaceae*) predominaron dentro de la comunidad de metanógenas, y solo se determinó una especie de arqueobacteria acetoclástica en los cuatro reactores estudiados. Se determinó un alto número de UTO's (unidad taxonómica operacional) de arqueobacterias hipertermófilas no metanógenas pertenecientes a la familia *Desulfurococcaceae*, que son organismos termotolerantes, anaerobios y pueden usar ácidos grasos volátiles (AGV's) como fuente de carbono para producir ácido sulfhídrico. Las implicaciones de la aparición de este grupo son importantes, pues con un mal manejo se podrían originar fallas en el sistema anaerobio.

## INTRODUCCIÓN.

El tratamiento de aguas residuales conlleva la generación de lodos, problema de índole ambiental y salud pública, que debido a su alta concentración de contaminantes como metales, materia orgánica, microorganismos patógenos y parásitos, etc., son focos de infecciones, atracción de vectores y malos olores (Cabirol *et al.*, 2002; Cabirol *et al.*, 2003). Para mitigar dicho problema, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002 que establece los límites máximos admisibles de contaminantes en los lodos y biosólidos para su aprovechamiento y disposición final.

La digestión anaerobia mesófila convencional (25 - 40°C) es un proceso metabólico en el cual diferentes grupos de microorganismos anaerobios degradan la materia orgánica hasta CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, principalmente (Kim *et al.*, 2003). Este proceso es una tecnología perdurable en sistemas artificiales de estabilización de lodos residuales y ofrece diversas ventajas, como el bajo costo económico de operación, reducción de la materia orgánica, generador de biosólidos como mejoradores de suelo, así como el aprovechamiento del metano producido como combustible. Sin embargo, su limitante es que no elimina a los microorganismos patógenos y parásitos por completo. Una opción para resolver este problema es la digestión anaerobia termófila (40 - 70 °C), la cual es capaz de producir biosólidos de calidad A (cuyo contenido de patógenos, parásitos y coliformes es la máxima permisible en la NOM-004-2002) y al eliminar la mayor parte de microorganismos patógenos y parásitos. De acuerdo a la investigación existente, se ha reportado que el tiempo de arranque de los reactores termófilos es muy prolongado y existe una alta inestabilidad de los microorganismos involucrados, lo cual constituye una seria desventaja en dicho proceso (Ferry, 1993; Van Lier, 1996; Ahring *et al.*, 2001; Cabirol *et al.* 2002; Nielsen *et al.*, 2004; Moen *et al.*, 2003 y Song *et al.*, 2004).

Las arqueobacterias metanógenas se dividen en tres grupos funcionales, de acuerdo al tipo de sustrato que utilizan como fuente de carbono: acetoclásticas, hidrogenófilas y metilótrofas (Madigan *et al.*, 2004). Las arqueobacterias metanógenas son un grupo muy sensible a los cambios de temperatura, observándose que sus tasas de crecimiento y actividad enzimática óptima son muy estrechas, inferiores a las de las bacterias, hecho que resulta una limitante durante el periodo de arranque en termofilia (Ahring, *et al.*; 2001, Nielsen, 2004). Existe poca información acerca del efecto del aumento de temperatura sobre la composición y dinámica de las arqueobacterias metanógenas, por tal motivo, es necesario estudiarlos con el objeto de comprender y disminuir los tiempos de arranque en los sistemas de tratamiento.

Aunado a lo anterior, debido a que es complicado aislar a los microorganismos del consorcio, las técnicas moleculares, entre ellas el PCR-TGGE, ofrecen una excelente opción para identificar por medio del ADNr 16S la composición de las comunidades implicadas en la digestión anaerobia durante la sucesión de mesofilia a termofilia, debido a que son técnicas rápidas y económicas. Al respecto existe poca información acerca de la composición y dinámica del grupo de las arqueas metanógenas durante el cambio de temperatura en los reactores, por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la dinámica y diversidad de las arqueas metanogénicas en los sistemas de tratamiento para disminuir los tiempos de arranque durante la termofilia.

## ANTECEDENTES.

La aplicación tecnológica de este proceso natural es empleada para el tratamiento de aguas residuales y la estabilización de lodos residuales desde finales del siglo XIX. La evolución de los procesos anaerobios está orientada a controlar la biomasa activa en el reactor y desacoplar el tiempo de retención celular (TRC) del tiempo de retención hidráulica (Mogens-Henze *et al.*, 2008). Se conocen tres tipos de reactores, llamados de primera, segunda y tercera generación.

Inicialmente se emplearon los reactores de primera generación, en los cuales el contacto de la biomasa con el sustrato es mínimo y su relación de tiempo de retención hidráulica/tiempo de retención celular es igual a 1. Esta generación de reactores son conocidos como de baja tasa (McHugh *et al.*, 2003). Los primeros en ser usados fueron los tanques sépticos e Imhoff, que posteriormente evolucionaron a bioreactores con temperatura controlada, entre los que se encuentran el digestor anaerobio convencional, lagunas anaerobias cubiertas y reactor de contacto anaerobio.

Reactores de segunda generación se basan en tres aspectos fundamentales: 1. Acumulación de la biomasa por sedimentación dentro del reactor y unión a partículas solidas o recirculación. 2. Retención de microorganismos que crecen muy lento. 3. Mejoramiento del contacto entre la biomasa y el agua residual, solucionando los problemas de difusión de sustratos o productos entre el líquido y la biopelícula. En estos sistemas, el tiempo de retención celular es superior al tiempo de retención hidráulico.

Tal avance consiguió que la tecnología se ampliara al tratamiento de aguas residuales industriales. El diseño de los reactores de filtro anaerobio son de los primeros que se caracterizan por tener a la biomasa inmovilizada en un medio inerte. El influente de agua residual atraviesa al reactor con flujo vertical, ya sea ascendente o descendente (Mogens-Henze *et al.*, 2008). Lettinga encontró que dentro de estos reactores, los microorganismos estaban agregados en forma de “gránulos” (citado en McHugh *et al.*, 2003). Los gránulos ofrecieron considerables ventajas en el tratamiento de agua y la retención de la biomasa, cuyo principio dio origen a los reactores de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB, *Upflow anaerobic sludge blanket*) que se caracteriza por sedimentar la biomasa activa que está en forma de gránulos, con un flujo ascendente del influente y en la parte superior cuenta con un sistema de separación sólido-líquido-gas (Franklin, 2001; Angelidaki *et al.*, 2003; Sallys y Uyanik, 2003).

Los reactores de tercera generación contienen microorganismos que forman una biopelícula adherida a un soporte inerte, el cual puede ser arena, grava o plástico. Entre los cuales se encuentran los reactores de lecho expandido y fluidificado (Mogens-Henze *et al.*, 2008).

## **1. MARCO TEÓRICO.**

### **1.1. Lodos residuales.**

#### **1.1.1. Clasificación de los lodos residuales.**

Los lodos residuales constituyen una suspensión concentrada de los contaminantes presentes en el agua residual cruda. Contienen compuestos orgánicos e inorgánicos (algunos de ellos tóxicos), microorganismos patógenos y parásitos. Debido a que los lodos tienen una fuerte capacidad de putrefacción atraen vectores y generan malos olores (Lue-Hing *et al.*, 1998).

Los lodos proceden de distintas etapas del tren de tratamiento, cuyas características físicas, químicas y biológicas varían de acuerdo a la etapa de la cual provienen (Winkler, 1996):

- **Lodos primarios.** Se generan del proceso de sedimentación de partículas orgánicas e inorgánicas (sedimentación primaria) y tienen en promedio un 5% de agua, color gris y olor desagradable (Winkler, 1996).
- **Lodos secundarios.** Son producto de un proceso de tratamiento biológico de agua residual. De acuerdo al método empleado, son dos tipos de lodos los más comunes: lodos activados y lodos percolados (Metcalf y Eddy, 1996).
- **Lodos combinados.** Se forman por la mezcla de lodos primarios y secundarios.
- **Lodos fisicoquímicos.** Son los sedimentos producidos durante la coagulación y floculación del tratamiento primario avanzado.

#### **1.1.2. Origen de los lodos residuales.**

De acuerdo a la naturaleza del tratamiento de agua del cual proceden, se distinguen dos tipos de lodos: industrial y municipal.

##### **A) Lodos industriales.**

Son lodos que provienen del tratamiento de agua industrial (textil, química, farmacéutica, papelera, metalúrgica, electrónica, alimenticia, curtidora, etc.). Tienen un alto contenido de pesticidas, farmacéuticos, metales, así como, solventes que pueden incluir alcoholes, ácidos orgánicos, ésteres y cetonas. Muchas sustancias son usadas en la síntesis de productos industriales, tales como halógenos, hidroxilos, aminas, nitrocomponentes, etc. (Mata-Alvarez, 2002).

La presencia de metales está asociada principalmente a la descarga de la industria química, farmacéutica, lavandería, petrolera, textil, de plástico, de pigmentos e industria metalúrgica. Los metales más frecuentes son: cadmio, cobre, zinc, níquel, mercurio, cromo, plomo, arsénico, selenio, molibdeno ([Kortenkamp et al., 1996](#); Nomanbhay y Palanisamy, 2005).

##### **B) Lodos municipales.**

Son lodos producto del tratamiento de agua doméstica, los cuales contienen una



fracción biodegradable de materia orgánica, caracterizada por la alta concentración de nitrógeno y fósforo (Roš y Drago, 2003). Otra fracción es combustible que incluye madera, papel o plástico y una tercera fracción inerte, consistente en rocas, vidrio, metales y compuestos inorgánicos (Angelidaki *et al.*, 2003). El agua residual municipal que origina a este tipo de lodos contiene una baja Demanda Química de Oxígeno (DQO) y baja concentración de metales. Estos lodos se caracterizan por exhibir grandes fluctuaciones en su composición debido a que la actividad cotidiana de los habitantes que descarga agua al sistema de drenaje varía en el transcurso del día (Angelidaki *et al.*, 2003).

### 1.1.3 Características de los lodos residuales.

Las características físicas, químicas y biológicas de los lodos residuales son parámetros de suma importancia, puesto que determinan la actividad metabólica e interacciones de los microorganismos dentro de la comunidad, permitiendo también definir el tipo de tratamiento a emplear con el objetivo de optimizar el sistema y gastos debido a que cada lodo tiene características propias.

#### 1.1.3.1 Características físicas.

**A) Contenido de sólidos suspendidos (SS).** Los sólidos son suspensiones orgánicas e inorgánicas contenidas en los lodos, cuya medida está en mg/l o porcentaje de sólidos (%). Con base en el tipo de materia, los SS se pueden dividir en: **sólidos suspendidos totales** (SST) que es la materia total del lodo. **Sólidos suspendidos fijos** (SSF) que corresponde a la materia mineral. **Sólidos suspendidos volátiles** (SSV) que es la materia orgánica e inorgánica que se calcina a  $550\pm 50^{\circ}\text{C}$  incluida en el lodo (Metcalf y Eddy, 1996).

**B) Tamaño de la partícula.** Con base en esta característica, los lodos se pueden clasificar como **no granular o granular**. Los **lodos no granulares** son aquellos en los cuales la biomasa está disgregada y no hay formación de grumos. **Los lodos granulares** son aquellos que forman lentejas o grumos que miden entre 0.14 a 5 mm (Shmidt y Ahring, 1996). Los gránulos anaerobios se componen de microorganismos sintróficos que trabajan como una unidad funcional en el proceso de digestión anaerobia e incluyen a todos los organismos involucrados en la degradación de materia orgánica hasta llegar a la metanogénesis (McCarty, 2001; McHugh, 2003).

**C) Sedimentabilidad.** Es la velocidad de sedimentación del lodo en agua, medida en unidad de volumen por tiempo (v/t). La velocidad de sedimentación de un lodo depende de la concentración de sólidos suspendidos y de las propiedades químicas y electrostáticas de la materia en suspensión (Metcalf y Eddy, 1996).

### 1.1.2.2 Características químicas.

Las características químicas de los lodos definen las opciones de tratamiento y el comportamiento del consorcio microbiano, y en cierto sentido, su disposición final. De acuerdo a su origen, los lodos pueden contener compuestos inorgánicos y orgánicos.

**a) Compuestos inorgánicos:** Son todos aquellos elementos y compuestos que no incluyen carbono. Los más importantes son los metales pesados, como es el caso del arsénico, cadmio o mercurio, entre otros, cuya acumulación en el ambiente causa serios daños en los organismos. Montalvo y Guerrero (2003) indican que los metales pesados tienen efectos tóxicos en los microorganismos que participan en el proceso de digestión anaerobia, debido a que se acumulan en las células e interactúan con el ADN, proteínas o moléculas implicadas en el metabolismo. Se ha observado que los efectos inhibitorios son más fuertes en las arqueobacterias metanógenas (a pesar que en la literatura las denominan como bacterias, en la presente investigación se adoptó la clasificación taxonómica de los tres dominios (Woese, 1990, citado en García *et al.*, 2000) y serán referidas como arqueobacterias) que en las bacterias acetoclásticas.

**b) Compuestos orgánicos.** Son todas las proteínas, lípidos, azúcares y ácidos nucleicos que funcionan como fuente de carbono y son susceptibles de ser degradados por la acción microbiana.

### 1.1.2.3 Características microbiológicas.

Como consecuencia de la concentración de materia orgánica y otros contaminantes en los lodos, los microorganismos encuentran excelentes condiciones para su desarrollo óptimo en un ambiente rico de nutrientes. Los microorganismos en los lodos residuales generalmente incluyen bacterias, arqueobacterias, hongos, algas, protozoarios, helmintos y virus cuya presencia depende del origen del lodo. Si se toma en cuenta un criterio de salubridad pública, los organismos presentes en los lodos se dividirían en dos grupos: por un lado, los organismos nocivos para la salud, patógenos y parásitos, y por otra parte, los microorganismos que participan activamente en los procesos de tratamiento (Rojas-Oropeza, 2001).

En su mayoría, los microorganismos patógenos y parásitos están ligados a enfermedades de tipo gastrointestinal. Sin embargo, también se han encontrado hongos que infectan la piel (Tabla 1). Debido a su carácter nocivo, es deseable su eliminación, la cual puede ser obtenida a través de un proceso de estabilización de los lodos residuales.

Tabla 1. Agentes patógenos y parásitos encontrados en los lodos residuales (Mendoza-Sánchez, 2004).

<b>Agentes patógenos (microorganismos y virus)</b>	
<b>BACTERIAS</b>	<i>Salmonella, Shigella, Yersinia, Mycobacterium tuberculosis, Vibrio cholerae, Campylobacter jejuni y Escherichia coli (linaje patógeno).</i>
<b>VIRUS</b>	Poliovirus, echovirus, coxsakievirus, v. de la hepatitis A, rotavirus y retrovirus.
<b>HONGOS</b>	<i>Candida sp., Tricosporon cutaneum, Aspergillus fumigatus, Tricophyllum sp. Epidemophyton sp. y Microsporium sp.</i>
<b>Microorganismos parásitos</b>	
<b>HELMINTOS</b>	<i>Ascaris lumbricoides, Ascaris suum, Trichuris trichiura, Toxocara canis, Taenia solium, Necator americanus y Hymenolepsis nana.</i>
<b>PROTOZOARIOS</b>	<i>Criptosporidium sp., Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Balantidium coli y Toxoplasma gondii.</i>

## 1.2 Métodos de estabilización de lodos residuales.

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, reducir o eliminar el potencial de putrefacción del lodo y en consecuencia, eliminar los problemas de malos olores y atracción de vectores. Su aplicación permitiría darle un uso benéfico a los mismos, como disponerlos en el ambiente de forma segura y producir mejoradores de suelo. Los procesos de estabilización de lodos pueden dividirse en métodos químicos y biológicos (Metcalf y Eddy, 1996):

**a) Estabilización química.** Consiste en adicionar algún compuesto químico a los lodos, como es el amoníaco o la cal. Esta última es el más usado debido a su bajo costo y efectividad para destruir a los microorganismos patógenos.

**b) Estabilización biológica.** Es la estabilización de los lodos mediante la acción de microorganismos. Existen tres tipos de procesos principalmente:

- **Compostaje.** Es un proceso aerobio en el cual se reduce la materia orgánica y sustancias húmicas: en términos de sólidos suspendidos la reducción a dióxido de carbono y agua es del 20 al 30%. La temperatura necesaria para el proceso oscila entre 50 y 70°C, lo cual permite que se destruyan los microorganismos patógenos y parásitos (Metcalf y Eddy, 1996).

- **Digestión aerobia.** En este tipo de estabilización de lodos, en presencia de oxígeno y durante un largo periodo de tiempo, los microorganismos degradan a la materia orgánica sin desprender malos olores. Se ha implementado este proceso en condiciones termófilas, cuyo resultado es la destrucción de patógenos (Metcalf y Eddy, 1996).

- **Digestión anaerobia.** La digestión anaerobia es un proceso metabólico realizado en ausencia de oxígeno, a través del cual se degrada la materia orgánica hasta moléculas sencillas por la acción sintrófica de diversos microorganismos anaerobios (Angelidaki *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003). Este proceso permite obtener un lodo libre de olores y patógenos, siempre y cuando sea termófilo, al mismo tiempo existe una

recuperación de energía en forma de metano (Metcalf y Eddy, 1996; Lue-Hing *et al.*, 1998).

### 1.3 Generalidades de la digestión anaerobia.

La digestión anaerobia es el proceso metabólico a través del cual la materia orgánica se degrada hasta moléculas sencillas por la actividad simultánea o secuencial de microorganismos anaerobios facultativos o estrictos. Las moléculas orgánicas (lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos) son degradados hasta CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, y componentes traza (H<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, N<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S) (Angelidaki *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; MgHugh *et al.* 2003).

En la naturaleza, la digestión anaerobia se desarrolla en ambientes sin oxígeno como son los pantanos, lagunas costeras, lagos eutróficos, fondos marinos con sedimentos orgánicos, rumen de los herbívoros, estómago de termitas, etc. (García *et al.*, 2000). Este proceso es además aprovechado en sistemas artificiales para el tratamiento de aguas residuales, como son los rellenos sanitarios y reactores anaerobios debido a su alto poder de eliminación de materia orgánica, con baja producción de biomasa y alta de biogás. Además, es llevado a cabo por una gran variedad de microorganismos que con reacciones contiguas de oxidación-reducción convierten el carbono orgánico complejo a su estado más reducido (CH<sub>4</sub>) y oxidado (CO<sub>2</sub>) (Angelidaki *et al.*, 2003).

Los microorganismos que participan en la digestión anaerobia son bacterias hidrolíticas, fermentativas, sulfurosas y acetógenas, así como arqueobacterias metanógenas. Los microorganismos más importantes se resumen en la Tabla 2 (Mendoza-Sánchez, 2004).

Tabla 2. Microorganismos que participan en la digestión anaerobia (Mendoza-Sánchez, 2004).

<b>GRUPO METABÓLICO</b>	<b>BACTERIA</b>
<b>HIDROLÍTICAS Y FERMENTATIVAS</b>	<i>Acetovibrio cellulolyticum</i> , <i>Butyrivibrio</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>Escherichia</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Propionibacterium</i> sp., <i>Ruminococcus</i> sp., <i>Bacteroides</i> sp., <i>Syntrophomonas</i> sp. <i>Syntrophobacter</i> sp.
<b>ACETOGENÉTICAS</b>	<i>Clostridium</i> sp., <i>Clostridium thermoautotrophicum</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Butyribacterium methylotrophicum</i> , <i>Acetobacterium</i> sp.
<b>SULFATORREDUCTORAS</b>	<i>Desulfomonas</i> sp., <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfosarcina</i> sp.
	<b>ARCHAEA</b>
<b>METANOGENAS</b>	<i>Methanosaeta</i> sp., <i>Methanosarcina</i> sp., <i>Methanospirillum</i> sp., <i>Methanobrevibacter</i> sp., <i>Methanospirillum</i> sp.

### 1.3.1 Aspectos fisicoquímicos de la digestión anaerobia en sistemas de tratamiento de lodo residual.

Todos los microorganismos involucrados en este proceso requieren condiciones físicas y químicas específicas para su actividad metabólica óptima. Los parámetros más importantes son los siguientes:

- **Ácidos grasos volátiles (AGV).** Son los ácidos grasos producto de la actividad metabólica de las bacterias fermentativas, como el ácido acético, butírico, propiónico, isobutírico, n-valérico y caproico (Kim *et al.*, 2002; Burak y Sherer, 2008). Debido a que las bacterias acidogénicas son más activas que las arqueobacterias metanógenas, los ácidos grasos volátiles se pueden acumular e inhibir la metanogénesis (Roš y Drago, 2003; Hori *et al.*, 2006).

- **pH.** El pH óptimo de un lodo anaerobio es de 7.3, aunque puede variar en un intervalo de 6 y 8.3, dado que fuera de este intervalo la actividad de algunos microorganismos que participan en la digestión anaerobia puede inactivarse. Si el pH es menor a 6, los ácidos volátiles se desionizan y atraviesan con facilidad la membrana celular, lo que ocasionaría que la actividad enzimática de ciertos grupos limitantes se altere (Angelidaki *et al.*, 2003; Roš y Drago, 2003; Hori *et al.*, 2006; Burak y Sherer, 2008).

- **Coefficiente alfa ( $\alpha$ ).** Es la capacidad amortiguadora de un sistema para mantener constante un determinado pH mediante el complejo ácido-base. Este parámetro es importante porque indica la relación sustrato-producto del consorcio microbiano en los reactores (APHA, 1995). El método para obtener este parámetro consiste en titular con ácido sulfúrico (0.2 N) el lodo a pH 5.75 y 4.3, y finalmente calcular la diferencia del volumen del ácido consumido en el primer pH con el volumen total del segundo pH. El valor óptimo del coeficiente alfa en los lodos anaerobios es igual o mayor a 0.5 lo cual indica una operación estable y un buen equilibrio entre los carbonatos y ácidos grasos del sistema. Sin embargo, puede ser normal encontrar valores comprendidos entre 0.2 a 0.4 como consecuencia de la alta tasa de producción de AGV's (Noyola *et al.*, 1993).

- **Temperatura.** Este factor altera las constantes de equilibrio químico porque al desplazar los valores de los parámetros, las actividades enzimáticas se aceleran o inhiben (De la Rubia *et al.*, 2005). De acuerdo a la tolerancia de los microorganismos a la temperatura, la digestión anaerobia se divide en cuatro categorías (Angelidaki *et al.*, 2003):

- **Psicrófila:**  $\leq 25^{\circ}\text{C}$ . A esta temperatura la actividad metabólica de los microorganismos es baja y los tiempos de retención hidráulica (TRH, que es el tiempo que el lodo permanece dentro del reactor) son altos, varían entre los 100 y 400 días. Estos microorganismos son usados en procesos de operación de baja tasa como son los tanques sépticos e Imhoff.

- **Mesófila:**  $25 - 40^{\circ}\text{C}$ . Es el proceso más utilizado en las plantas de tratamiento anaerobio. El TRH oscila entre los 15 y 20 días.

- **Termófila:**  $40 - 70^{\circ}\text{C}$ . Este es un proceso más difícil de controlar en sistemas artificiales, porque la actividad de los microorganismos es más rápida, pero por encima de este nivel la velocidad de crecimiento de los microorganismos acetógenos comienzan a disminuir. Los tiempos de TRH pueden alcanzar de 7 a 10 días.

- **Hipertermófila:**  $\geq 70^{\circ}\text{C}$ . Este proceso restringe el crecimiento a algunas especies de arqueobacterias y bacterias mesófilas que participan en la digestión anaerobia.

- **Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV).** Son partículas en suspensión contenidas en los lodos. La concentración de estas partículas nos permite evaluar la eficiencia de la digestión y su intervalo más común en un lodo anaerobio es de 70-120 g/l (Noyola y Moreno, 1994; Metcalf y Eddy, 1996).

- **Producción de metano.** La medición del gas generado en un reactor proporciona información sobre la eficiencia de los microorganismos durante el proceso de la metanogénesis. El biogás, mezcla de los componentes gaseosos producto de tal proceso, está compuesto principalmente por  $\text{CH}_4$  (50-80%),  $\text{CO}_2$  (20- 50%) y, en menor cantidad (1% del volumen total) de  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , y  $\text{H}_2\text{S}$  (Angelidaki *et al.*, 2003; MgHugh *et al.* 2003). La **actividad metanógena específica** (AME) se define como la producción de metano en relación al sustrato por unidad de sólidos suspendidos volátiles y tiempo ( $\text{gCH}_4\text{-DQO/gSSV/d}$ ) (Sørensen y Ahring, 1993). Esta prueba es aplicada para caracterizar la biomasa que se usa como inóculo de arranque de un nuevo reactor y para analizar la potencialidad del lodo en el proceso de degradación. Los valores de AME para un lodo anaerobio granular están en el intervalo 0.5-1.5  $\text{gCH}_4\text{-DQO/gSSV/d}$  (Noyola y Moreno, 1994).

- **La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y Demanda química de oxígeno (DQO).** Ambos parámetros se relacionan con la materia orgánica contenida en los lodos. La DBO es una medida de la cantidad de oxígeno consumido en el proceso biológico de degradación de la materia orgánica. La DQO es una medida de la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar químicamente la materia orgánica y los compuestos oxidables de una determinada muestra (Campos-Pozuelo, 2001)

La Tabla 3 resume las condiciones de temperatura y valores óptimos generales reportados en un lodo anaerobio granular.

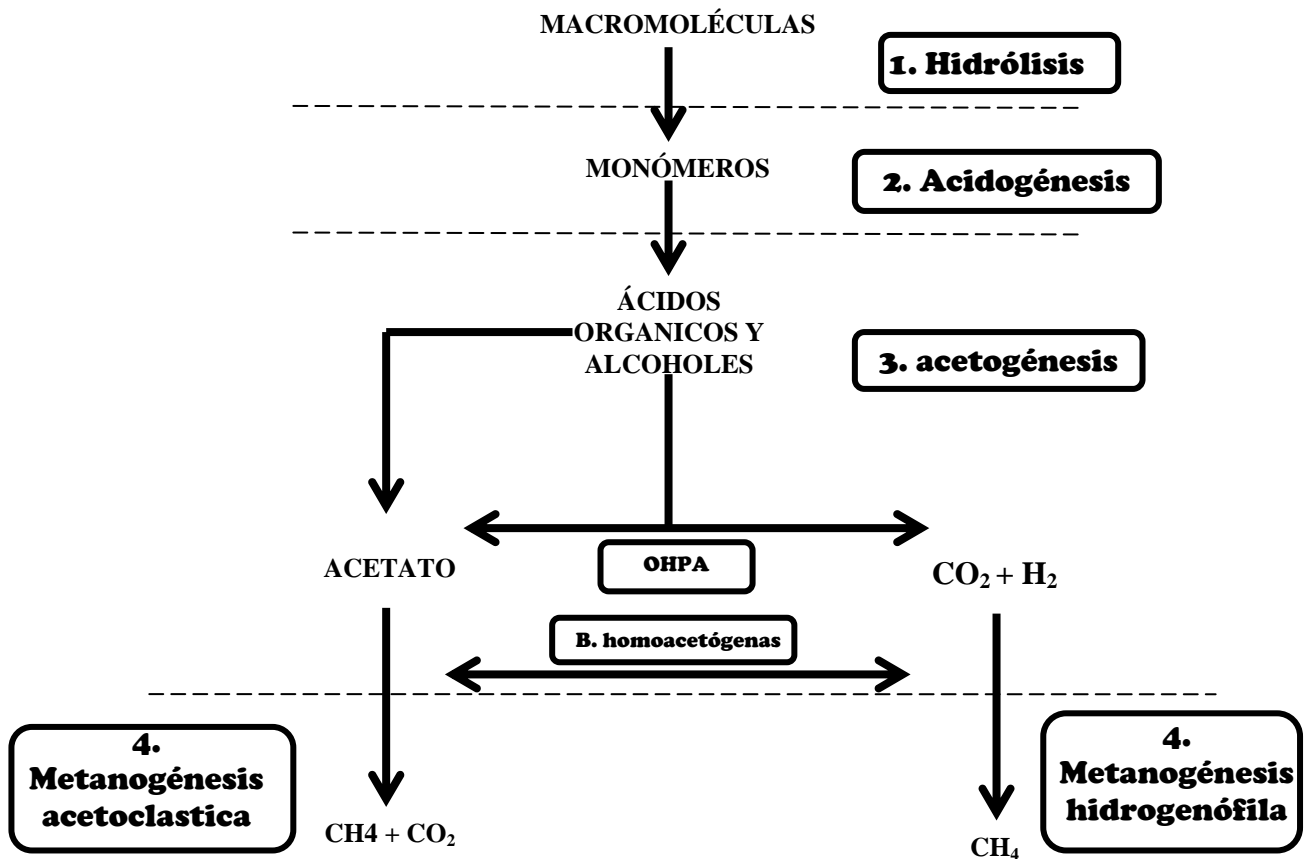
Tabla 3. Valores óptimos de los parámetros en un lodo anaerobio granular.

Temperatura	$\text{CH}_4\text{:CO}_2$ (%)	AME ( $\text{gCH}_4\text{-DQO/gSSV/d}$ )	pH	$\alpha$	SSV (g/l)	AGV's (mg/l)	DBO DQO
Psicrófila Mesófila Termófila Hipertermófila	50:50 80:20	0.5-1.5	Óptimo: 7.0- 7.2 Limite 6 y 8.3	Óptimo: >5 Limite: 0.2	70-120	Variable	

### 1.3.2 Aspectos bioquímicos de la digestión anaerobia.

La digestión anaerobia está constituida principalmente por cuatro etapas simultaneas y/o secuenciales: 1. Hidrólisis de polímeros complejos; 2. Acidogénesis ó fermentación de los monómeros disponibles; 3. Acetogénesis; y 4.Metanogénesis (Batstone *et al.*, 2002; Burak y Sherer, 2008; Roš y Drago, 2003) (Figura 1).

Figura 1. Flujo general de los compuestos orgánicos en la digestión anaerobia en el cual se exhiben las 4 etapas principales: 1. Hidrólisis, 2. Acidogénesis, 3. Acetogénesis por Bacterias acetógenas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA) y Bacterias homoacetógenas 4. Metanogénesis.



### 1.3.2.1 Hidrólisis.

Esta etapa consiste en la ruptura de polímeros complejos (lípidos, proteínas, azúcares y ácidos nucleicos) en oligómeros y monómeros (ácidos grasos de cadena sencilla, aminoácidos, monosacáridos y bases nitrogenadas) por enzimas extracelulares de bacterias hidrolíticas anaerobias facultativas y microorganismos fermentativos primarios (Roš y Drago, 2003). La hidrólisis de polímeros orgánicos facilita el transporte de los monómeros a través de la membrana celular para su posterior metabolismo dentro de la célula (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 un paso limitante del proceso de digestión anaerobia (Vavilin *et al.*, 2008).

### 1.3.2.2 Acidogénesis o Fermentación.

Las bacterias fermentativas anaerobias estrictas y facultativas usan como sustrato los monómeros y oligómeros producidos en la anterior etapa para sintetizar AGV's de cadena corta y larga (como los ácidos propiónico, butírico, n-valérico y caproico) que son utilizados como aceptores y donadores de electrones.

Entre las bacterias que realizan la hidrólisis y acidogénesis se encuentran: *Acetovibrio cellulolyticum*, *Butyrivibrio* sp., *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Escherichia* sp., *Micrococcus* sp., *Propionibacterium* sp., *Ruminococcus* sp., *Bacteroides* sp., entre otras (Mendoza-Sánchez, 2004).

### 1.3.2.3 Acetogénesis.

En esta etapa, los AGV's son degradados hasta ácido acético principalmente, pero también existe la producción de formiato, CO<sub>2</sub> e hidrógeno (H<sub>2</sub>). Existen dos rutas metabólicas para la acetogénesis:

a) **Homoacetogénesis** (acetogénesis por hidrogenación): producción de acetato a partir de alcoholes, AGV's o H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Existen dos formas de producir acetato a partir de esta vía:

La primera es por la ruta de la glucólisis, en la cual la glucosa se rompe en dos moléculas de piruvato, cuya oxidación genera tres moléculas de acetato como producto final. *Clostridium* sp. y *Acetobacterium* sp. son especies que participan en este proceso (Madigan *et al.*, 2004).

La segunda ruta es por la medio de la vía acetil-CoA (Ljungdahl-wood) la cual consiste en la fijación de dos moléculas de CO<sub>2</sub> para sintetizar el complejo acetil-CoA. Una molécula de CO<sub>2</sub> es reducida en un CH<sub>3</sub> por la enzima tetrahidrofolato. La otra molécula de CO<sub>2</sub> es reducida a CO por la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa que también cataliza la unión del grupo CH<sub>3</sub> y CO a la Acetil-CoA. Finalmente, la Acetil-CoA es transformada en acetil-P que es intermediaria al acetato y ATP (Madigan *et al.*, 2004).

b) **Acetogénesis heterofermentativa** (acetogénesis por deshidrogenación): se produce acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, por la actividad de las bacterias acetógenas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA por sus siglas en inglés *Obligate Hydrogen Producing Acetogens*) que dependen de la presión parcial del H<sub>2</sub>. Estas bacterias degradan los ácidos grasos volátiles hasta acetato, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por β-oxidación (Mendoza-Sánchez, 2004). Estas dos últimas moléculas son empleadas como fuente de carbono de las arqueobacterias metanógenas o de las bacterias sulfatorreductoras en presencia de sulfatos (Madigan *et al.*, 2004). Esta etapa depende también de la presión parcial del H<sub>2</sub>, de tal forma que cuando llega a 10<sup>-4</sup>atm se inhibe la actividad de las bacterias heterofermentativa. Consecuentemente, la acción de los consumidores de H<sub>2</sub> permite mantener presiones bajas en el sistema (Madigan *et al.*, 2004).

### 1.3.2.4 Metanogénesis.

La metanogénesis es una ruta metabólica que reduce a los derivados de metanol, acetato o CO<sub>2</sub> (con H<sub>2</sub> como aceptor de electrones) hasta metano y es llevada a cabo por las arqueobacterias metanógenas. Dichos microorganismos son encontrados en ambientes anaerobios (desde el rumen de herbívoros e intestinos de humanos, hasta sedimentos lacustres y marinos) y forman parte del ciclo global del carbono.

La metanogénesis se lleva a cabo por tres rutas:

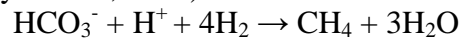
- Hidrogenófila: se produce metano a partir de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>.



- Acetoclástica: se emplea el acetato (CH<sub>3</sub>-COOH) como fuente de carbono.
- Metilótrofa: utiliza metanol o sus derivados como fuente de carbono.

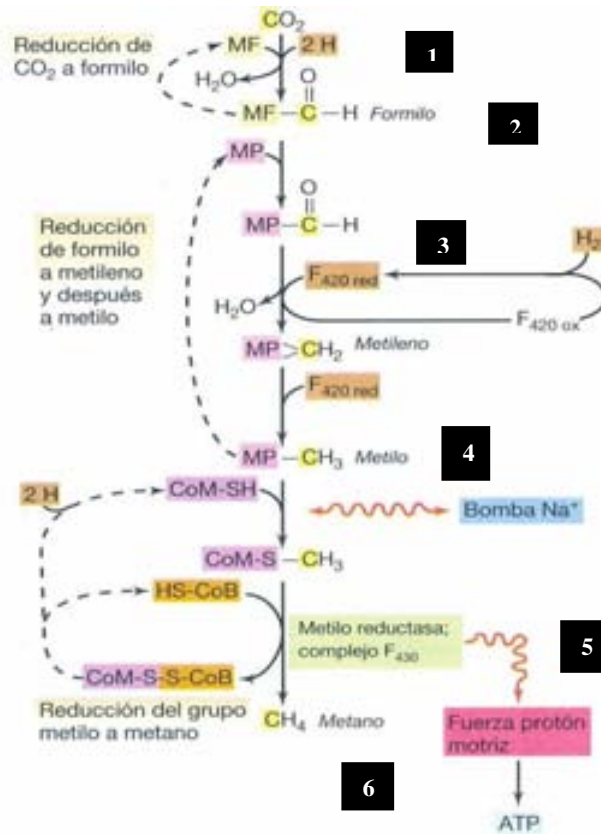
#### 1.3.2.4.1 Metanogénesis hidrogenófila.

La reducción de CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> es dependiente de la presión de H<sub>2</sub> y se realiza por medio de las coenzimas metanofurano (MFR), tetrahidrometanopterina (H<sub>4</sub>MPT) y coenzima M (H-S-CoM) (Figura 2). Si el CO<sub>2</sub> está en forma de carbonato, la reacción tiene la siguiente ecuación (Atlas y Bartha, 1998):



El CO<sub>2</sub> es activado por la coenzima metanofurano (MFR) (paso 1) y posteriormente reducido a formilo (paso 2). El grupo formilo es transferido del metanofurano a la tetrahidrometanopterina (H<sub>4</sub>MPT) (paso 3). Este grupo es deshidratado y reducido a metileno y metilo en dos etapas sucesivas (paso 4). El grupo metilo es transferido de la metanopterina a la Coenzima M (paso 5), en donde es reducido a metano por la actividad del complejo metilreductasa, en el cual intervienen el complejo F<sub>430</sub> y la mercaptoheptanoilteonina fosfato (HTP). El donador de electrones para esta reacción es la mercaptoetanoilteonina (HS-htp) y el producto de la reacción es metano (6).

Figura 2. Metanogénesis hidrogenófila a partir de CO<sub>2</sub>. MF, metanofurano; MP, metanopterina; CoM, coenzima M; F<sub>420red</sub>, coenzima F<sub>420</sub> reducida; F<sub>430</sub>, coenzima F<sub>430</sub> y CoB, coenzima B (Madigan *et al.*, 2004).



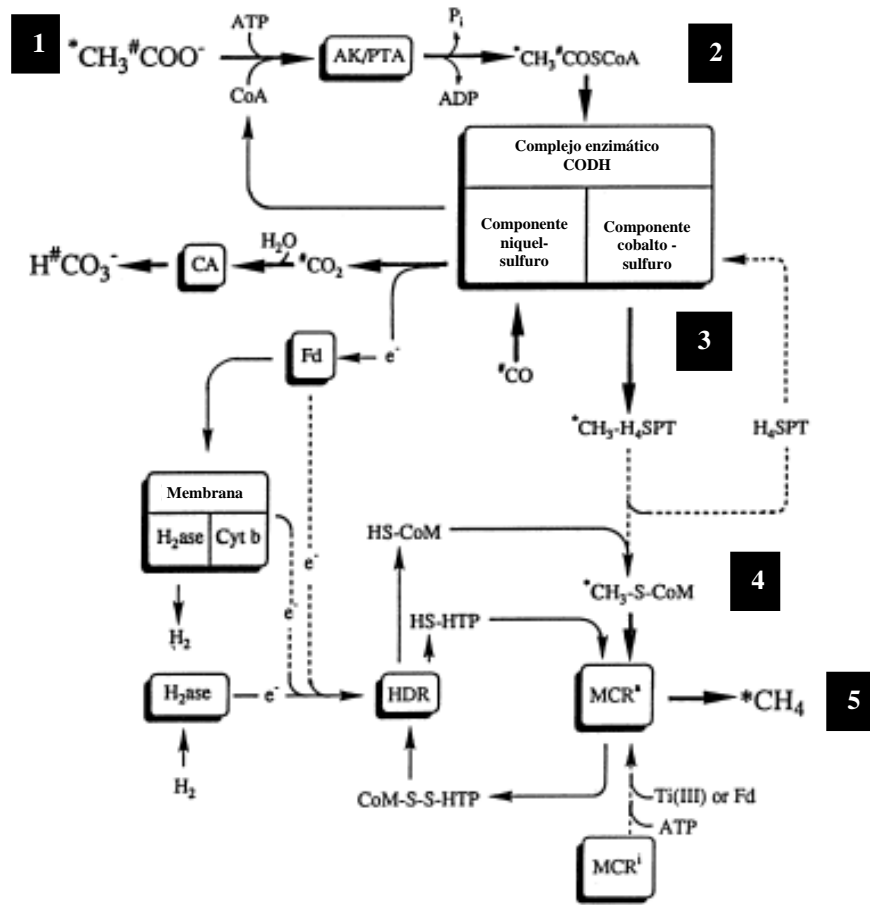
### 1.3.2.4.2 Metanogénesis acetoclástica.

La formación de metano a partir de la ruta del acetato es diferente para los distintos grupos de arqueobacterias metanógenas. A continuación se presenta la ruta típica de *Methanosarcina thermophila*, que ejemplifica el proceso (Fournier y Gogarten, 2008) (Figura 3).

La enzima acetatoquinasa y fosfotransacetilasa activan al acetato y al complejo acetil-CoA (paso 1). Posteriormente (paso 2), el complejo enzimático CO deshidrogenasa (CODH, molécula que tiene dos componentes, cobalto-sulfuro y níquel-sulfuro) cataliza la acetil-CoA para favorecer la oxidación del grupo metilo a  $\text{CO}_2$ , así como la transferencia del grupo metilo al cofactor tetrahidrosarcinapterina ( $\text{H}_4\text{SPT}$ ) (también llamada tetrahidrometanopterina) (paso 3). Sin embargo, en algunos organismos el enlace del grupo carbonilo es oxidado a  $\text{CO}_2$  y el grupo metilo es transferido a la enzima corrinóide para transferirlo al complejo tetrahidrometanopterina (Madigan, 2004).

A continuación, el grupo metilo es transportado a la coenzima M ( $\text{CH}_3\text{-CoM}$ ) (paso 4). El paso final, es la desmetilación reductiva del complejo  $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$  a  $\text{CH}_4$  que es catalizada por la  $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$  metil reductasa (paso 5) usando los electrones generados de la oxidación de CO a  $\text{CO}_2$  por la CODH.

Figura 3. Ruta de la conversión de acetato a  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  en *M. thermophila*. AK, acetato quinasa; PTA, fosfotransacetilasa; CA, anhidrasa carbónica;  $\text{MCR}^i$ , metilreductasa inactiva;  $\text{MCR}^a$ , metilreductasa activa; HDR, heterodisulfuro reductasa; Fd, ferredoxina; Cyt b, citocromo b;  $\text{H}_2$ asa, hidrogenada;  $e^-$ , electrón (modificado de Ferry, 1992).



### 1.3.2.4.3 Metanogénesis metilotrónica.

Este tipo de metabolismo comprende la formación de metano a partir de metanol, metilaminas y sulfatos metilados (Ferry, 1993). En menor grado, algunas arqueobacterias metanógenas, utilizan esta ruta metabólica junto a alguna de las anteriores mencionadas para obtener energía. Estos compuestos son transferidos por un sistema de anillos proteínicos de tetrapirrol y posteriormente a la CoM; tal compuesto, entra a la vía de la metanogénesis y es reducido a  $\text{CH}_4$  (Liu y Whitman, 2008). Las reacciones se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Reacciones bioquímicas de las arqueobacterias metanógenas que utilizan metanol, metilaminas y sulfatos metilados como fuente de carbono (Ferry, 1993).

REACCIÓN	AG° KJ/mol CH <sub>4</sub>
1. 4 CH <sub>3</sub> OH → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	-106
2. CH <sub>3</sub> OH + H <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	-112.5
3. 4 CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>3</sub>	-76.7
4. 2 (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 NH <sub>3</sub>	-74.8
5. 4 (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N + 6 H <sub>2</sub> O → 9 CH <sub>4</sub> + 3 CO <sub>2</sub> + 4 NH <sub>3</sub>	-75.8
6. 2 (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> S + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> S	-52.1
7. 4 (CH <sub>3</sub> )SH + 2 H <sub>2</sub> O → 3 CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4 H <sub>2</sub> S	-51
8. (CH <sub>3</sub> )SH + H <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> S	-69.3
9. 4 H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> → CH <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	-130.4
10. CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> + H <sup>+</sup> → CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub>	-36.0
11. 4 CO + 2 H <sub>2</sub> O → CH <sub>4</sub> + 3 CO <sub>2</sub>	-211

#### 1.4. Arqueobacterias metanógenas.

El grupo de las metanógenas pertenece al dominio *Archaea*. Morfológicamente, exhiben una amplia variedad de formas y tamaños que incluyen cocos regulares e irregulares, bastones, cadenas de cocos, espirilos, sarcinas o placas irregulares. Algunas presentan movilidad o pueden estar agregados (Beveridge y Schultze-Lam, 1996). Las características más importantes (temperatura, pH, sustrato y morfología) de algunas especies de arqueobacterias reportadas se resumen en la Tabla 5.

Este taxón comprende microorganismos anaerobios estrictos, ya que son sensibles al oxígeno. Por lo tanto, su distribución se limita a lugares donde no existe oxígeno, tales como: sedimentos marinos y de ríos, tracto gastrointestinal humano, rumen de animales, ambientes geotermales, reactores de digestión anaerobia, etc. (Barber y Ferry; 2001). Son heterotróficos productores de metano a partir de acetato, CO<sub>2</sub> usando H<sub>2</sub> como aceptor de electrones y compuestos metilados o alcoholes. Su pared está constituida por pseudomureina y lípidos de membrana (isoprenoides) unidos por enlaces éter a un glicerol (García *et al.*, 2000). Poseen una serie de coenzimas particulares que intervienen en su metabolismo: metanofurano, tetrahidrometanopterina, deazaflavina F<sub>420</sub>, Coenzima M y HS-coenzima M (Rasche y Ferry, 2005).

Tabla 5. Características de las arqueobacterias metanógenas (Burak y Sherer, 2008).

ESPECIES	MORFOLOGÍA	SUBSTRATO	T (°C) ÓPTIMA	pH ÓPTIMO

<i>Methanobacterium bryantii</i>	Bacilos largos a filamentos	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	37	6.9-7.2
<i>Methanobacterium formicicum</i>	Bacilos largos a filamentos	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	37-45	6.6-7.8
<i>Methanobacterium thermoalcaliphilum</i>	Bacilos	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	58-62	8.0-8.5
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicum</i>	Bacilos largos a filamentos	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	65-70	7.0-8.0
<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	Bacilos	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	55-65	7.0-7.5
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Bacilos cortos, cadenas cortas	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	37-39	/
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	Bacilos cortos, cadenas cortas	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	37-39	/
<i>Methanothermus fervidus</i>	Bacilos cortos	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	83	<7.0
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	Cocos regulares a irregulares	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	65	/
<i>Methanococcus voltaei</i>	Cocos regulares a irregulares	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	35-40	6.0-7.0
<i>Methanococcus vannielii</i>	Cocos regulares a irregulares	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	65	7.0-9.0
<i>Methanomicrobium mobile</i>	Bacilos cortos	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	40	6.1-6.9
<i>Methanolacinia paynteri</i>	Bacilos cortos	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	40	7
<i>Methanospirillum hungatei</i>	Bacilos curvados a filamentos espirales	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formato	30-40	/
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	Cocos irregulares	Metanol, acetato	35-40	6.5
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Cocos irregulares en paquetes	Metanol, acetato	35-40	5.0-7.0
<i>Methanosarcina mazei</i>	Cocos irregulares en paquetes	Metanol, acetato	30-40	6.0-7.0
<i>Methanosarcina thermophila</i>	Cocos irregulares en agregados	Metanol, acetato	50	6.0-7.0
<i>Methanococcoides methylutens</i>	Cocos irregulares	Metanol	42	7.0-7.5
<i>Methanosaeta concilii</i>	Bacilos	Acetato	35-40	7.0-7.5
<i>Methanosaeta thermophila</i>	Bacilos	Acetato	55-60	7

#### 1.4.1 Taxonomía.

Las arqueobacterias metanógenas son un taxón complejo debido a su actividad bioquímica para la síntesis de metano y diversidad de morfología de las especies. El descubrimiento de las propiedades bioquímicas y genéticas exclusivas de estos organismos conllevó a Woese y colaboradores hacia el concepto de *Archaeobacteria* (1978), que posteriormente, se formalizó como Dominio *Archaea* en 1990 (citado en García *et al.*, 2000). Con la incursión de las técnicas moleculares, se propuso una clasificación fundamentada en el análisis de las secuencias del ADNr 16S (García *et al.*, 2000).

En 1988, el Subcomité para la Taxonomía de Metanógenas (*Subcommittee for Taxonomy of Methanogens*) aceptó una serie de parámetros mínimos que definen el grupo de las arqueobacterias metanógenas. Esos parámetros incluyen: cultivos puros, morfología, microscopía electrónica, susceptibilidad a lisis, movilidad, morfología de la colonia, sustrato, huella genética, productos finales de su metabolismo, rangos y condiciones de crecimiento, contenido G+C en ADN, análisis de lípidos, hibridación de ácidos nucleicos y análisis de ADNr 16S. Basado en esos criterios, Boone y Garrity (2001) definieron 5 órdenes, 10 familias y 26 géneros (Tabla 6) (García, 2000; Rasche y Ferry, 2005).

Tabla 6. Clasificación taxonómica de las arqueobacterias metanógenas (Boone y Garrity, 2001).

Dominio	Reino	Clase	Orden	Familia	Género	
Archaea	Euriarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanosphaera</i> , <i>Methanothermobacter</i> , <i>Methanobrevibacter</i>	
				Methanothermaceae	<i>Methanothermus</i>	
		Methanococci	Methanococcales	Methanococcaceae	<i>Methanococcus</i>	
					<i>Methanothermococcus</i>	
				Methanocaldococcaceae	<i>Methanocaldococcus</i>	
				Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanomicrobium</i>
					Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>
				Methanosarcinales	Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>
		Methanosarcinaceae	<i>Methanosarcina</i>			
		Methanopyri	Methanopyrales	Methanosaetaceae	<i>Methanosaeta</i>	
				Methanopyraceae	<i>Methanopyrus</i>	

### 1.5 Digestión anaerobia termófila.

La digestión anaerobia termófila se desarrolla en un intervalo de 40-60°C en sistemas artificiales de tratamiento de aguas o lodos residuales (Angelidaki *et al.*, 2003). A escala industrial, bajo este parámetro, se puede hacer uso de digestores más eficientes con volúmenes pequeños de operación y altos rangos de carga. Las características de la digestión anaerobia termófila se resumen en la Tabla 7 (Kim *et al.* 2002; Angelidaki *et al.*, 2003; Cabirol *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; De la Rubia *et al.*, 2005). En México no existen reactores termófilos, por tal razón, el arranque de un reactor de este tipo sería extremadamente inestable y prolongado, debido a que no se dispone de inóculo termófilo. En el caso de que se use inóculo mesófilo para este tipo de proceso, el periodo de aclimatación de mesofilia a termofilia puede ser largo (de un año o más) (Van Lier, 1996; De la Rubia *et al.*, 2005).

Tabla 7. Resumen de las ventajas y desventajas de la digestión anaerobia termófila.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
- Las tasas de las reacciones bioquímicas son más rápidas y los tiempos de retención hidráulica son cortos	- Arranques de digestor prolongados por la falta de lodo adecuado.
- Volúmenes de los reactores son pequeños para el tratamiento de una misma cantidad de lodo en mesofilia.	- Pérdida de granulación por pérdida del género <i>Methanosaeta</i> .
- Mayor producción de metano	- Grupos de metanógenas son inestables.
- Mayor eficiencia para destruir a los patógenos y parásitos, disminución de vectores y putrefacción. - Producción de lodo clase A y B	- Alta concentración de AGV's que provocan inestabilidad

### 1.6 Efecto de la temperatura sobre la comunidad arqueobacteriana en un sistema de tratamiento artificial.

El factor temperatura afecta procesos claves termodinámicos del sistema, debido a que las tasas de las reacciones bioquímicas y actividad de los complejos enzimáticos son

específicas para cada grupo de microorganismos que interactúan en la digestión anaerobia (Zebranska *et al.*, 2000; De la Rubia *et al.*, 2005).

Por una parte, se ha reportado que las bacterias hidrolíticas y fermentadoras exhiben un intervalo amplio de temperatura de 55 a 75°C para realizar su actividad metabólica (Nielsen *et al.*, 2004). Para las metanógenas hidrogenófilas es ligeramente menor (55-70°C) (Amend y Shock, 2001) y muchas metanógenas acetoclásticas tienen intervalos de crecimiento más restringidos, de 50-65°C (Ahring *et al.*, 2001; Moen *et al.*, 2003; De Bok *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004).

Uno de los trabajos pioneros realizados con digestión anaerobia termófila comenzó con Rimkus y colaboradores (1982), quienes aumentaron la temperatura de funcionamiento en un digestor a escala piloto de 35°C a 52 y 55°C. Reportaron que el tiempo de retención hidráulica disminuyó de 14 a 7 días, alta remoción de SSV y alta producción de metano que se empleó para mantener la temperatura del reactor. Más tarde, De la Rubia y colaboradores (2005) confirmaron la transición efectiva de mesofilia a termofilia en un digestor de lodo municipal siguiendo el método de Rimkus y colaboradores (1982). En un trabajo más reciente, se observó que es factible obtener inóculos termófilos a partir de mesófilos en un lapso de 2 meses con un aumento directo de temperatura. Se reportó que la actividad de las arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas tendió a predominar bajo estas condiciones (Cabirol *et al.*, 2003).

Con respecto a la comunidad arqueobacterias, se ha observado que en termofilia la riqueza de las especies disminuye (Van Lier, 1996; Konopka *et al.*, 1999). Visser y colaboradores (1991) encontraron un incremento significativo en la abundancia relativa de algunas especies de metanógenas mesófilas (38°C) después de someterlas 4 meses a 55°C. En tal experimento, reportaron que el número de *Methanobrevibacter smithii*, *Methanospirillum hungatii* y *Methanosarcina thermophila* disminuyó, mientras que *Methanosaeta concilii*, y particularmente *Methanobacterium thermoautotrophicum*, aumentó a altas temperaturas. De estos resultados, sugirieron que las dos últimas especies se encontraban dentro de la comunidad original en números bajos hasta que se establecieron las condiciones favorables para su crecimiento óptimo.

Sekiguchi y colaboradores (1998) compararon la composición microbiana de un lodo granular mesófilo (35°C) y termófilo (55°C) de un reactor a escala de laboratorio alimentado con sacarosa, propionato y acetato. Encontraron que en condiciones mesófilas la población de *Methanosaeta concilii* predominando en el consorcio, mientras que en el reactor termófilo predominaron las especies de *Methanosaeta thermophila* y *Methanobacterium thermoformicicum*.

Ahring y colaboradores (2001) estudiaron el efecto del aumento de temperatura de 55 a 65°C en un reactor anaerobio que trató estiércol bovino. Observaron que a 65°C disminuyó la actividad metanógena y aumentó la concentración de AGV's (entre los cuales el propionato fue el más abundante). Estos investigadores observaron que a 65°C, la cantidad de ADNr 16S del dominio Bacteria disminuyó de 74 a 57%, mientras que, la cantidad de ADNr 16S del dominio Archaea se incrementó de 18 a 34%. Nielsen y colaboradores (2004), estudiaron con electroforesis de gradiente de temperatura temporal (TGGE, por sus siglas en inglés) el ADNr 16S en la comunidad de dos reactores de desecho de ganado bovino, uno a 55°C y otro con doble fase 55/68°C, cuyo resultado fue similar al encontrado por Ahring y colaboradores (2001).

Wu y colaboradores (2001) estudiaron la diversidad en un sistema de lodo granular mesófilo alimentado con tereftalato. De la investigación definieron Unidad Taxonómica Operativa (UTO) como clonas de una unidad con posición única en la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés). Obtuvieron 5 UTO's de arqueobacterias, de las cuales, la mayoría de las clonas estaban relacionadas con *Methanosaeta concilii* (81.7%), mientras que otras clonas representaron dos UTO's asociadas a *Methanospirillum* y *Methanogenium*

Angeant y colaboradores (2002) investigaron el efecto de la temperatura sobre la diversidad en un reactor de tratamiento de desechos de granja durante tres meses de aclimatación de un lodo, el cual, se alimentó con amonio y AGV's. Con base en el estudio del ADNr 16S, la abundancia de *Methanosarcina* disminuyó de 3.8 a 1.2% y *Methanosaeta concilii* se mantuvo por debajo de 2.2%. Los niveles de las metanógenas hidrogenófilas del orden Methanomicrobiales, por el contrario, aumentaron de 2.3 a 7%.

Recientemente, Tatsuzawa y colaboradores (2006) investigaron con PCR cuantitativo el efecto de la termofilia sobre un consorcio microbiano anaerobio de lodo residual proveniente de la industria papelera. Observaron que al arranque del reactor las metanógenas *Methanoculleus* (hidrogenófila) y *Methanosarcina* (acetoclástica) disminuyeron más rápido que especies de la familia Methanobacteriaceae.

## **1.7 Legislación para el uso y disposición de los biosólidos.**

Como se mencionó anteriormente, los lodos residuales están constituidos por un concentrado de contaminantes producto del tratamiento de agua. Para que estos lodos puedan ser depositados o usados es necesario estabilizarlos con alguno de los métodos ya descritos hasta disminuir su contenido orgánico y microorganismos patógenos y parásitos. Conforme a la NOM-004-SEMARNAT-2002, el lodo tratado y estabilizado se llama biosólido.

En México, la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT, en referencia al apartado 503 de la *Environmental Protection Agency* (EPA, 1996), publicó la NOM-004-SEMARNAT-2002 que establece las especificaciones y límites máximos de contaminantes permisibles en los biosólidos para su posterior reutilización y disposición final en nuestro país (Tabla 8).

De la misma forma, dicha norma establece que los biosólidos pueden ser aplicados como fertilizantes de cultivo agrícola o cualquier vegetación, así como depositados finalmente en sitios de relleno sanitario. Adicionalmente, dependiendo del tipo de cultivo o exposición pública, la norma restringe el uso como fertilizante de los biosólidos de clase B y C debido a su alto contenido de organismos patógenos y parásitos que resulta un alto riesgo para la salud. Por otro lado, establece el tiempo permitido para la cosecha o acceso público, que varía desde treinta días a dos años después de la aplicación de los biosólidos.



Tabla 8. Límites permitidos de microorganismos patógenos y parásitos en los biosólidos A, B y C en la NOM-004-SEMARNAT-2002.

CLASE	PATÓGENOS		PARÁSITOS
	Coliformes fecales NMP/g en base seca	<i>Salmonella</i> spp. NMP/g en base seca	Huevos de helmintos /g en base seca
A	Menos de 1,000	Menor de 3	Menor de 1(a)
B	Menor de 1,000	Menor de 3	Menor de 10
C	Menor de 2,000,000	Menor de 300	Menor de 35

(a) Huevos de Helmintos viables

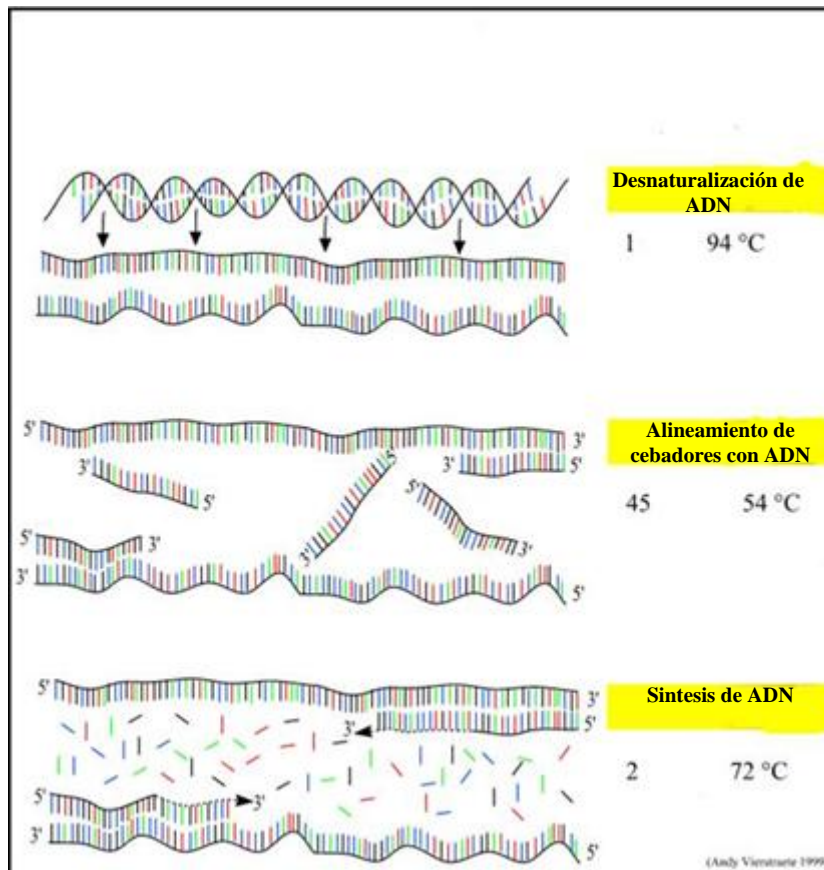
### 1.8 Introducción de técnicas moleculares para el estudio de las comunidades arqueobacterianas en los digestores anaerobios.

Las técnicas moleculares han comenzado a aplicarse recientemente a la ecología microbiana de muestras ambientales y han hecho posible el estudio de los organismos no cultivables con el propósito de identificar sus cambios espaciales y temporales dentro de la comunidad microbiana total (O'Flaherty *et al.*, 2006). Estudiar la diversidad microbiana, no sólo como investigación científica básica, permitirá comprender la dinámica de los microorganismos dentro de un sistema con el objeto de diseñar y manejar adecuadamente las plantas de tratamiento (Kirk *et al.*, 2004).

De entre todas las moléculas celulares, los ácidos nucleicos han demostrado ser las moléculas más útiles, pues han contribuido con una nueva perspectiva al entendimiento de la estructura de las comunidades microbianas. Con la extracción del ADN microbiano total de la comunidad y el estudio del ADNr 16S, principalmente, se ha contribuido al entendimiento y caracterización de la estructura y dinámica de las comunidades microbianas. El hecho de que el ADN de una comunidad microbiana es una mezcla en distinta proporción de genomas de las diferentes especies presentes, nos ha permitido estimar cuantitativamente y cualitativamente la abundancia de las poblaciones de arqueobacterias y bacterias en los lodos (O'Flaherty *et al.*, 2006).

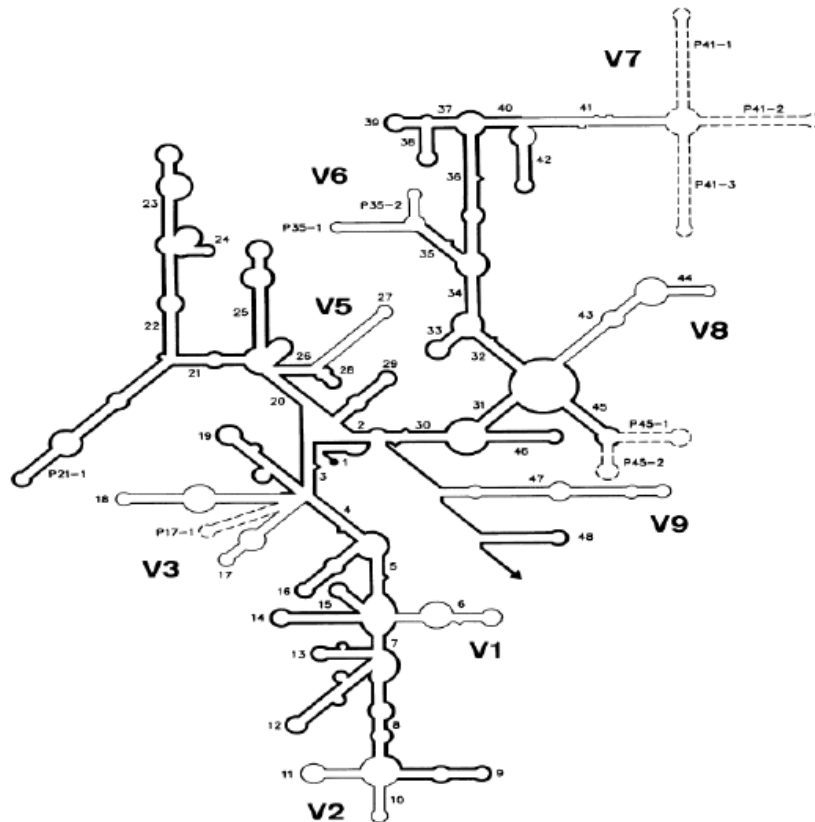
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una tecnología usada para la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN. La reacción se basa en la hibridación y extensión de un par de oligonucleótidos, sintetizados artificialmente, utilizados como iniciadores o cebadores (*primers*) que delimitan una secuencia de ADN de doble cadena a amplificar (Sambroock y Russell, 2001). Un ciclo de PCR comprende tres etapas: desnaturalización de la doble cadena (92-95°C), alineamiento de una pequeña secuencia de ADN (cebador) a la hebra simple (35-60°C) y síntesis del ADN a partir del *primer* (72°C) (Figura 4). Una DNA polimerasa realiza la replicación a partir de cada extremo 3' de los cebadores. Este ciclo es repetido durante algunas decenas de veces y, como el producto de cada polimerización sirve de molde para el siguiente, cada ciclo duplica la cantidad de producto del anterior (Sambroock y Russell, 2001). El resultado de la reacción es un fragmento de ADN de doble cadena, cuyos extremos corresponden a los extremos 5' de los cebadores y su tamaño a la distancia entre los mismos (Echenique *et al.*, 2004).

Figura 4. Esquema de las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.



El ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) es utilizado para estudios de información filogenética y taxonómica, debido a que codifica una estructura altamente conservada (ARNr 16S) (Rodicio y Mendoza, 2004). El ADNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 pb, caracterizado por ser una molécula muy antigua, cuya estructura y función presenta regiones hipervariables o secuencia huella, flanqueada por regiones moderadamente conservadas, las cuales permiten la identificación de especies microbianas (Van de Peer *et al.*, 1996). Las regiones hipervariables son 9 (Figura 5): 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 y 1435-1465. La numeración se basa en el sistema de nomenclatura de *E. coli* (Brosius *et al.*, 1978). El ADNr 16S es una diana universal para la identificación de microorganismos debido a que es una molécula muy conservada presente en todas las bacterias y arqueobacterias actuales, tiene un tamaño relativamente largo que minimiza las fluctuaciones estadísticas, conserva la estructura secundaria que puede servir de ayuda en las comparaciones, resulta fácil la secuenciación de dichas moléculas y existen bases de datos amplias en constante crecimiento (Rodicio y Mendoza, 2004). Sin embargo, la polimerasa puede presentar errores en el momento de la amplificación del ADNr 16S lo cual no reflejaría la real identidad del organismo, la base de datos puede presentar una limitante debido a un inadecuado procesamiento en la base de datos.

Figura 5. Estructura secundaria del gen ADNr 16S; regiones hipervariables (V1-V9) y conservadas (Neefs *et al.*, 1990).



Existen diversas técnicas moleculares para los estudios de biodiversidad en muestras ambientales que se han utilizado para generar lo que comúnmente conocemos como *DNA fingerprinting* o huella digital de ADN. Tradicionalmente estos términos se referían a los patrones característicos de un individuo, pero el término se ha utilizado también de manera reciente para la caracterización electroforética y cromatográfica de proteínas y más recientemente de moléculas de ADN (Eguiarte *et al.*, 2007). Entre las técnicas más usadas se encuentran el RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y TGGE.

La técnica RFLP se fundamenta en el corte de fragmentos de ADN amplificados con PCR usando endonucleasas de restricción, para luego separar la mezcla por electroforesis en gel. Las variaciones en el número y tamaño de los fragmentos detectados son el reflejo de las variaciones en el tamaño de ADN (Arango-Restrepo *et al.*, 2005). La principal ventaja de la PCR-RFLP radica en la rapidez y simplicidad de la técnica, que permite la obtención de resultados en una sola jornada, y la reproducibilidad de los patrones de restricción. Una limitante de esta técnica es la elevada cantidad de ADN necesaria y los bajos niveles de polimorfismo detectado en algunas especies.

El ARDRA es una técnica similar a RFLP, pero que consiste en amplificar por PCR sólo el gen de ADNr 16S de la comunidad total, aislar una a una las diferentes copias

que se encuentran en la mezcla y posteriormente digerir enzimáticamente (restricción) cada una de las copias obtenidas, aunque también puede digerirse la muestra total (Martin-Laurent *et al.*, 2001). Si el ARDRA se hace con copias separadas del gen ADN<sub>r</sub> 16S, el análisis de los diferentes patrones permite hacer estimaciones de diversidad y/o elegir representantes de los patrones distintos para obtener las secuencias e identificar los grupos taxonómicos específicos a los que pertenecen o con los que se relacionan. La manera más común de separar las diferentes copias del 16S rADN (o cualquier otro gen) de la comunidad es clonando los diferentes fragmentos en cepas competentes, por lo que cada bacteria adquirirá una sola copia del gen y así quedarán separadas las diferentes copias de la mezcla total. Las bacterias que contienen los fragmentos se crecen en cajas de Petri y posteriormente se aísla su ADN junto con el gen de interés que se puede separar del ADN bacteriano. El problema es que el número de clones que se debe obtener por comunidad para determinar su diversidad y abundancia tiene un costo final similar al de la secuenciación de la comunidad (Eguiarte *et al.*, 2007).

DGGE o TGGE son tipos de electroforesis en gel de acrilamida que son usados para detectar los puntos de mutación y polimorfismo de los productos de PCR. Cada gel de electroforesis representa una descripción detallada de una comunidad microbiana en relación al ambiente estudiado. Los fragmentos de ADN son separados a través del incremento lineal del desnaturizante químico o de la temperatura del ánodo al cátodo. La ventaja de estas técnicas es que resulta posible recuperar un fragmento del gel, reamplificarlo y secuenciarlo directamente. Pudiendo así, aislar e identificar cada una de las bandas del gel. Una desventaja técnica es que la polimerasa debe tener una eficiencia alta para que los patrones sean observados en el gel. También el diseño de los cebadores es complicado debido a que uno de ellos necesita un extremo rico en GC lo que ocasiona que la temperatura de alineación de cada cebador sea muy diferente.

En principio, cada UTO representa un organismo diferente (Muyzer y Smalla, 1998). Existen algunas consideraciones importantes para estas técnicas pues sólo permite detectar las poblaciones que muestren una abundancia relativa superior al 1% (Muyzer y Smalla, 1998). Por esa razón, en el gel sólo aparecerán las UTO's correspondientes a poblaciones dominantes. De igual forma, varias UTO's pueden representar a un sólo organismo, tal fenómeno es conocido como microheterogeneidad (Duineveld *et al.*, 2001). Por otro lado aparece el fenómeno de la co-migración, por lo que una banda puede representar a más de un organismo.

Aun lado a lo anterior no es fácil comparar entre los resultados de diferentes autores, debido a la carencia de un método en común para interpretar los modelos de huella genética en los diferentes experimentos. Marzorati y colaboradores (2008) proponen que la distribución de las UTO's en un gel puede ser correlacionada con el porcentaje del gradiente de desnaturización, el cual representa la diversidad de la muestra (dentro de las limitantes de la técnica) y puede ser correlacionada con las características del ambiente analizado. De hecho, si un ambiente es muy habitable puede hospedar muchos organismos y variabilidad genética, lo que implica un gradiente de desnaturización en el gel más amplio para describir la diversidad microbiana total. Por el contrario, si el ambiente es poco habitable, sostendrá pocos microorganismos dentro de la comunidad y en consecuencia, el gradiente de desnaturización para describir el total de diversidad será más estrecho (Marzorati *et al.* 2008).

Diversos autores han demostrado que el porcentaje de GC (contenido G+C) y la

posición de estos nucleótido dentro de la molécula que se está analizando pueden ser utilizados para estudiar la diversidad de una comunidad microbiana, aun si no hay identidad directa taxonómica (Apajalahti *et al.*, 2001). De esta forma, el contenido de GC de comunidades microbianas complejas parece estar influenciado por el ambiente (Foerstner *et al.*, 2005). Estos planteamientos pueden ser expresados matemáticamente, y definirse en un índice de rango ponderado de riqueza (Rr).

Según Marzorati y colaboradores (2008), la Riqueza ponderada baja de (Rr) < 10, puede ser atribuible a ambientes particularmente adversos o restringidos, con colonización semejante a suelos contaminados o chimeneas hidrotermales. Rr entre 10-30, es asimilable a una riqueza media, mientras que un Rr>30 es típico de ambientes muy heterogéneos (con amplia capacidad de carga, definida como el número de individuos que los recursos del ecosistema puede soportar) y caracterizados por una alta diversidad.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Las características del proceso anaerobio en un reactor termófilo son similares a las presentes en uno mesófilo. Sin embargo, durante el arranque, la actividad del consorcio es menos estable (Van Lier, 1996). De acuerdo a investigaciones previas, se ha observado que las arqueobacterias metanógenas constituyen uno de los grupos fisiológicos más sensibles dentro de los consorcios anaerobios. Por ello, es un grupo microbiano limitante que puede disminuir su metabolismo en condiciones termófilas durante el periodo de arranque en termofilia (Griffin *et al.*, 1997).

En México no existen reactores termófilos de los cuales se obtenga un inóculo para el arranque de un reactor con dichas condiciones, por eso se puede tener un periodo largo (de un año ó más) de aclimatación de un lodo mesófilo a condiciones termófilas (Van Lier, 1996; de la Rubia *et al.*, 2005). Existe una amplia necesidad de aumentar los conocimientos biológicos de los ecosistemas anaerobios, dado que estudiar la diversidad microbiana nos permitirá comprender la dinámica de los microorganismos dentro de un sistema con el objeto de diseñar y manejar adecuadamente las plantas de tratamiento y permitirá avanzar en el desarrollo de la tecnología anaerobia termófila, inexistente en México (Godon *et al.*, 1997; Kirk *et al.*, 2004).

## **3. HIPÓTESIS**

Las arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas dominarán sobre las acetoclásticas en los consorcios microbianos durante el arranque de los reactores anaerobios termófilos estudiados, lo cual estará relacionado con los valores de los parámetros fisicoquímicos medidos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar durante el arranque de un reactor termófilo la actividad metabólica y diversidad de la comunidad metanógena de dos tipos de lodo anaerobio mesófilo, municipal e industrial, procedentes de reactores UASB.

### **4.2 Objetivos particulares**

- ❖ Evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad metanógena específica de dos tipos de lodo anaerobio, industrial y municipal, durante la sucesión microbiana de mesofilia a termofilia.
- ❖ Evaluar los lodos por seguimiento de los parámetros fisicoquímicos control: concentración de ácidos grasos volátiles (AGV's), valor alfa ( $\alpha$ ), pH y porcentaje de metano.
- ❖ Evaluar un método con un pretratamiento de hipertermofilia (75°C) para obtener lodo anaerobio termófilo.
- ❖ Determinar la diversidad y dinámica de la comunidad de arqueobacterias de cada lodo con la técnica PCR-TGGE de un fragmento de ADNr 16S.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación consta de dos experimentos: a) el primero evaluó el efecto de la termofilia sobre dos tipos de lodos mesófilos, uno industrial y otro municipal, procedente de reactores anaerobios UASB; b) el segundo experimento consistió en evaluar el efecto de un tratamiento de 75°C que antecede a la termofilia (55°C) sobre un lodo mesófilo procedente de un reactor UASB de Iztapalapa.

### 5.1 Primer experimento. Efecto de la termofilia sobre dos tipos de lodos mesófilos.

Se obtuvieron 4 lodos mesófilos (35°C) procedentes de diferentes reactores UASB: dos de la industria cervecera de la Cd. de México (Cervecería Modelo, nombrados M1 y M8) y dos de tratamiento municipal, Orizaba y la UAM Iztapalapa (designados como ORI y UAM respectivamente). Sus características se indican en la Tabla 9.

#### 5.1.1 Descripción de los digestores empleados en el experimento.

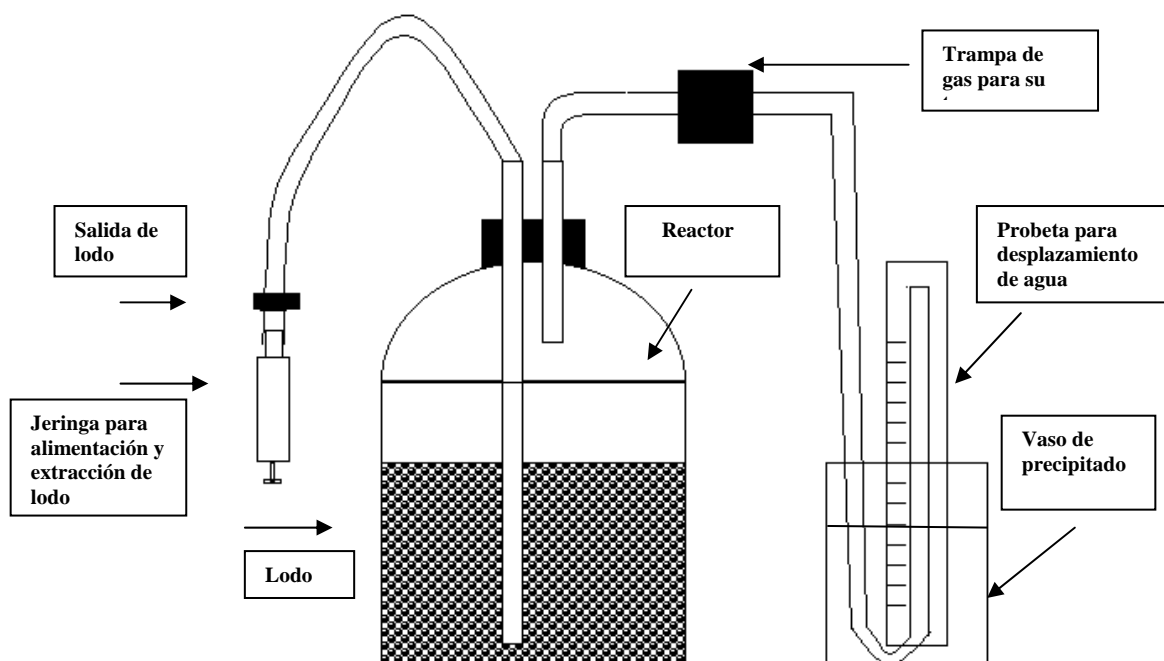
Cada digestor estuvo conformado por un frasco aspirador con capacidad de 2 l, el cual se cerró herméticamente con una tapa de hule. En la parte superior se encontraban dos tubos metálicos de diferente longitud. El tubo más largo de 30 cm (que llega hasta el fondo) estaba conectado a una manguera de tygon que se conectó a una jeringa por donde se sacó y se alimentó el lodo. El tubo de menor longitud de 15 cm. se conectó a un matraz de 200 ml, sellado herméticamente con un tapón de butyl. Este matraz, funcionó como trampa de biogás para su posterior muestreo. Para ello, el tapón se conectó tanto al digestor como a una probeta invertida colocada en un vaso de precipitados de 1000 ml, por medio de mangueras de látex. El vaso de precipitados se llenó de agua destilada, para permitir el cálculo del volumen de biogás producido por el reactor (Figura 6).

Tabla 1. Resumen de las características iniciales de los lodos mesófilos.

	INDUSTRIAL	MUNICIPAL
<b>UASB DE PROCEDENCIA</b>	<p><b>Modelo 1</b> - TRH: 10 h            - SSV: 35,000 kg/m<sup>3</sup>            - Temperatura uniforme a 35°C            - Cargas orgánicas de desecho producto de la fermentación y desgaste de la maquinaria.</p> <p><b>Modelo 8</b> - TRH: 10 h            - SSV: 35,000 kg/m<sup>3</sup>            - Temperatura uniforme a 35°C            - Cargas orgánicas de desecho producto de la fermentación y desgaste de la maquinaria.</p>	<p><b>Orizaba</b>            - Datos confidenciales</p> <p><b>UAMI</b> - TRH: 6 h            - SSV: 4.126 kg/m<sup>3</sup>            - Temperatura variable            - Cargas orgánicas de baños, cocina y desechos de laboratorio químico, clínico y biológico</p>



Figura 1. Representación esquemática del reactor utilizado en esta investigación.



### 5.1.2 Arranque y seguimiento de la dinámica de los lodos mesófilos a termofilia.

Se colocaron 1000 ml de lodo mesófilo, 200 ml de medio general (Anexo 1) y 1 ml de una solución concentrada de AGV's (ácidos acético 0.6 mg/ml, propiónico 0.48 mg/ml y butírico 0.4 mg/ml) en cada reactor (4 reactores en total). Posteriormente, por medio de una rampa de gases, se cambió la atmósfera interna del lodo con el burbujeo de la mezcla  $N_2-CO_2$  (80-20%) y se cerró el digestor herméticamente para mantener la anaerobiosis. La probeta invertida se llenó con agua y se colocó en el vaso de precipitados que también se llenó de agua al máximo nivel. Se mantuvieron los reactores a 55°C, durante 9 meses.

Cada tercer día se alimentaron con 1 ml de la solución concentrada de AGV's, se midió el %  $CH_4$  y el volumen de biogás. Cada 15 días se midió el coeficiente alfa ( $\alpha$ ). Para los tiempos 0.5, 1, 2, 3.5, 5.5, 6 y 9 meses: se midió la AME hidrogenófila y acetoclástica, los SSV, concentración de AGV's y se tomaron 2 ml para las pruebas de biología molecular que se almacenaron a -80 °C (Tabla 10).

Tabla 2. Resumen de la frecuencia de medición de cada parámetro estudiado

TIPO DE PARAMETRO	PARAMETROS	INTERVALO DE MEDICIÓN
FISICOQUÍMICO	Temperatura	constante
	Volumen y porcentaje de CH <sub>4</sub>	Cada tercer día
	Valor $\alpha$	Cada 0.5 meses
	SSV	0.5, 1, 2, 3.5, 5.5, 6 y 9 meses
AME		
AGV'S		
MOLECULAR	PCR y TGGE	

## 5.2 Segundo experimento. Efecto de la hipertermofilia (75°C) como pretratamiento en el arranque a termofilia de un lodo mesófilo.

Se incubaron a 55 y 75°C cuatro lotes o tratamientos de 15 botellas serológicas con capacidad de 150 ml cada uno, a las cuales se le agregaron 10 ml de medio mineral y 50 ml de lodo anaerobio procedente de un reactor UASB de la UAM Iztapalapa. Se cerraron herméticamente y se les cambio la atmósfera a todos los reactores con la mezcla N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80-20%).

Los tratamientos se nombraron de la manera siguiente: Control, A, B y C. El tratamiento Control fue incubado a 55°C desde el tiempo 0. A los tratamientos A, B y C se les aumentó la temperatura a 75°C en baño María. Al cumplir el primer mes, al tratamiento A se le cambió la temperatura a 55°C. Para el tiempo 2.5 meses, al tratamiento B se le cambió la temperatura a 55°C; y a los 4 meses, el tratamiento C fue incubado también a 55°C (Figura 7).

Para calcular la AME de las arqueobacterias hidrogenófilas y acetoclásticas, se sacrificaron 3 botellas de cada lote para obtener lodo siguiendo la metodología descrita en el Anexo 2.

Para cada lodo de los tratamientos: se determinó cada tercer día el porcentaje de CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub> (%) y el volumen de biogás (ml). Cada 15 días se midió el coeficiente alfa ( $\alpha$ ). Para los tiempos 0, 1, 2.5 y 4 meses con sacrificio de tres frascos, se midieron los SSV, concentración de AGV's y la AME hidrogenófila y acetoclástica a 55°C, mientras que para el tiempo 0, la AME también fue evaluada a 35°C. Se tomaron 2 ml para las pruebas de biología molecular que se conservaron a -80°C (Tabla 11).

Figura 2. Esquema que representa los tiempos a los que se sometieron los 4 tratamientos a las dos temperaturas 55 y 75°C. Flechas rojas: tiempo en que el lote se sometió a 75 °C. Flecha negras: tiempo en que el lote se sometió a 55°C.

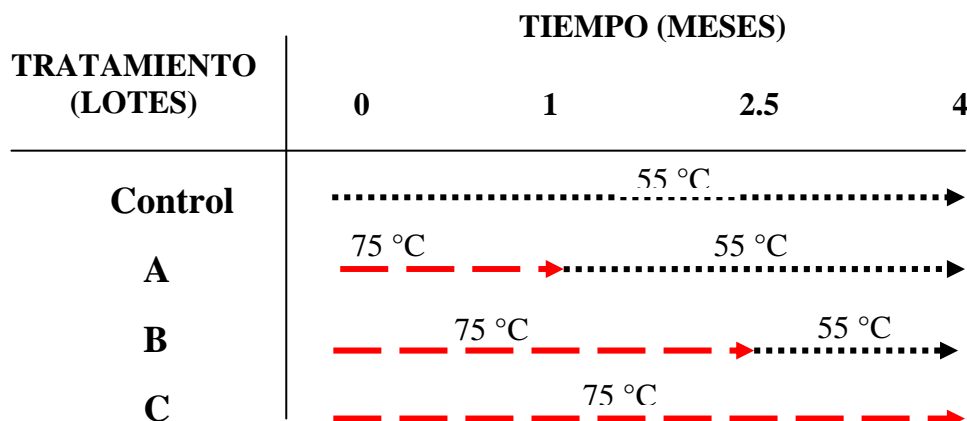


Tabla 3. Resumen de la frecuencia de medición de cada parámetro estudiado

TIPO DE PARAMETRO	PARAMETROS	INTERVALO DE MEDICIÓN
FISICOQUÍMICO	Temperatura	constante
	Volumen y porcentaje de CH <sub>4</sub>	Cada tercer día
	Valor α	Cada 0.5 meses
	SSV	0, 1, 2.5, 5 meses
AME		
AGV'S		
MOLECULAR	PCR y TGGE	

### 5.3 Métodos analíticos.

#### 5.3.1 Parámetros físicos y bioquímicos.

Se midió el porcentaje de CH<sub>4</sub> (% CH<sub>4</sub>) muestreando 0.5 ml de biogás de cada reactor con una jeringa *pressure lock* Becton-Dickinson (1 ml) e inyectándolo en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (TCD) (Fisher Gas Partitioner, modelo 1700), de doble columna (Porapak Q y malla, molécula 5A) utilizando helio como gas acarreador, con un flujo de 25 ml/min.

El volumen de biogás se calculó al medir el desplazamiento de un volumen de agua en la probeta invertida.

La determinación del valor alfa consistió en titular cada lodo con ácido sulfúrico (0.2N) a pH 5.75 y 4.3 para hacer una relación entre el ácido consumido total y el parcial (APHA, 1995).

Se midió la AME hidrogenófila y acetoclástica, los sólidos suspendidos volátiles y se recolectaron en tubos Eppendorf 1 ml de lodo para medir la concentración de AGV's (que se conservaron en un refrigerador a 4°C) y 2 ml para las pruebas de biología molecular que se conservaron en un congelador a -80°C.

La AME hidrogenófila y acetoclástica (APHA *methods standards*, 1995) se midió por triplicado en botellas serológicas de 60 ml. A cada una se le agregó 16 ml de medio general (Anexo 1), 4 ml de lodo y sustrato (ácido acético o hidrógeno a una presión de 15 psi durante 30 segundos). Se utilizó el cromatógrafo de gases Fisher modelo 1700 para medir la concentración de metano. El método se describe en el Anexo 2.

Para calcular la concentración de AGV'S (APHA, 1995), en tubos se prepararon 1 ml de lodo de cada tiempo y se le agregó una gota de HCL (v/v; 1:1), que posteriormente se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 minutos. Se filtró el sobrenadante y se colocó en un vial de 1 ml. Para determinar la concentración de AGV's se inyectaron 0.3 µl de cada muestra en un cromatografía de gases SRI8610S con detector de ionización de flama. Para calibrar el cromatógrafo se utilizó una solución estándar de AGV's (ácidos acético 687.4 mg/l, propiónico 196.6 mg/l, y butírico 190.9 mg/l).

### **5.3.2 Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los datos de la AME hidrogenófila y acetoclástica se realizó con el programa SPSS 7.0, utilizando la estadística descriptiva (media y varianza), así como las pruebas de Kolmogorov- Smirnov ( $K-S_{\alpha=0.05}$ ) para normalidad de datos y la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene $_{\alpha=0.05}$ . De acuerdo al diseño experimental, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA  $_{\alpha=0.05}$ ) de 4 vías para el primer experimento y de 3 vías para el segundo. Posteriormente, se aplicó una prueba de comparación múltiple de Tuckey-Kramer con un intervalo de 95% de confiabilidad y se realizaron gráficas para comparar la AME de los reactores.

### **5.3.3 Análisis molecular: huella genética.**

Se tomó 1 ml de muestra, empleándose el método modificado de extracción de ADN de lodo reportado por Cabirol y colaboradores (2002), el cual se detalla en el Anexo 3. Se realizó la amplificación (PCR) de fragmentos de la región hipervariable V3 del ADNr 16S de *Archaea* (aprox. 140 pb) con los cebadores Parchf-gc y Parchr (Tabla 12). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 94°C-1 min, 1 ciclo de 80°C-1 min, 35 ciclos de 94°C-1 min, 35 ciclos de 58°C-1.5 min, 35 ciclos de 72°C de 30 seg y 1 ciclo de 72°C de 1 min. Los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% revelado con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Para calcular el tamaño del fragmento se usó un marcador Ladder Express de 100 pb. (Promega).

El TGGE fue realizado en el equipo *Dcode Universal Mutation Detection System* (Biorad). Se preparó un gel de polibis-acrilamida al 10%, TAE 1.25X, 20 µl de ADN amplificado y urea 8M. La electroforesis se realizó a 130 volts durante 5:30 hrs, con un

gradiente de temperatura de 56.5 a 66°C y una velocidad de 1.7°C/h. El gel fue teñido con SYBR-Gold y fotografiado en un fotodocumentador Gel-Doc (Biorad).

Se cortaron las bandas del gel de poliacrilamida y se resuspendieron en H<sub>2</sub>O bidestilada para la posterior amplificación del ADN con los cebadores Parch sin grapa bajo las condiciones mencionadas anteriormente (Tabla 12). Posteriormente, se purificaron con el kit *Wizard SV Gel and PCR Cleanup System* (Promega) y se secuenciaron en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Las secuencias se compararon mediante el programa BLAST con la base de datos de la página NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Posteriormente, las secuencias de interés contenidas en la biblioteca de NCBI fueron alineadas mediante el programa CLUSTAL\_W, disponible en el programa informático de BIOEDIT. La matriz de distancias fue construida con el algoritmo de *Neighbor-Joining* y el método de Jukes-Cantor (Bootstrapping, 1000 replicas) usando el programa PHYLIP 3.67, y el programa TREEVIEW para la obtención del árbol filogenético. El gen ADNr 16S de *Pseudomonas syringae* fue seleccionado como grupo externo.

Tabla 4. Secuencias y posición en *E. coli* de los cebadores usados (Nielsen *et al.*, 2004).

REGION BLANCO	CEBADOR	SECUENCIA	POSICION EN <i>E. coli</i>
<b>Archaea ADNr 16S</b>	Parchf-gc	CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGG GGCGGGGGCACGGGGGGC CCTACGGGGYGCASCAG	340-357
	Parchf	CCCTACGGGG(C/T)GCA(G/C)CAG	340-357
	Parchr	TTACCGCGGC(G/T)GCTG	519-533

### 5.3.3.1 Análisis de Riqueza ponderada (R<sub>r</sub>).

El análisis de las fotografías de los geles de poliacrilamida se procesó en el programa *Quantity ONE* del fotodocumentador Gel Doc 2000 System (Biorad), lo que sirvió para delimitar las UTO's. Posteriormente se digitalizó el patrón de bandas del gel de TGGE para calcular el índice matemático de Rango de Riqueza-ponderada (R<sub>r</sub>), indicador del estado de la diversidad microbiana (Marzorati *et al.*, 2008), el cual está dado por la siguiente fórmula:

$$R_r = n^2(t_g/100 \text{ } ^\circ\text{C})$$

N= número de UTO's

t<sub>g</sub>= Gradiente de temperatura del perfil que comprende la primera y última UTO

100 es el número máximo teórico de desnaturalización

### 5.3.3.2 Dinámica de la comunidad (D<sub>y</sub>).

Con el programa *Quantity ONE*, se construyó una matriz de similitud con los patrones de las UTO's de cada carril para calcular el coeficiente de correlación de Pearson y

realizar el análisis de “ventana corrediza” (*Moving-Window Analysis*, MWA). El método MWA consiste en analizar la evolución de las UTO's de los perfiles en dos tiempos consecutivos, de tal forma que se evalúo la estabilidad de una comunidad. La tasa de cambio porcentual  $\Delta_t$  fue calculada de los valores del análisis de MWA, sustraídos de los valores de similitud 100%. Cuanto más altos los valores de similitud de los patrones de TGGE de un tiempo con respecto al anterior, más bajos son los valores de  $\Delta_t$  (Wittebolle *et al.*, 2005).

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Primer experimento. Efecto de la termofilia sobre dos tipos de lodos anaerobios mesófilos.

#### 6.1.1 Seguimiento bioquímico durante la adecuación a termofilia.

Los resultados obtenidos de la AME, tanto con acetato como con hidrógeno, en los lodos originales a 35°C (tiempo cero) y los determinados a diferentes tiempos durante los nueve meses bajo condiciones de termofilia (55°C) se presentan en la Tabla 13.

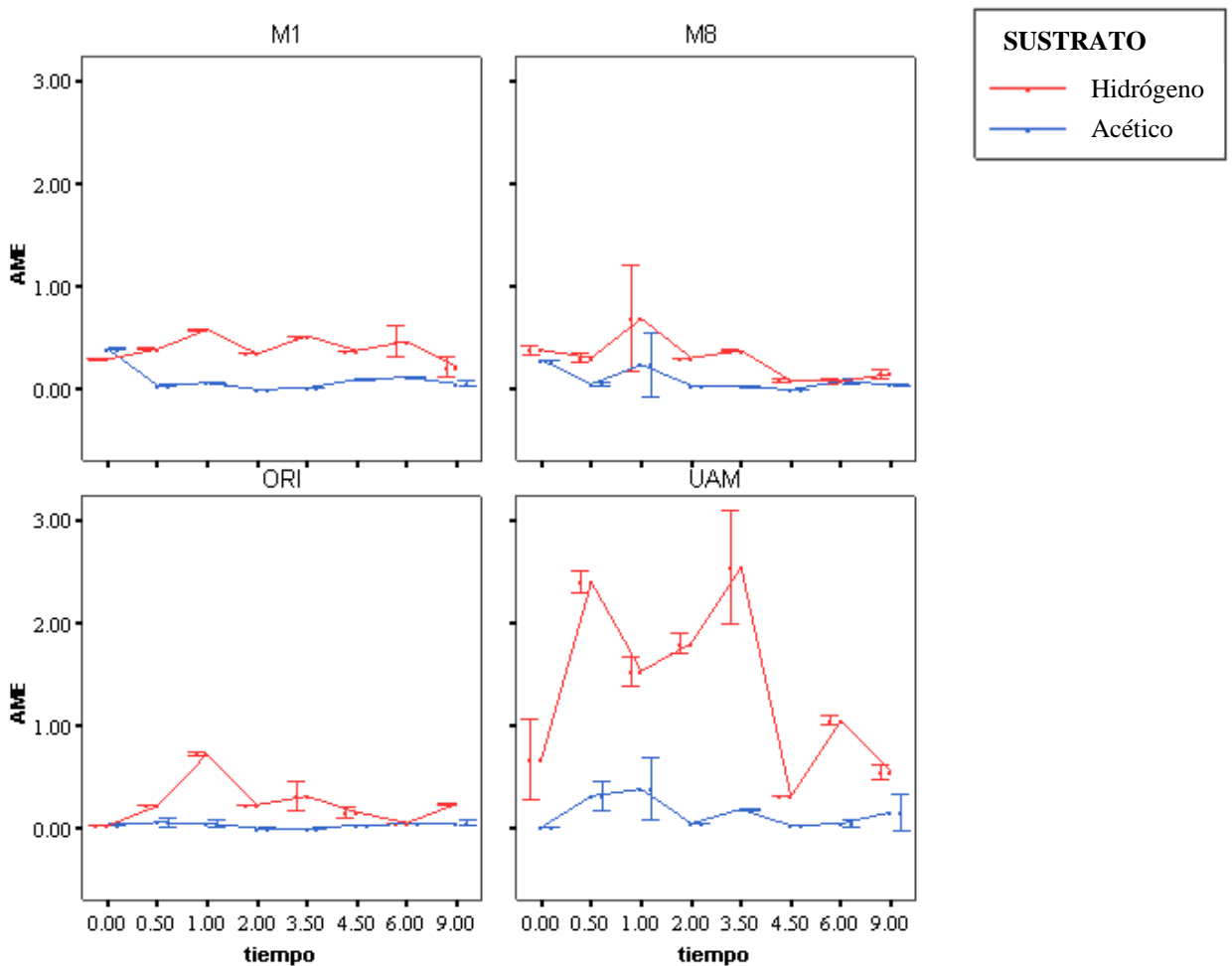
Tabla 1. Media ( $\bar{X}$ ) y varianza ( $S^2$ ) de la AME hidrogenófila ( $H_2$ ) y acetoclástica ( $CH_3COOH$ ) de los reactores en mesofilia (0-35°C) y termofilia (55°C) durante 9 meses.

Condición	Tiempo (mes)	AME (gCH <sub>4</sub> -DQO/gSSV/día) DE LODO INDUSTRIAL							
		M1				M8			
		H <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub> COOH		H <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub> COOH	
		$\bar{X}$	S <sup>2</sup>	$\bar{X}$	S <sup>2</sup>	$\bar{X}$	S <sup>2</sup>	$\bar{X}$	S <sup>2</sup>
Mesofilia 35°C	0	0.49	0.001	0.64	0.007	0.33	0.05	0.51	0.4
Termofilia 55°C	0	0.29	0.007	0.4	0.006	0.39	0.042	0.29	0.000
	0.5	0.39	0.007	0.04	0.015	0.31	0.046	0.05	0.016
	1	0.58	0.010	0.07	0.007	0.69	0.513	0.24	0.029
	2	0.35	0.000	0.001	0.001	0.31	0.000	0.04	0.001
	3.5	0.52	0.000	0.02	0.000	0.38	0.006	0.03	0.001
	4.5	0.38	0.000	0.1	0.010	0.09	0.012	0.0001	0.000
	6	0.47	0.147	0.12	0.010	0.08	0.020	0.08	0.020
	9	0.22	0.092	0.06	0.030	0.15	0.048	0.05	0.005
AME (gCH <sub>4</sub> -DQO/gSSV/día) DE LODO MUNICIPAL									
	Tiempo (mes)	AME (gCH <sub>4</sub> -DQO/gSSV/día) DE LODO MUNICIPAL							
		ORI				UAM			
		H <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub> COOH		H <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub> COOH	
		$\bar{X}$	S <sup>2</sup>	$\bar{X}$	S <sup>2</sup>	$\bar{X}$	S <sup>2</sup>	$\bar{X}$	S <sup>2</sup>
35°C	0	0.02	0.002	0.03	0.003	0.1	0.001	0.15	0.002
55°C	0	0.03	0.001	0.04	0.001	0.68	0.389	0.02	0.001
	0.5	0.22	0.000	0.06	0.043	2.4	0.100	0.32	0.147
	1	0.73	0.010	0.05	0.034	1.54	1.260	0.39	0.303
	2	0.24	0.000	0.01	0.001	1.8	0.100	0.05	0.006
	3.5	0.32	0.137	0.004	0.001	2.55	0.552	0.19	0.010
	4.5	0.16	0.056	0.04	0.006	0.31	0.000	0.03	0.000
	6	0.06	0.000	0.05	0.000	1.05	0.041	0.05	0.028
	9	0.24	0.010	0.05	0.026	0.56	0.069	0.16	0.176

Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba de ANOVA<sub>α=0.05</sub> de 4 vías (Anexo 5). Se encontró que el factor origen del lodo no es estadísticamente significativo

( $p=0.21$ ), es decir, la actividad metabólica de las arqueobacterias es similar en los cuatro reactores, no importa el tipo de tratamiento de los lodos. Por otra parte, el parámetro sustrato es importante en la actividad de los consorcios ( $p=0.00$ ), de tal forma que la AME hidrogenófila es estadísticamente superior a la acetoclástica, tal como se observa en la Figura 8. Asimismo se determinaron diferencias significativas dentro de los reactores ( $p=0.00$ ) entre los distintos tiempos muestreados.

Figura 1. Gráficas de los reactores que comparan el comportamiento de la AME ( $\text{gCH}_4\text{-DQO/gSSV/día}$ ) hidrogenófila y acetoclástica de los reactores en el transcurso del experimento. Tiempo (meses) vs AME ( $\text{gCH}_4\text{-DQO/gSSV/día}$ ).



Finalmente, se encontró que existen diferencias significativas entre los distintos reactores ( $p=0.00$ ). Por ello, se realizó la prueba de comparación múltiple (Tuckey-Kramer  $\alpha=0.05$ ) para conocer cuál es el reactor con diferente AME (Tabla 14). Se encontró que los lodos M1 y M8, como se esperaba, tienen diferencias estadísticas poco significativas ( $p=0.202$ ) debido a que proceden de un mismo tipo de tratamiento que son las aguas residuales de la industria cervecera. Por otro lado, la AME de los reactores M1 y ORI tampoco presentaron diferencias significativas ( $p=0.176$ ). Sin embargo, la AME del lodo anaerobio del reactor UAM, tuvo un comportamiento significativamente



diferente ( $p=0.00$ ) de los otros 3 reactores. En este reactor, la producción de AME para hidrógeno y acético es superior a la del resto de los reactores (Tabla 14).

Tabla 2. Resultado de la comparación múltiple de Tuckey-Kramer $_{\alpha < 0.05}$  para la AME de los diferentes reactores durante el experimento.

<b>COMPARACIÓN MÚLTIPLE</b>				
<b>Variable dependiente: AME</b>				
<b>(I) reactor</b>	<b>(J) reactor</b>	<b>Diferencia de Medias (I-J)</b>	<b>Error SD.</b>	<b>Sig.</b>
<b>M1</b>	M8	0,052	0,026	0,202
	ORI*	0,106	0,026	0,001
	UAM*	-0,506	0,026	0,000
<b>M8</b>	M1	-0,052	0,026	0,202
	ORI	0,054	0,026	0,176
	UAM*	-0,558	0,026	0,000
<b>ORI</b>	M1*	-0,106	0,026	0,001
	M8	-0,054	0,026	0,176
	UAM*	-0,612	0,026	0,000
<b>UAM</b>	M1*	0,506	0,026	0,000
	M8*	0,558	0,026	0,000
	ORI*	0,612	0,026	0,000

\*diferencia significativa de medias  $\alpha < 0.05$

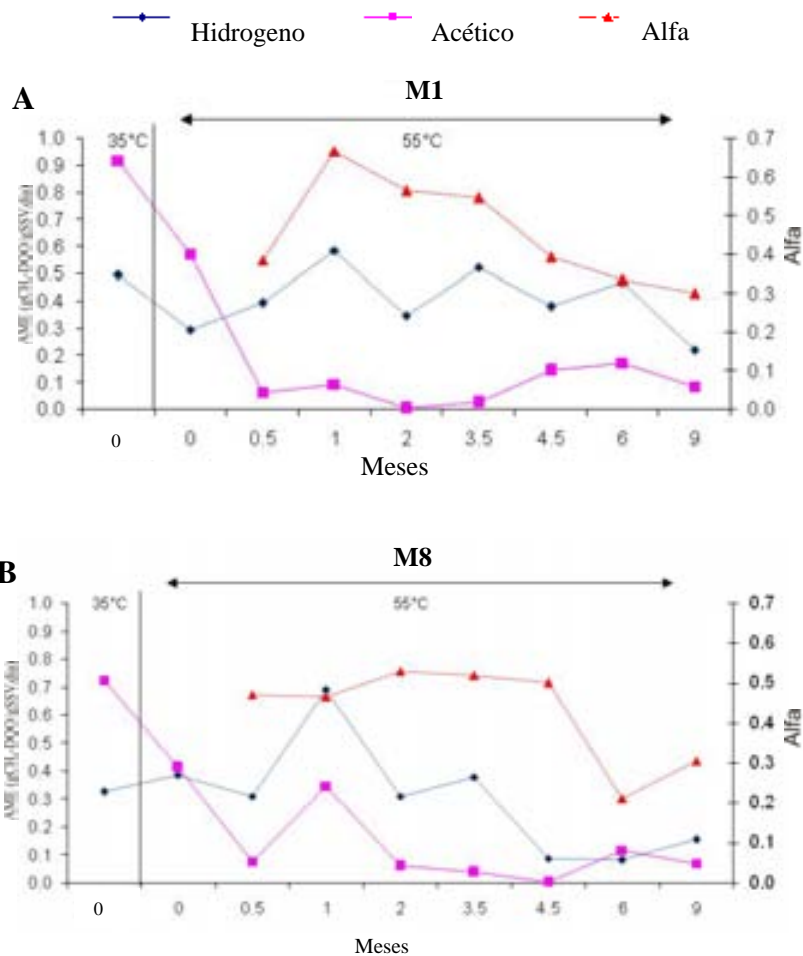
### 6.1.1.1 Lodos de origen industrial.

El efecto inicial del cambio de mesofilia a termofilia en los reactores industriales (M1 y M8) provocó una disminución del 40% de la AME en el grupo de las arqueobacterias metanógenas acetoclásticas. En el tiempo 0, durante el cambio de temperatura la AME disminuyó de 0.64 a 0.40 gCH<sub>4</sub>-DQO/SSV/día para M1 y de 0.51 a 0.29 para M8 (Figura 9A-B). A 55°C, la AME acetoclástica del reactor M1 osciló por debajo de 0.12 y para M8 alrededor de 0.24. Estos valores no alcanzaron el intervalo estándar (0.5-1.5 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día) establecido para lodos granulares de reactores UASB (Noyola y Moreno, 1994).

En relación al efecto inicial de la termofilia sobre la AME hidrogenófila, se registró en el reactor M1 una disminución del 40%, (de 0.49 a 0.29 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día). En el reactor M8 hubo un ligero incremento del 20% (de 0.33 a 0.39 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día.). Posteriormente, durante el experimento, ambos reactores presentaron oscilaciones con tendencia a disminuir hacia el final (Figura 9A-B).

A pesar de que la AME hidrogenófila en M1 y M8 fue siempre superior a la acetoclástica, no alcanzó el intervalo estándar para un lodo anaerobio, aunque, estuvo muy próxima (con excepción de los meses 1 y 3.5 para M1 y el mes 1 en M8, que se situaron dentro de dicho intervalo). El reactor M8, sin embargo, presentó una disminución hacia el final del experimento.

Figura 2A -B. Valor promedio de la AME y coeficiente alfa de los lodos anaerobios industriales, M1 y M8, en mesofilia (0-35°C) y termofilia (55°C). Simbología:



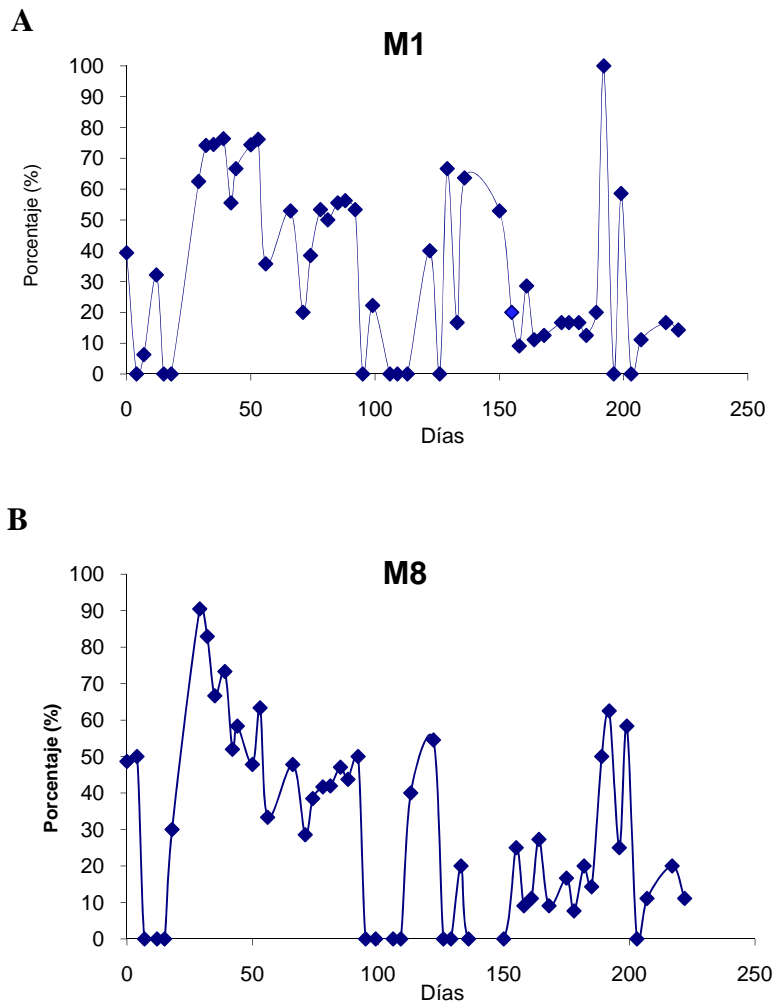
En cuanto a la capacidad amortiguadora del reactor M1, durante el experimento se mantuvo menor a 0.5, valor adecuado en el cual los ácidos y bases están en equilibrio (Anexo 4). A partir de los 4.5 meses existió una ligera caída de dicha relación lo cual coincidió con la disminución de la AME hidrogenófila (Figura 9A). Por otra parte, la capacidad amortiguadora del reactor M8 se mantuvo en un intervalo muy próximo a 0.5, hasta que disminuyó en los dos últimos tiempos muestreados (Anexo 4) que coincidió con la disminución de la AME hidrogenófila (Figura 9B). Sin embargo, estadísticamente no existe correlación entre los valores de AME y la capacidad búfer del lodo (Anexo 6).

El pH inicial para el reactor M1 fue de 8.0 y para el M8 de 6.8. No obstante, constantemente se alcalinizaron hasta superar el pH recomendado de 8.3 (Angelidaki *et al.*, 2003; Roš y Drago, 2003) (Anexo 4).

Los SSV para ambos reactores estuvieron por debajo de la concentración estándar establecida para lodos anaerobios que es de 40-120 g/l (Anexo 4) (Noyola y Moreno, 1994). M1 inició con 16.2 g/l inicialmente y terminó en 14.79 g/l. Mientras el lodo M8 presentó valores ligeramente más altos en el tiempo 0, 22.1 g/l y disminuyeron constantemente hasta 8 g/l.

El porcentaje (%) de CH<sub>4</sub> producido por los lodos industriales presentó muchas fluctuaciones durante el transcurso del experimento, puesto que el metano en la proporción total del biogás oscila en 50%. En el periodo 25 y 50 días, el porcentaje se estabilizó por arriba de 50% (Figura 10A-B) y, posteriormente, la calidad del biogás presentó grandes oscilaciones en su calidad. Tal información concuerda con las grandes oscilaciones de la AME, lo cual indica que el consorcio metanógeno no se estabilizó durante los nueve meses de exposición a termofilia.

Figura 3A-B. Porcentaje de CH<sub>4</sub> producido por los lodos anaerobios industriales M1 y M8 durante los nueve meses del experimento.



Con respecto a la concentración de AGV's, los ácidos acético, propiónico y butírico tendieron a acumularse en este tipo de lodo (Anexo 4). Para el reactor M1, la concentración inicial de ácido acético fue de 187.1 mg/l, que se incrementó hasta 4116 mg/l en el mes 1; posteriormente osciló entre los 2723-4013 mg/l. La concentración inicial de ácido propiónico fue de 34.17 mg/l y aumentó constantemente hasta 1277 mg/l. El ácido butírico presentó valores bajos dentro del reactor, siendo de 200.98 mg/l en el primer registro y aumentó constantemente hasta 454.65 mg/l en el último.

En el reactor M8, la concentración inicial de ácido acético fue de 1959 mg/l, llegando hasta 2107 mg/l en el primer mes, para mantenerse oscilando por arriba de este valor durante la cinética. La concentración inicial de ácido propiónico fue de 813 mg/l disminuyendo en el primer mes a 541 mg/l y partir de aquí se elevó constantemente hasta 1294 mg/l. Por último, la concentración de ácido butírico alcanzó el máximo (772.27 mg/L) en el primer mes, disminuyendo posteriormente a partir del segundo mes hasta un mínimo de 73.17 mg/L (Anexo 4).

#### **6.1.1.2 Lodos de origen municipal.**

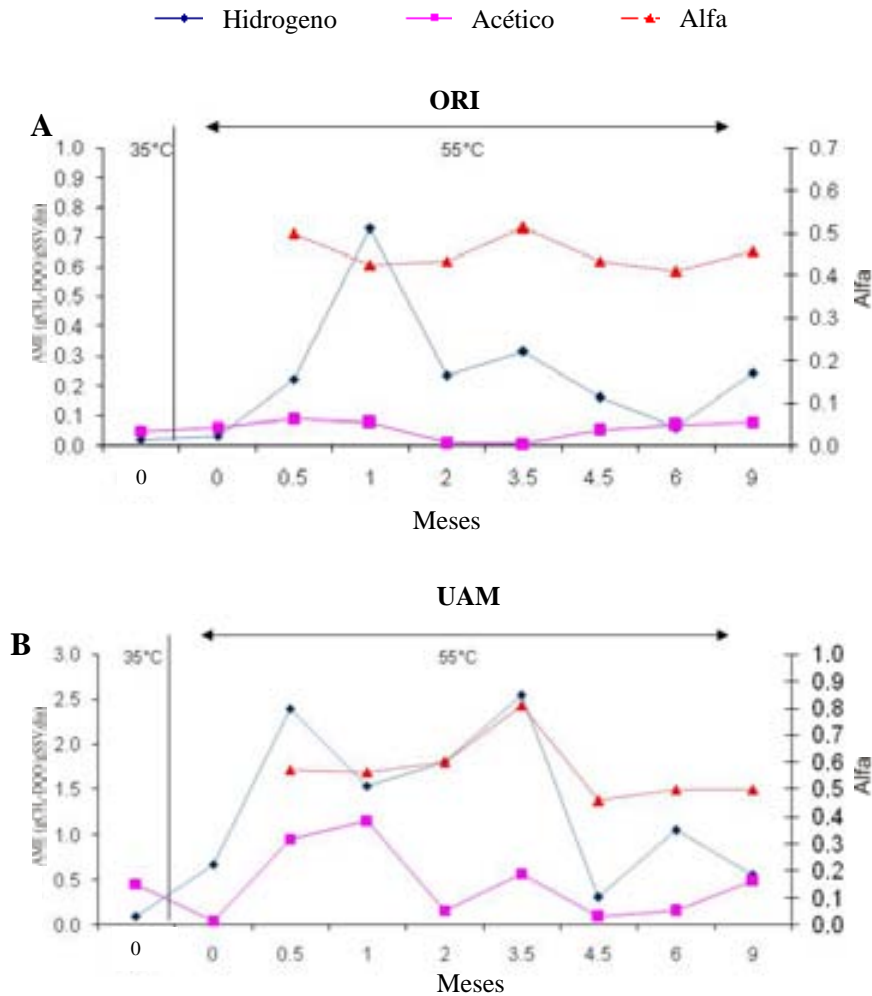
La AME acetoclástica de los reactores municipales (ORI y UAM), bajo condiciones de mesofilia presentó valores inferiores a los industriales (0.03 y 0.15 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día, en ORI y UAM respectivamente) (Figura 8).

La AME acetoclástica en el reactor ORI se incrementó durante las condiciones mesófilas a termófilas (0.3 a 0.4 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día), mientras que en el lodo de la UAM se registró una disminución (de 0.15 a 0.02 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día) (Figura 11A-B). Una vez en condiciones termófilas, la AME acetoclástica para ambos tipos de lodo se mantuvo baja, oscilando entre 0.004 y 0.06 y 0.02 a 0.39 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día para los reactores ORI y UAM, respectivamente. Los valores cuantificados están por debajo del intervalo 0.5-1.5 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día (Noyola y Moreno, 1994).

En lo que respecta a la AME hidrogenófila, en ambos tipos de lodos municipales ésta se incrementó durante el periodo de transición a la termófila; sin embargo, en los lodos ORI el incremento fue mínimo (0.2 a 0.3 gCH<sub>4</sub>-DQO/g SSV/día) en comparación con el que se presentó en la clase UAM (0.1 a 0.68 gCH<sub>4</sub>-DQO/g SSV/día). Asimismo se observó que en el caso del reactor con el lodo ORI, durante el primer mes con 55°C, la AME aumentó a 0.73 gCH<sub>4</sub>-DQO/g SSV/día, para descender hasta 0.06 gCH<sub>4</sub>-DQO/g SSV/día. La AME evaluada en este lodo fue inferior al intervalo estándar establecido (Noyola y Moreno, 1994).

Por el contrario, en el reactor con los lodos UAM, la AME en condiciones termófilas presentó grandes oscilaciones; no obstante, los valores cuantificados se ajustaron al intervalo estándar de los lodos anaerobios granulares (0.5-1.5 gCH<sub>4</sub>-DQO/g SSV/día) (Fig. 11B).

Figura 4A-B. Valor promedio de AME y coeficiente alfa de los lodos anaerobios municipales ORI y UAM, en mesofilia (0-35°C) y termofilia (55°C). Simbología:



La capacidad amortiguadora de los lodos anaerobios ORI y UAM fue la más estable, ya que presentaron ligeras variaciones alrededor de 0.5 unidades a diferencia de lo que ocurrió en los lodos industriales; por consiguiente los lodos de origen municipal fueron más estables. Para el lodo ORI, la capacidad amortiguadora osciló entre 0.43-0.5 (Anexo 4); aunque durante la mayor parte del experimento fue ligeramente superior a 0.5, los valores varían poco. Se realizó la prueba de correlación de Spearman para determinar la correlación de las fluctuaciones de la AME hidrogenófila y acetoclástica con la capacidad búfer del lodo, cuyo resultado fue que no existe correlación entre ambos parámetros (Anexo 6).

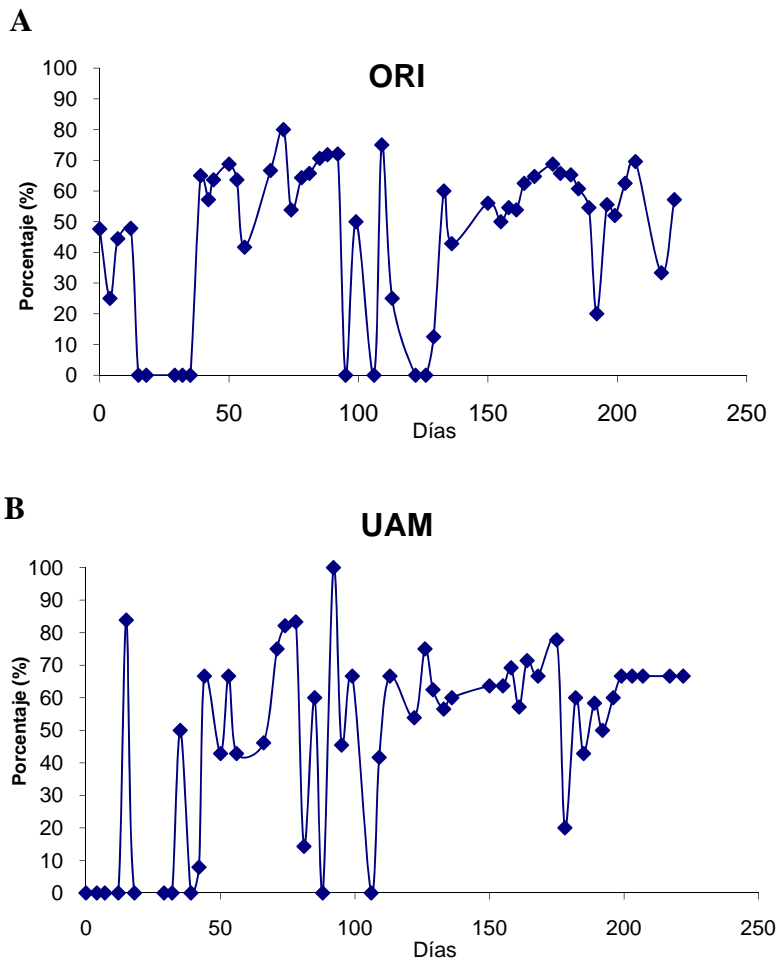
En los reactores con los lodos de la UAM, la capacidad amortiguadora fue la mejor en comparación de los otros reactores, teniendo valores por arriba de 0.5. A pesar que tuvieron coeficientes excelentes, en los últimos tres tiempos registrados este lodo presentó los valores más bajos dentro del sistema (0.46 a 0.5) (Anexo 4), lo que coincidió con la disminución del valor de AME hidrogenófila (Figura 11B).

El pH inicial del reactor ORI fue de 7.95 y el del reactor UAM de 8.43. A partir del primer mes el pH se incrementó por arriba del límite establecido de 8.3 (Roš y Drago, 2003; Angelidaki *et al.*, 2003) al oscilar entre 8.43 y 8.77 (Anexo 4).

Los SSV de estos reactores, al igual que ocurrió en los industriales, estuvieron por debajo de la concentración estándar cuantificada en lodos anaerobios (Noyola y Moreno, 1994) (Anexo 4). Inicialmente, en los lodos ORI se determinó 36.90 g/l (la más alta entre todos los reactores analizados), concentración que disminuyó constantemente hasta 12.5 g/l. En comparación, la concentración de SSV del lodo UAM fue la más baja de los reactores, puesto que comenzó con 6.28 y disminuyó hasta 2 g/l para el noveno mes.

De acuerdo al análisis del porcentaje de CH<sub>4</sub> producido por los reactores municipales, ambos reactores son inestables en el transcurso del experimento. Se observó, sin embargo, que existen dos periodos de estabilidad. En ORI, los primeros 40-95 y entre los últimos días 147-190 tuvieron producción de porcentaje de CH<sub>4</sub> fue superior al 50%. Por otro lado, el porcentaje de CH<sub>4</sub> del lodo UAM alcanzó un porcentaje superior de 50% a partir del día 120 manteniéndose hasta el final del experimento (día 222) (Figura 12A-B).

Figura 5A-B. Porcentaje de CH<sub>4</sub> producido por los lodos anaerobios municipales ORI y UAM durante los nueve meses del experimento.



La concentración de AGV's en esta clase de lodo fue baja (Anexo 4). En el reactor ORI, la concentración inicial de ácido acético fue de 286 mg/l disminuyendo en los últimos meses hasta 60.12 y 80.34 mg/l. El propionato sólo se registró en los dos primeros tiempos, 530.73 mg/l y 24.91 mg/l. Por su parte, el ácido butírico sólo se cuantificó en los primeros 15 días (23.96 mg/l).

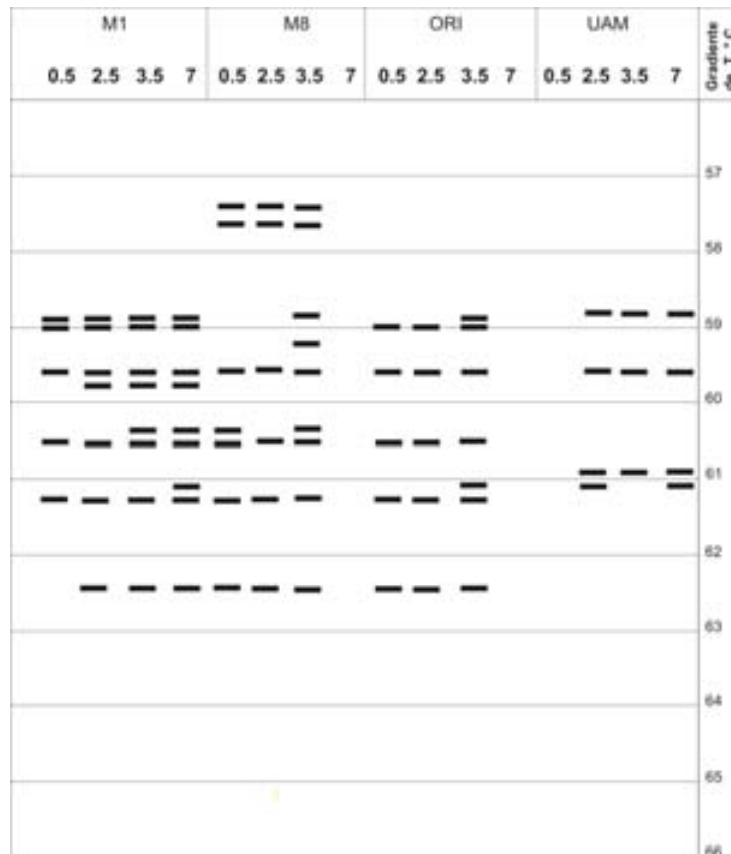
Para el reactor UAM, la concentración inicial del ácido acético fue de 285.35 mg/l, con tendencia a disminuir hacia el final del experimento, hasta 125.61 y 185.49 mg/l. La concentración de ácido propiónico inicial fue de 24.20 mg/l que irregularmente aumentó hasta la concentración final de 79.63 mg/l. El ácido butírico sólo se presentó en el primer mes, siendo su concentración de 39.61 mg/l.

## 6.1.2 Estudio de la diversidad de arqueobacterias metanógenas en la sucesión de mesofilia a termofilia.

### 6.1.2.1 Rango ponderado de riqueza ( $R_r$ )

En la Figura 13 se presenta el patrón de bandas obtenido con el TGGE para los reactores con las cuatro clases de lodos anaerobios. A partir de dicho patrón se observó que el lodo UAM presentó un número de bandas más bajo y significativo que los reactores M1 y M8.

Figura 6. Patrón de bandas de electroforesis en gel por gradiente de temperatura (TGGE) con cebadores universales para el dominio *Archaea*. Los tiempos analizados fueron 0.5, 2.5, 3.5 y 7 en los cuatro reactores anaerobios aclimatados a termofilia (M1, M8, ORI y UAM). Las líneas horizontales representan el gradiente de temperatura (56-66°C).



Se calculó la mediana y la desviación absoluta de la mediana (DAM) de la diversidad de los reactores (Tabla 15). De acuerdo con los resultados, se observó que la mediana  $R_r$  de la comunidad de arqueobacterias del lodo M8 es superior entre los reactores; por el contrario, la mediana de la  $R_r$  de la UAM fue ligeramente inferior en comparación con los demás.



Tabla 3. Mediana y DAM de los datos de riqueza ponderada ( $R_r$ ) de cada reactor (M1, M8, ORI y UAM).

REACTOR	M1	M8	ORI	UAM
Mediana	2.1	2.5	1	0.4
DAM	0.3	1.12	0.48	0.21

### 6.1.2.2 Dinámica (Dy)

Para analizar la dinámica microbiana de cada reactor, se empleó el método de análisis de “ventana corrediza” (*Moving window Analysis*, MWA). A partir de estos datos se obtuvieron los promedios de la tasa porcentual de cambio ( $\Delta_t$ ) para cada perfil de TGGE, los cuales se presentan en la Figura 14. Se observa que la tasa de cambio  $\Delta_t$  de los reactores M1 y M8 fue inferior al 30%. El reactor ORI tuvo una tasa porcentual de cambio de 13.4, siendo el más bajo entre los reactores. El reactor UAM tuvo la tasa porcentual más alta (40.5%), correspondiente a una dinámica alta.

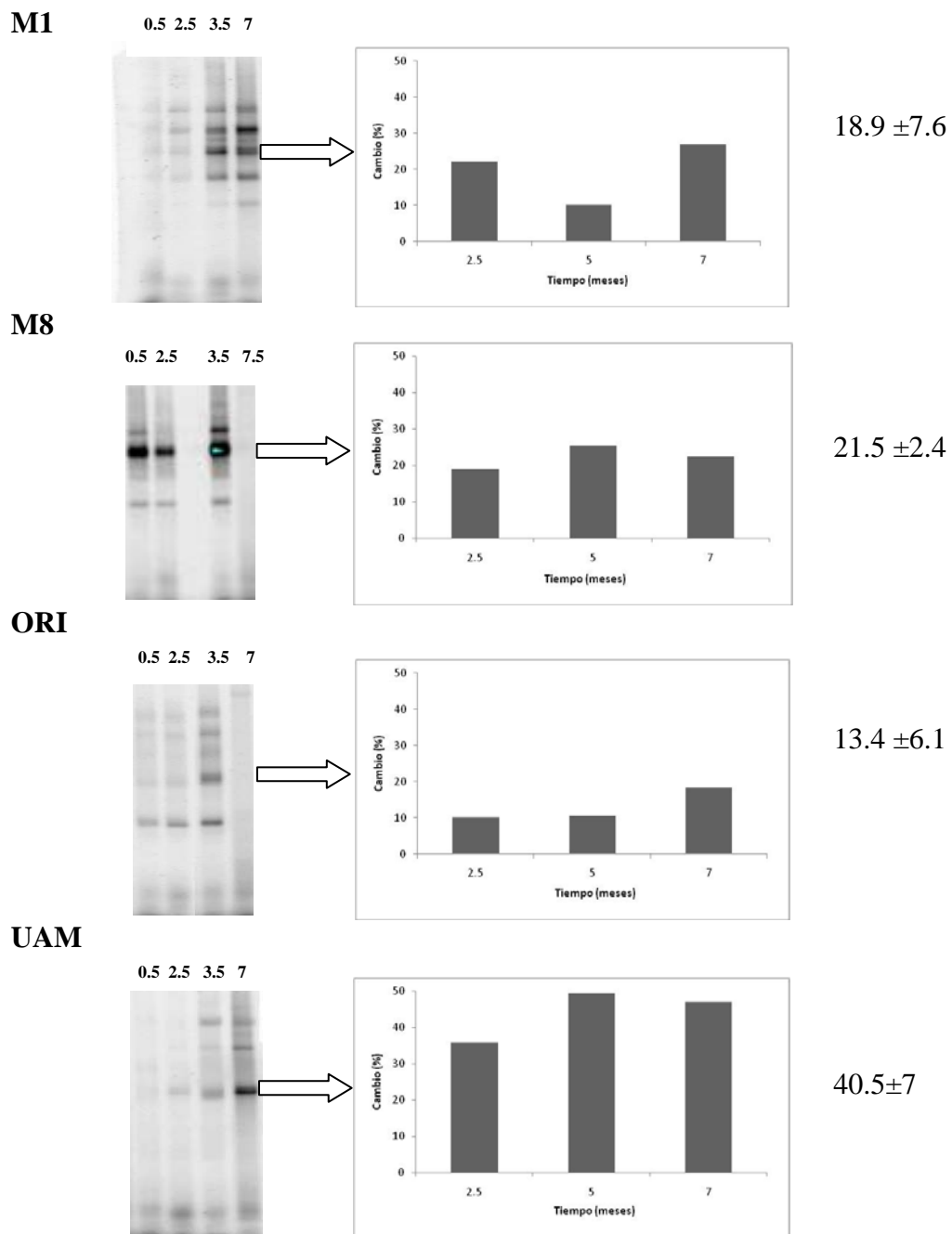
Figura 7. Perfiles de electroforesis en gel de gradiente de temperatura del gen ADNr 16S de Archaea, *Moving Window Analysis* (MWA), y los valores porcentuales de cambio ( $\Delta_t$ ). Se presenta la mediana y DAM para evaluar la dinámica de la comunidad de los tratamientos durante el experimento.

---

TGGE

MWA

$\Delta_t$

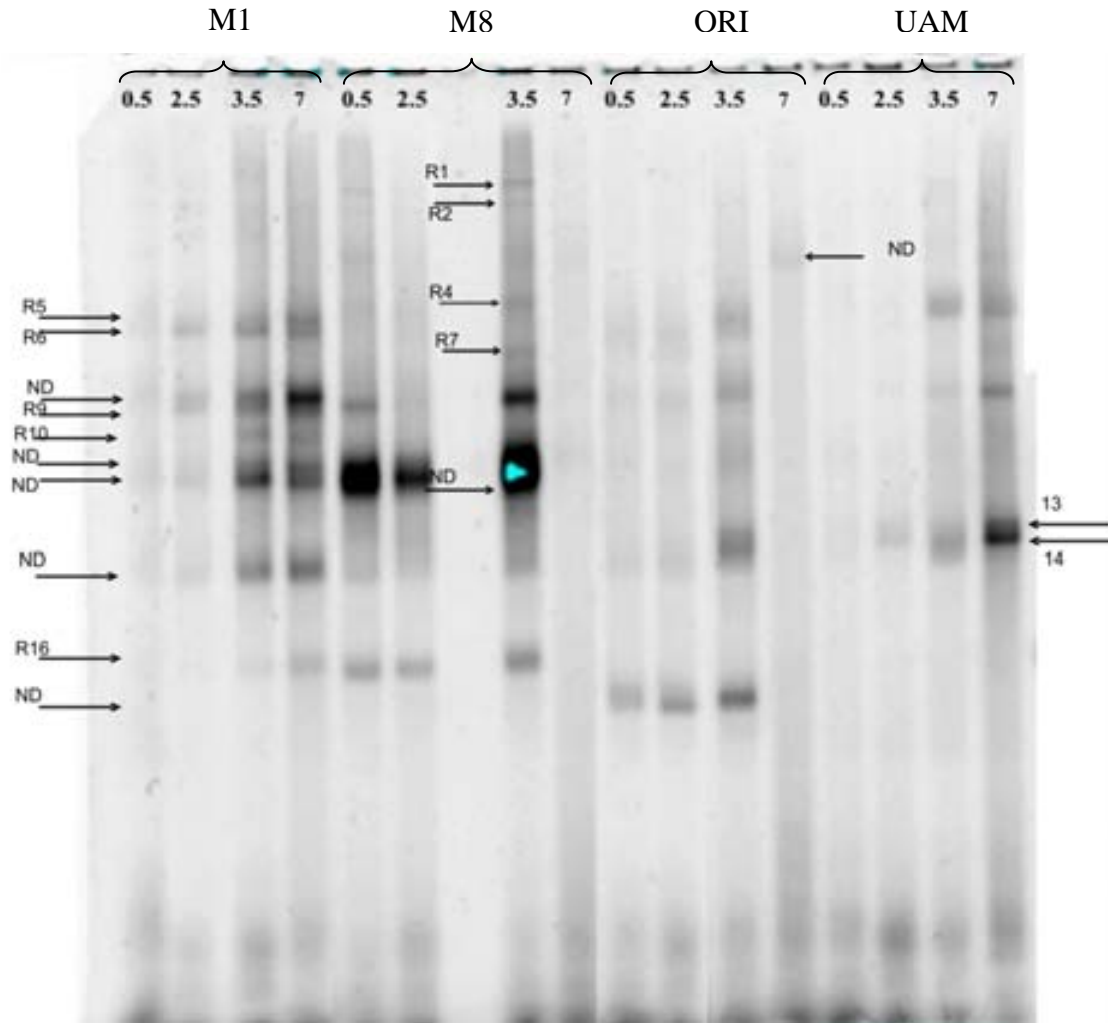


### 6.1.2.3. Huella genética y secuenciación

La Figura 15 muestra el perfil de bandas obtenido por TGGE en un gel de acrilamida, en el cual se obtuvo la separación de los amplicones del gen ADN<sub>r</sub> 16S de las arqueobacterias contenidas en los lodos termófilos (M1, M8, ORI y UAM). A partir del

patrón de bandas, se observa que no existe un cambio en el patrón de bandeo de cada lodo.

Figura 8. Separación de amplicones de arqueobacterias de los cuatro reactores anaerobios (M1, M8, ORI y UAM) con TGGE. De izquierda a derecha se presentan los tiempos 0.5, 2.5, 3.5, y 7. Gel de poliacrilamida 10% teñido con Syber-Gold. En cada carril se depositó 15  $\mu$ l de muestra. (Las flechas indican las UTO's obtenidas correspondientes a la región hipervariable V3 para el ADNr 16S de *Archaea*).



Con los perfiles del TGGE de los reactores M1, M8, ORI y UAM, se obtuvieron un total de 17 UTO's, de las cuales se amplificaron y secuenciaron 13. El resultado fue que 10 secuencias tuvieron un porcentaje de identidad superior al 90% y una de 88%, las 2 restantes no tuvieron identidad significativa.

Las UTO's R1, R2, R4, R5, R9 y R10 presentaron una alta identidad con la familia Desulfurococcaceae, arqueobacterias hipertermófilas no-metanógenas del *Phylum* Euriarchaeta, los cuales corresponden a tres géneros: *Ignisphaera*, *Sulfolobus* y *Vulcanisaeta*. Su porcentaje de identidad es superior al 92%.

Las arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas estuvieron representadas por dos familias: Methanobacteriaceae fundamentalmente por secuencias afines a los géneros

*Methanobacterium* sp. (R6) y *Methanothermobacter* (con más identidad por la especie *thermoautotrophicus*, en este caso bandas R13 y R14) y Methanomicrobiaceae, representada por el género *Methanoculleus* sp. (R16). Las arqueobacterias acetoclásticas únicamente estuvieron representadas por el género *Methanosaeta* (R7), el cual pertenece a la familia Methanosaetaceae. En la Tabla 16 se presenta el número de accesión y el porcentaje de identidad de cada secuencia en el banco de genes de NCBI. Se puede observar que en su mayoría, las secuencias problema tuvieron una identidad máxima con más de un ejemplar depositado en el banco de genes.

Tabla 4. Identidad de las secuencias de las UTO's separadas por TGGE de la región hipervariable V3 del ADNr 16S con las secuencias depositadas en la base de datos (*Genbank*) de NCBI.

Familia	Género y especie (en su caso)	OTU	Porcentaje de identidad	No. de accesión de Genbank
<b>Desulfurococcaceae</b>	<i>Ignisphaera</i> sp.	R1	97	DQ060320.1 DQ060323.1
	<i>Sulfolobus</i> sp.	R2	100	FJ489510.1 FJ489516.1
	<i>Vulcanisaeta soumiana</i>	R4	92	AB063645.1 AB063646.1
	<i>Vulcanisaeta distribute</i>		92	AB063630.1 AB063663.1
	<i>Sulfolobus</i> sp.	R5	92	FJ489510.1 FJ489516.1
<b>Methanobacteriaceae</b>	<i>Methanobacterium</i> sp.	R6	92	EU812212.1 EU888012.1 AB479402.1
<b>Methanosaetaceae</b>	<i>Methanosaeta harundinacea</i>	R7	95	AY970347.1 AY817738.1 AJ133791.1
<b>Desulfurococcaceae</b>	<i>Staphylothermus marinus</i>	R9	93	CP000575.1 Y07963.1 AJ012645.2 X99560.1
	<i>Ignisphaera</i> sp.	R10	90	DQ060320.1 DQ060323.1
	<i>Staphylothermus marinus</i>		90	CP000575.1 Y07963.1 AJ012645.2 X99560.1
<b>Methanobacteriaceae</b>	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	R13	98	DQ649328.2
	<i>Methanothermobacter</i> sp.	R14	98	DQ533549.1 DQ3549.1 FJ773215.1 FJ773216.1 FJ418154.1 FJ418154.1
	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>		98	DQ649328.2 AY196661.1 AY196660.1 X15364.1
<b>Methanomicrobiaceae</b>	<i>Methanoculleus</i> sp.	R16	96	AB436897.1 EU544029.1

Los perfiles del reactor M1, a pesar que en el primer tiempo de muestreo presentó UTO's poco definidas, tiene un patrón de bandas constante, dos UTO's pertenecientes a la familia Desulfurococcaceae (R5 y R9) y una a la metanógena *Methanobacterium* (R6). Resulta interesante que a partir del mes 3.5 aparece la UTO R10 que tiene identidad con la familia Desulfurococcaceae, y la R16, que la tiene con la metanógena *Methanoculleus*.

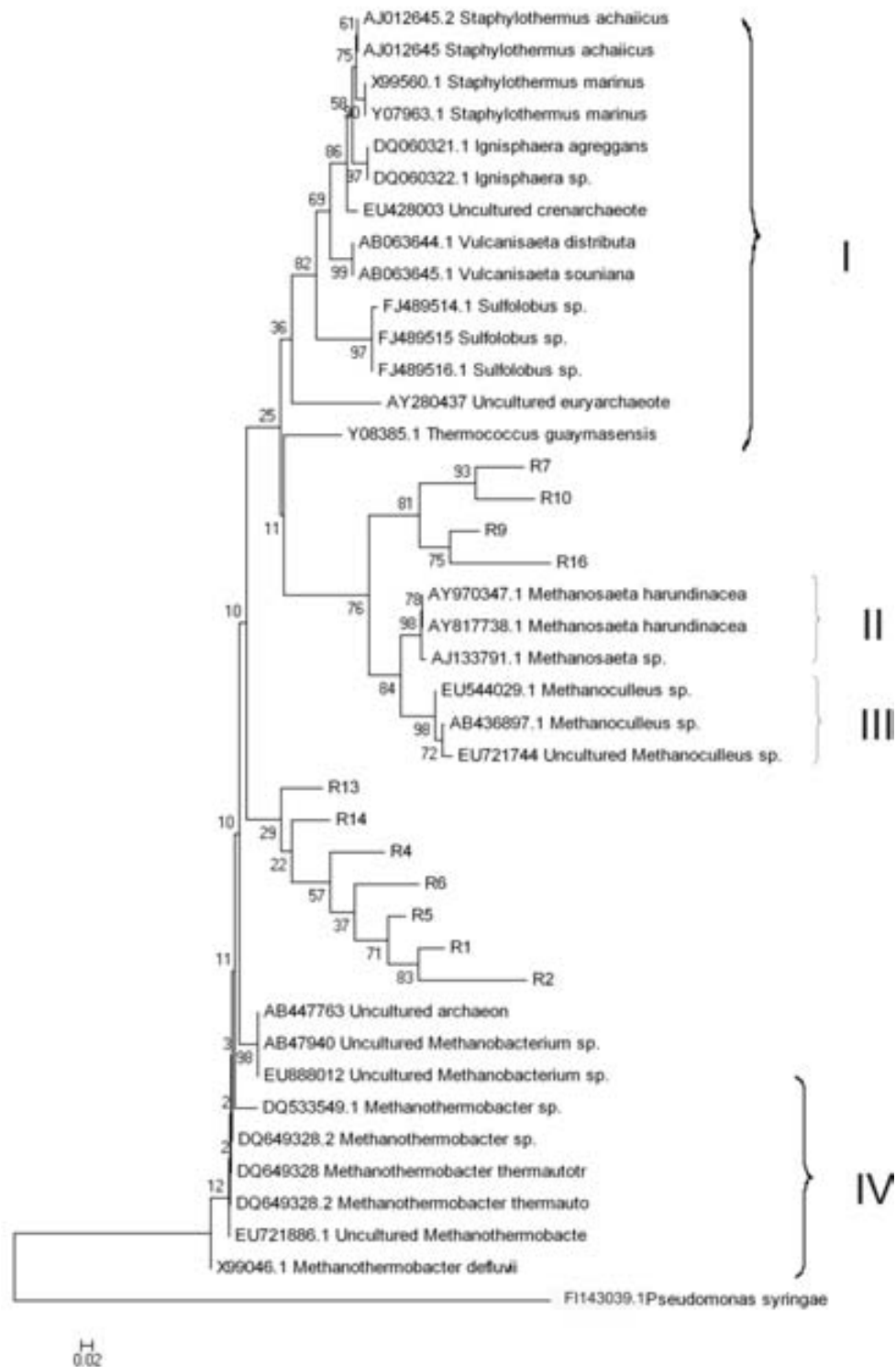
El reactor M8 presentó más bandas que el reactor M1, aunque se encontró una similitud en el perfil genético. Sin embargo, es importante señalar que en el tiempo 3.5 se observa la UTO R7, siendo el único género metanógeno acetoclástico, de la familia Methanosaetacea. Las UTO's R1 y R2 que corresponden a la familia Desulfurococcaceae, estuvieron presentes en todos los tiempos.

El patrón de bandas del lodo municipal ORI se caracterizó por la presencia de un menor número de UTO's, en comparación con M1 y M8. R13 y R14, afines a la metanógena hidrogenófila *Methanothermobacter*, dominaron únicamente a partir del mes 3.5.

Para el lodo UAM, el patrón de bandas fue considerablemente menor, los UTO's afines a la metanógena hidrogenófila *Methanothermobacter* (R13 y R14), dominaron durante el experimento (aunque cabe mencionar que en el gel no se obtuvo un patrón de bandeo para el tiempo 0.5). A su vez, los UTO's R4 y R5, afines al género *Staphylothermus*, comenzaron a predominar hacia el final del experimento.

Con los resultados anteriores se elaboró un árbol filogenético (Figura 16), a partir de un alineamiento múltiple mediante el método Neighbour-Joining, incluyendo como referencia secuencias de la misma región V3 del gen codificante del ADNr 16S de los microorganismos con mayor identidad a los depositados en la base de datos (*Genbank* de NCBI). Se encontraron 4 grupos (cluster): I. Desulfurococcaceae, II. Methanosaetaceae, III. Methanomicrobiacea, y IV. Methanobacteriaceae

Figura 9. Árbol filogenético *Neighbour-Joining* basado en la secuencia de la región V3 del ADNr 16S de *Archaea*. Se muestra la posición de 11 secuencias producto de TGGE. La barra indica un 2% de divergencia estimada. Los números junto a las ramas indican el valor de *bootstrap* cuando éste fue superior al 50% para 1000 replicas.



## 6.2 Segundo experimento. Efecto de la hipertermofilia como pretratamiento sobre un lodo mesófilo

### 6.2.1 Seguimiento bioquímico y fisicoquímico durante la aclimatación a termofilia.

Los resultados de la AME a partir de hidrógeno y acetato, tanto al inicio del experimento (condiciones mesófilas) como a diferentes tiempos a lo largo de cuatro meses con 55°C de operación, se presentan en la Tabla 17.

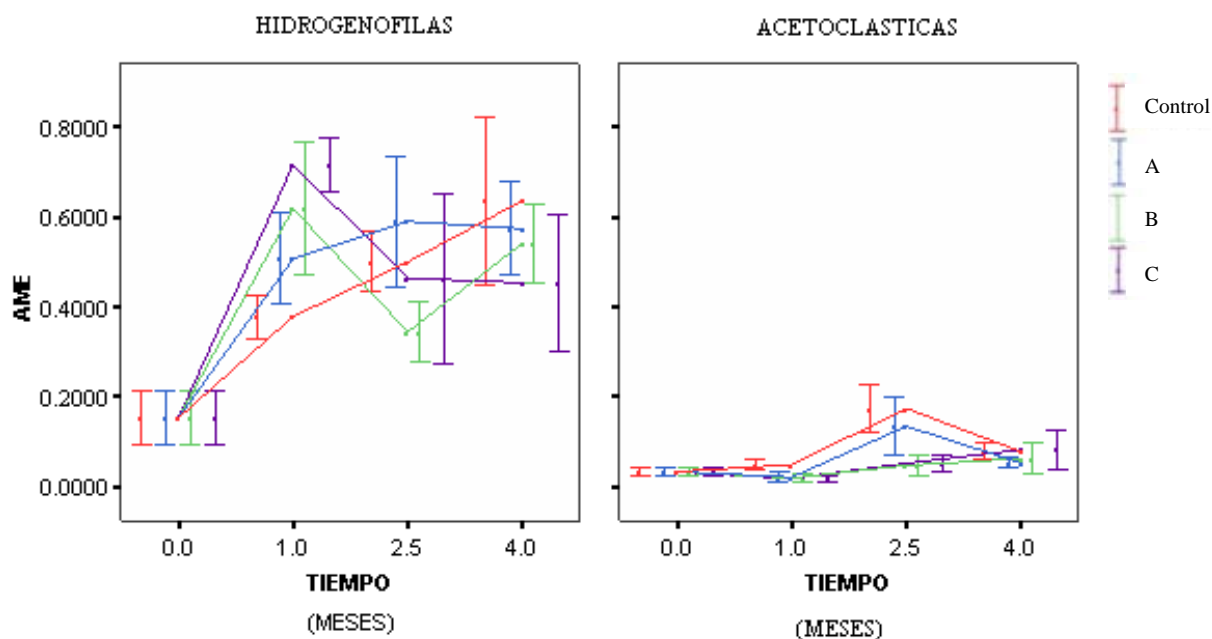
Tabla 5. Media ( $\bar{X}$ ) y varianza ( $S^2$ ) de la AME hidrogenófila ( $H_2$ ) y acetoclástica ( $CH_3COOH$ ) de los cuatro tratamientos en mesofilia (0-35°C) y termofilia (55°C) durante 4 meses.

Condición	MES	CONTROL				TRATAMIENTO A			
		$H_2$		$CH_3COOH$		$H_2$		$CH_3COOH$	
		$\bar{X}$	$S^2$	$\bar{X}$	$S^2$	$\bar{X}$	$S^2$	$\bar{X}$	$S^2$
Mesofilia 35°C	0	0.22	0.0068	0.11	0.0001	0.22	0.0068	0.11	0.0001
Termofilia 55°C	0	0.15	0.0034	0.03	0.0001	0.15	0.0034	0.03	0.0001
	1	0.38	0.0024	0.05	0.0001	0.51	0.0103	0.02	0.0001
	2.5	0.5	0.0045	0.17	0.0027	0.59	0.0209	0.13	0.0041
	4	0.64	0.0347	0.08	0.0003	0.57	0.0109	0.05	0.0002
	MES	TRATAMIENTO B				TRATAMIENTO C			
		$H_2$		$CH_3COOH$		$H_2$		$CH_3COOH$	
		$\bar{X}$	$S^2$	$\bar{X}$	$S^2$	$\bar{X}$	$S^2$	$\bar{X}$	$S^2$
Mesofilia 35°C	0	0.22	0.0068	0.11	0.0001	0.22	0.0068	0.11	0.0001
Termofilia 55°C	0	0.15	0.0034	0.03	0.0001	0.15	0.0034	0.03	0.0001
	1	0.62	0.0219	0.02	0.0001	0.72	0.0037	0.02	0
	2.5	0.34	0.0046	0.05	0.0005	0.46	0.0357	0.05	0.0003
	4	0.54	0.0077	0.06	0.0011	0.45	0.0227	0.08	0.0018

Los datos obtenidos de los parámetros bioquímicos se observan en el anexo 7, estos se analizaron con la prueba de ANOVA $_{\alpha=0.05}$  de 3 vías (Anexo 8). A partir de esta prueba se determinó que no existe diferencia estadística entre los cuatro tratamientos ( $p=0.36$ ), es decir, no importa el tiempo al que estén sometidos los consorcios a 75°C, el comportamiento de la actividad metabólica de las arqueobacterias es similar. En cuanto al parámetro sustrato, se confirmó que en termofilia, la AME hidrogenófila es estadísticamente superior a la acetoclástica, tal como se observa en la Figura 17. A partir de dicha figura, también se observa que la AME, principalmente hidrogenófila, aumentó constantemente a partir del primer mes, mientras que la acetoclástica se mantuvo en valores inferiores.

Finalmente, durante el desarrollo del experimento se encontró que existen diferencias significativas de la AME de los reactores en los distintos tiempos muestreados ( $p=0.00$ ), porque los valores finales son muy superiores a los iniciales.

Figura 10. Gráfica de los reactores, en la cual se presenta el comportamiento de la AME ( $gCH_4$ -DQO/ $gSSV/día$ ) hidrogenófila y acetoclástica de los reactores en el transcurso del experimento. Tiempo (meses) vs AME ( $gCH_4$ -DQO/ $gSSV/día$ ).



Se realizó la prueba de Tuckey-Kramer $\alpha<0.05$  para conocer la evolución de la AME acetoclástica e hidrogenófila a lo largo de los cuatro meses del experimento (Tabla 18). Conforme a esta prueba, existe evidencia estadística que a partir del primer mes no hubo cambios significativos en los valores de la AME hidrogenófila y acetoclástica en los cuatro tratamientos ( $p=0.00$ ) (Tabla 18). La AME en el tiempo 0 es muy baja y sí exhibió diferencias significativas con respecto del resto de los tiempos.

Tabla 6. Resultado de la comparación múltiple de Tuckey-Kramer $\alpha<0.05$  para la AME de los tratamientos durante cuatro meses.

<b>COMPARACIÓN MULTIPLE</b>				
<b>Variable dependiente: AME</b>				
<b>(I)</b> <b>TIEMPO</b>	<b>(J)</b> <b>TIEMPO</b>	<b>Diferencia</b> <b>de Medias</b> <b>(I-J)</b>	<b>Error SD</b>	<b>Sig.</b>



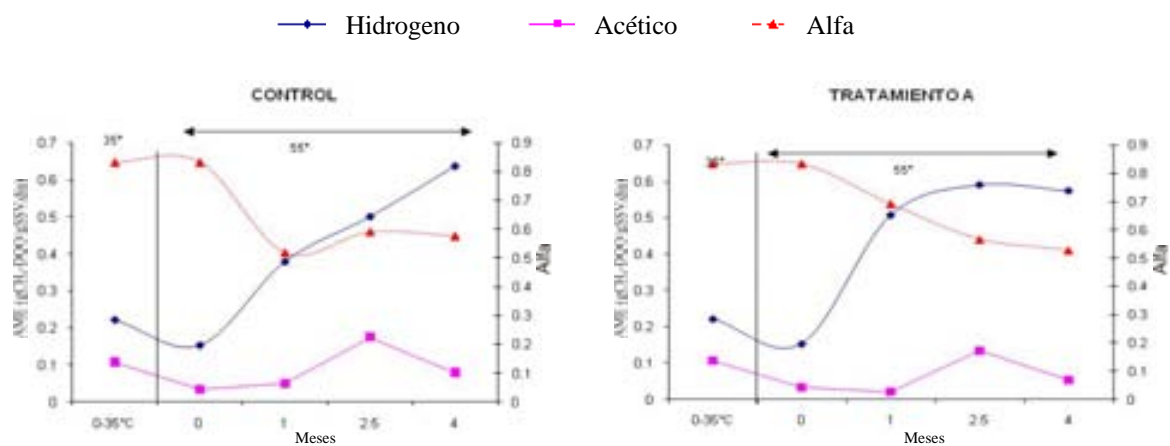
<b>0</b>	1*	-0.20	0.02	0.00
	2.5*	-0.19	0.02	0.00
	4*	0.20	0.02	0.00
<b>1</b>	0*	0.20	0.02	0.00
	2.5	0.00	0.01	1.00
	4	-0.02	0.01	0.54
<b>2.5</b>	0*	0.19	0.02	0.00
	1	0.00	0.01	1.00
	4	-0.02	0.01	0.43
<b>4</b>	0*	0.22	0.02	0.00
	1	0.02	0.01	0.54
	2.5	0.02	0.01	0.43

\*La diferencia de medias es significativa  $\alpha < 0.05$

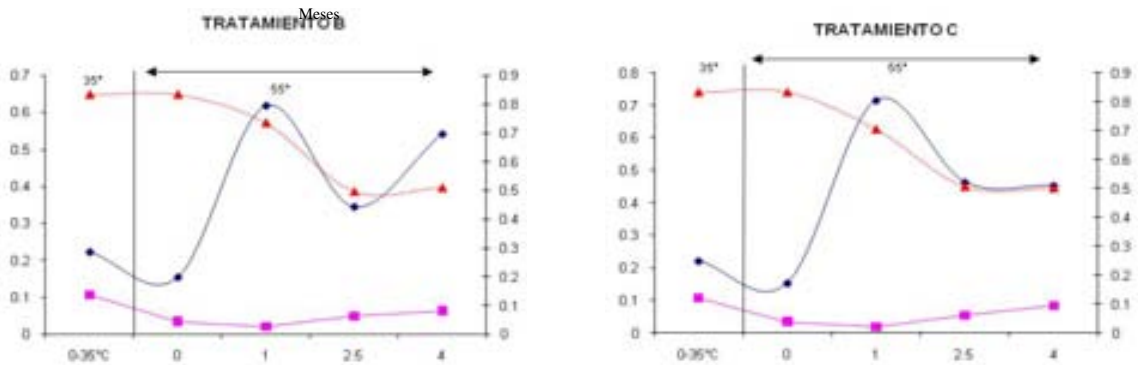
En el tiempo 0, el efecto inicial del cambio de mesofilia a termofilia en los cuatro tratamientos para ambos sustratos provocó una disminución en el valor de AME. La AME acetoclástica registró un descenso de 70% (de 0.11 a 0.03), mientras en la AME hidrogenófila hubo un decremento del 32% (de 0.22 a 0.15). Estos resultados fueron similares entre todos los tratamientos porque las condiciones iniciales del lodo fueron las mismas. Durante el experimento, en los cuatro tratamientos, la AME acetoclástica en termofilia fue baja, entre 0.17 y 0.08, de tal forma que se encuentran por debajo del valor estándar descrito para lodos anaerobios (Figura 18, Control-C).

En termofilia, la AME hidrogenófila del tratamiento CONTROL aumentó uniformemente durante el experimento en más del 400% (de 0.15 a 0.64 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día). A partir del tiempo 2.5 meses llegó al intervalo estándar para este tipo de lodos (0.5-1.5 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día; Noyola y Moreno, 1994). En el tratamiento A, la AME hidrogenófila se estabilizó a partir del primer mes de estar en termofilia puesto que osciló hasta el final del experimento entre 0.51 a 0.57 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día. Con este tratamiento, la AME se estabilizó más rápidamente en los valores estándar. En el tratamiento B, se observó que en el primer mes la AME hidrogenófila aumentó hasta 0.62 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día. Sin embargo, posteriormente se estabilizó en 0.54 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día. Por último, la AME hidrogenófila del tratamiento C (el de mayor residencia a 75°C) presentó para el primer mes 0.72 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día. Sin embargo, disminuyó en los siguientes tiempos a 0.46 y 0.45 gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/día (Figura 18, Control-C).

Figura 11 Control-C. Evolución AME acetoclástica e hidrogenófila, así como del coeficiente alfa de los tratamiento CONTROL, A, B y C. A en mesofilia (35°C) y Termofilia (55°C).



El coeficiente  $\alpha$  de los cuatro tratamientos aparentemente disminuyó con el transcurso del tiempo hasta estabilizarse en 0.5. No obstante lo anterior, los valores cuantificados fueron superiores al óptimo reportado para lodos anaerobios (Figura 18, Control-C). La disminución es más paulatina para el tratamiento A. De esta forma, los tratamientos mantuvieron un buen equilibrio entre carbonatos y ácidos grasos. Por otro lado, el pH también fue similar en los cuatro tratamientos, siendo ligeramente alcalinos con una tendencia a neutralidad. Los valores de pH estuvieron por debajo de 8.3, valor límite reportado en el cual el sistema comienza a desestabilizarse (Angelidaki *et al.*, 2003; Roš y Drago, 2003) (Anexo 7). Por otra parte, los SSV también estuvieron por debajo de la

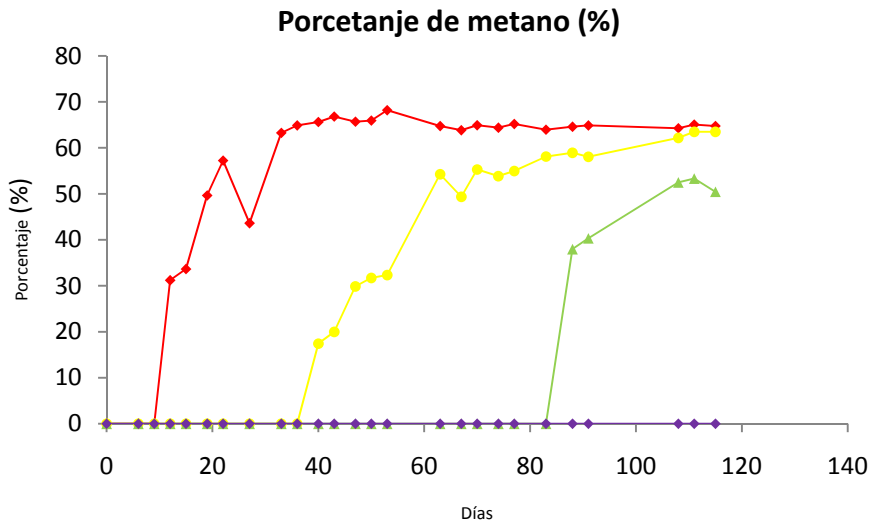


concentración estándar para lodos anaerobios (Noyola y Moreno, 1994), su concentración osciló entre 12.5-17.63 g/l (Anexo 7).

Por otra parte, el tratamiento CONTROL comenzó a producir  $\text{CH}_4$  a partir del día siete en termofilia y la calidad del biogás comenzó a aumentar a partir del día 35, en la cual llega a componer el 65-70% de  $\text{CH}_4$  en el biogás, tal aumento coincidió con el aumento constante de la AME hidrogenófila. El tratamiento A comenzó a producir  $\text{CH}_4$  siete días después que se le disminuyó la temperatura a  $55^\circ\text{C}$ , y a partir del día 35 también alcanzó una buena calidad del biogás (65-70%). En el caso del tratamiento B, la producción de  $\text{CH}_4$  comenzó a los 9 días desde que se le bajo la temperatura a  $55^\circ\text{C}$  (día 87), y la calidad de este biogás sólo llegó al 50% hacia el final del experimento (día 110). El tratamiento C, que es el que se expuso a  $75^\circ\text{C}$  durante toda la cinética, no produjo  $\text{CH}_4$  (Figura 19).

Figura 12. Porcentaje de  $\text{CH}_4$  (%) de los tratamientos Control, A, B y C en  $55^\circ\text{C}$ .

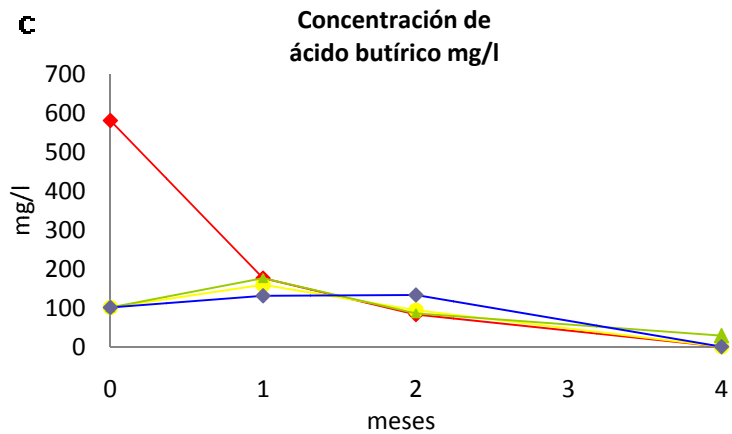
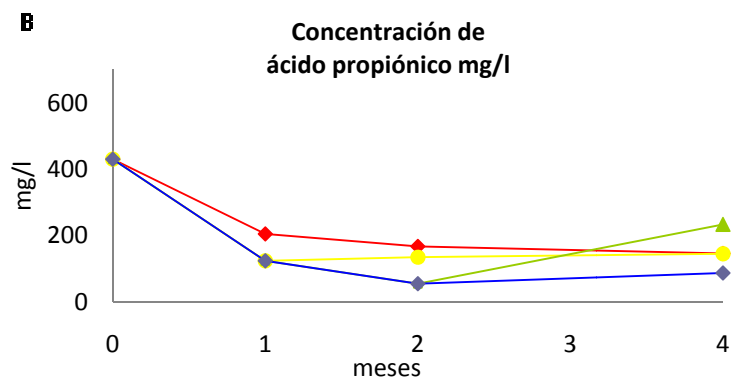
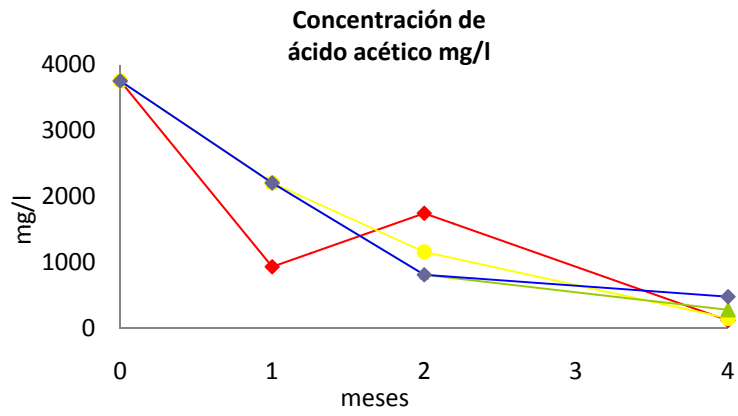




Con respecto a la concentración de AGV's en los tratamientos, estos se caracterizaron por la alta concentración inicial de ácido acético (3752 mg/l) la cual disminuyó constantemente y terminó con concentraciones bajas (Figura 20A-C), registrándose la mínima en el tratamiento Control (120 mg/l) y la mayor en el tratamiento C (481 mg/l). El ácido propiónico, al principio, en los cuatro reactores tuvo una concentración de 429 mg/l, que fue disminuyendo continuamente hasta un poco menos de 150 mg/l en los tratamientos Control y A, mientras que el tratamiento B finalizó con 280.83 mg/l y el tratamiento C con 87.36 mg/l (Figura 20B). Por último, el ácido butírico fue el de menor concentración entre todos los AGV's, comenzó con 580.54 mg/l en el tratamiento Control, y 100.41 mg/l para el resto de los tratamientos, y al igual que los otros dos ácidos, disminuyó hasta no detectarse en el cuarto mes. Únicamente el tratamiento B presentó 28.26 mg/l de este ácido al final del experimento (Figura 20C). Este fenómeno es debido a que las bacterias homoacetogénicas tienen una alta actividad para usar y transformar estos ácidos a acético e hidrógeno, que a su vez es utilizado por las arqueobacterias hidrogenófilas (Angenent *et al.*, 2002).

Figura 13A-C. Concentración de AGV's en los tratamientos Control, A, B y C. A. Concentración de ácido acético, B. concentración de ácido propiónico y C. Concentración de ácido butírico.





## 6.2.2 Estudio de diversidad de la comunidad de arqueobacterias en la sucesión de mesofilia a termofilia vía hipertermofilia.

### 6.2.2.1 Rango ponderado de riqueza ( $R_r$ )

El patrón de bandas de los perfiles de TGGE de los cuatro tratamientos obtenidos con los cebadores universales para arqueobacterias (parchF y parchR) se presenta en la Figura 21.

Figura 14. Patrón de bandas obtenido mediante TGGE con cebadores universales para el dominio *Archaea*. Los tiempos son 0, 1, 2.5, 3.5 y 5 meses en los cuatro tratamientos del lodo UAM aclimatados a hipertermofilia (75°C).



Los valores de riqueza ponderada de cada perfil se muestran en la Tabla 19. Para conocer la riqueza general de los tratamientos, se promediaron los valores de cada perfil (CONTROL=1.37, A=0.11, B=0.24, C=0.75). Al analizar la mediana y DAM, se puede observar que debido a la DAM grande de los datos, no existe una diferencia significativa entre los resultados de cada tratamiento (Tabla 19).

Tabla 7. Mediana y DAM de los datos de riqueza ponderada ( $R_r$ ) de los cuatro tratamientos.

REACTOR	CONTROL	A	B	C
Mediana	1.37	0.44	0.23	0.65
DAM	0.67	0.11	0.24	0.75

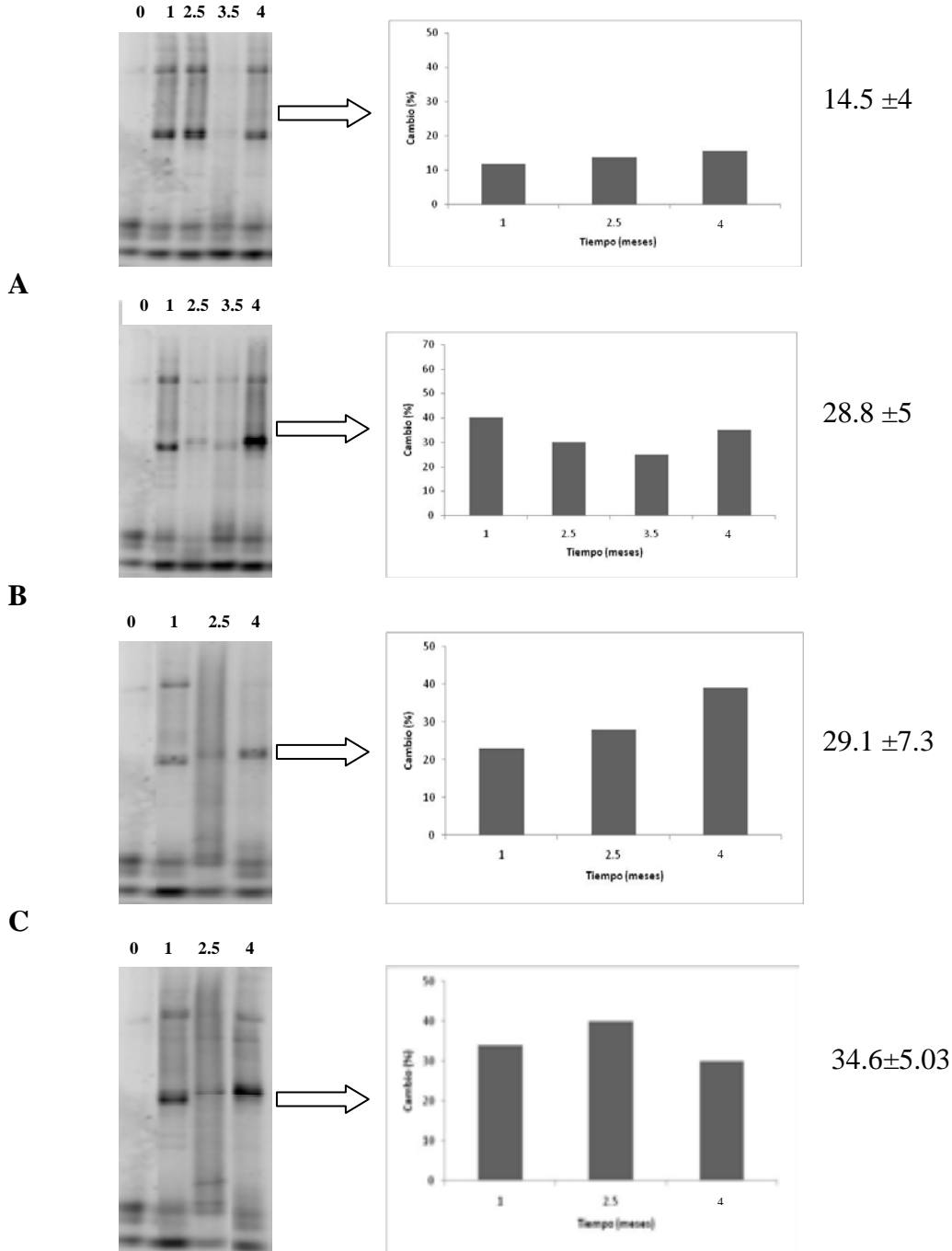
### 6.2.2.2 Dinámica ( $D_y$ )

Para analizar la dinámica microbiana de cada reactor, se empleó el método de análisis de MWA y a partir de estos datos se obtuvo el promedio de la tasa de cambio porcentual ( $\Delta_t$ ) para cada perfil de TGGE, los cuales se presentan en la Figura 22. Se observa que la tasa porcentual de cambio ( $\Delta_t$ ) del control es baja, lo que indica que el lodo fue estable; en los otros tres tratamientos la dinámica es alta. Para calcular y disminuir el error estadístico de este parámetro, se usó la mediana y la desviación absoluta de la mediana (DAM).

Figura 15. Perfiles de electroforesis en gel de gradiente de temperatura del gen ADNr 16S de *Archaea*, MWA, de los valores porcentuales de cambio ( $\Delta_t$ ). Se presenta la mediana y DAM para evaluar la dinámica de la comunidad de los tratamientos durante el experimento.

TGGE	MWA	$\Delta_t$
------	-----	------------

### Control

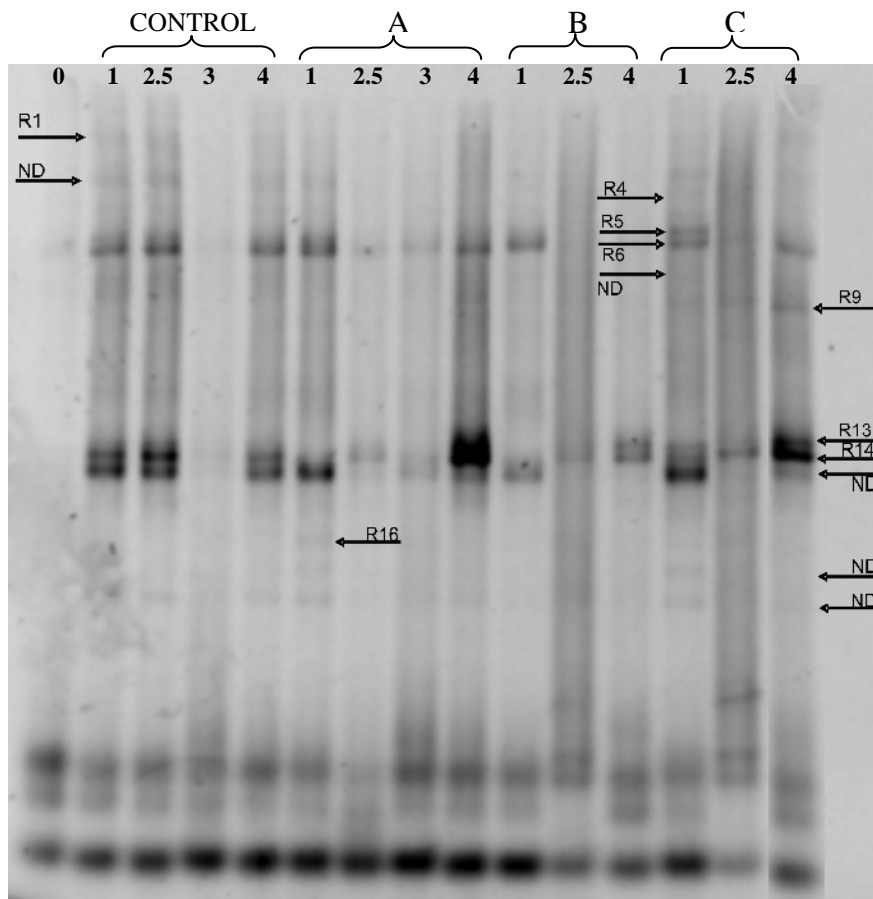


### 6.2.2.3 Huella genética y secuenciación

La Figura 23 muestra el patrón de bandas en el gel de poliacrilamida, del que se obtuvieron los amplicones del gen ADNr 16S para cada uno de los tratamientos estudiados (Control, A, B y C). Se observó que el número de bandas es bajo y corroboró el resultado obtenido en el primer experimento para este lodo. No se observa diferencias

entre los tratamientos y el control, a excepción del tratamiento C que presenta unas bandas diferentes.

Figura 16. Separación de amplicones de arqueobacterias de los cuatro tratamientos del lodo UAM (CONTROL, A, B y C) con TGGE. De izquierda a derecha se presentan los tiempos 0, 1, 2.5, 3.5, y 4. Gel de poliacrilamida 10% teñido con sybr Gold. En todos los carriles se agregaron 15 µl de muestra. Las flechas indican las UTO's obtenidas corresponden a la región hipervariable V3 para el ADNr 16S de *Archae*.



De los perfiles del TGGE de los tratamientos CONTROL, A, B y C, se obtuvieron un total de trece UTO's, de las cuales se amplificaron y secuenciaron nueve. Las cuatro restantes no se lograron amplificar con las condiciones de los cebadores. El resultado fue que ocho UTO's tienen un porcentaje de similitud superior al 90%, la restante no tuvo alguna similitud significativa. Las UTO's R1, R4, R5 y R9 tienen un alto porcentaje de identidad con la familia Desulfurococcaceae, arqueobacterias hipertermófilas no-metanógenas del *Phyllum* Euriarchaeta. Las UTO's R6, R13 y R14 representan a la Familia metanógena Methanobacteriaceae, mientras que R16 corresponde a Methanomicrobiaceae (ambas familias pertenecen al grupo de metanógenas hidrogenófilas). De acuerdo a los perfiles de TGGE, la familia Methanosaetaceae, grupo de metanógenas acetoclásticas, no tiene representantes en el lodo de la UAM. En la Tabla 20 se presentan y los números de accesión de las secuencias en el banco de genes, así como el porcentaje de identidad de la secuencia problema. Se puede observar que en su mayoría, las secuencias problema tuvieron una identidad máxima con más de un ejemplar depositado en el banco de genes.



Tabla 8. Identidad de las secuencias de las UTO's separadas por TGGE de la región hipervariable V3 del ADNr 16S con las secuencias depositadas en la base de datos (*Genbank*) de NCBI.

Familia	Género	OTU	Porcentaje de identidad (%)	No. de accesión de Genbank
Desulfurococcaceae	<i>Ignisphaera</i> sp.	R1	97	DQ060320.1 DQ060323.1
	<i>Vulcanisaeta souniana</i>	R4	92	AB063645.1 AB063646.1
	<i>Vulcanisaeta distribute</i>		92	AB063630.1 AB063663.1
	<i>Sulfolobus</i> sp.	R5	92	FJ489510.1 FJ489516.1
Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i> sp.	R6	92	EU812212.1 EU888012.1 AB479402.1
Desulfurococcaceae	<i>Staphylothermus marinus</i>	R9	93	CP000575.1 Y07963.1 AJ012645.2 X99560.1
	<i>Methanothermobacter thermotrophicus</i>	R13	98	DQ649328.2
Methanobacteriaceae	<i>Methanothermobacter</i> sp.	R14	98	DQ533549.1 DQ3549.1 FJ773215.1 FJ773216.1 FJ418154.1 FJ418154.1
	<i>Methanothermobacter thermotrophicus</i>		98	DQ649328.2 AY196661.1 AY196660.1 X15364.1
Methanomicrobiaceae	<i>Methanoculleus</i> sp.	R16	96	AB436897.1 EU544029.1

Los perfiles de los tratamientos Control, A, B y C son semejantes, aunque se observa la banda nueve que es exclusiva en el tratamiento C. Las UTO's que aparecen constantemente en los perfiles de los tratamientos son R1, R5 (afines a la familia Desulfurococcaceae) y los metanógenos (R6, R13 y R14). La UTO R16 (*Methanoculleus* sp.) se presenta esporádicamente como una UTO tenue en el primer mes de los tratamiento A y C, probablemente como consecuencia de su baja dominancia dentro de la comunidad de arqueobacterias. La UTO R4 (Desulfurococcaceae) aparece inconsistentemente como una UTO tenue. La UTO R9 (afín a *Staphylothermus marinus*) aparece exclusivamente en el tratamiento C como un UTO tenue.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Análisis bioquímico y fisicoquímico de la sucesión de mesofilia a termofilia.

### 7.1.1 Análisis bioquímico y fisicoquímico de lodos de diferente procedencia.

De acuerdo al análisis estadístico aplicado a la AME hidrogenófila y acetoclástica (ANOVA $_{\alpha=0.05}$  de 4 vías), el origen del lodo (industrial y municipal) no es un parámetro suficientemente importante que afecte a la actividad metabólica (AME) de arqueobacterias, en los cuatro reactores, durante el experimento ( $p=0.11$ ). Este resultado es consecuencia de la carencia de un parámetro (físico o químico) suficientemente exclusivo que defina a los lodos industriales (M1 y M8) y municipales estudiados (ORI y UAM). Por una parte, la industria cervecera está dentro del rubro de la alimenticia, de tal forma que tiene una alta concentración de materia orgánica producto de los cereales, lúpulo, semillas, levaduras y malta empleados en la fermentación (Beltrame *et al.*, 1999), así como nitrógeno y fosforo que son residuos de aditivos empleados para limpieza y también un bajo porcentaje de níquel, producto del desgaste de la maquinaria (García-Chaves y Díaz-Baez, 2003). Con respecto a los lodos municipales, el reactor ORI recibe cargas de la Ciudad de Orizaba que se caracteriza por tener una composición muy diversa debido a que recibe descargas de origen doméstico, de industria textil, cervecera, cementera y papelera, entre otras (INEGI, 2004). A su vez, el reactor UAM, recibe descargas de los baños, cocina y laboratorios de análisis químico, biológico y clínico de aquella institución. Para caracterizar a detalle los reactores, se debe analizar el contenido químico (concentración de fosfatos, nitratos, metales, etc.) y características fisicoquímicas (DBO, DQO, etc.) de los lodos a estudiar, debido a que los lodos municipales tratan agua residual con características fluctuantes (Angelidaki *et al.*, 2003).

De acuerdo al análisis de Tuckey-Kramer $_{\alpha<0.05}$ , se obtuvo que la AME de los reactores M1 y M8 tienen el mismo comportamiento ( $p=0.202$ ), probablemente debido a que tienen la misma procedencia. La AME del lodo ORI es semejante a M1 ( $p=0.176$ ), probablemente como resultado de que el primero de ellos trata descargas de agua con una composición muy variable, tal como lo indica Angelidaki y colaboradores (2003), con contenido de descargas industriales (incluyendo la alimenticia), como se comentó anteriormente. Sin embargo, es necesario complementar este tipo de investigaciones con otros análisis analíticos para complementar la información de la presente investigación. Por último, el lodo municipal procedente de la UAM, presenta la AME más alta entre todos los reactores estudiados (Figura 8). La posible explicación es que la composición del agua tratada y la temperatura a la que trabaja el reactor permitió que el consorcio de arqueobacterias no se especializara para condiciones específicas, es decir que podrían soportar varios ambientes para su funcionamiento. Por el contrario, los reactores de M1 y M8 están en condiciones de carga y de temperatura muy controladas, constantes durante todo el tiempo de su funcionamiento. De esta manera, al estar adaptados a condiciones específicas, su periodo de estabilización podría ser más prolongado. ORI proviene de un reactor mesófilo donde las condiciones químicas y físicas podrían ser semejantes a los lodos industriales.

Un parámetro importante analizado fue la concentración de SSV, debido a que es utilizado para calcular la AME e indica la cantidad de materia orgánica activa e inactiva (incluyendo microorganismos metanógenos contenidos en el lodo) (Metcalf y Eddy, 1996). A diferencia de lo que indica Noyola y Moreno (1994), se observó que el contenido de SSV de los lodos fue muy inferior al estándar, que es 40-120 g/l. El reactor de la UAM tuvo una concentración de SSV más baja que el resto, lo cual indicó

que un pequeño número de microorganismos son los que desarrollan una alta actividad metanógena en el sistema (este reactor presentó las AME más elevadas).

Adicionalmente, existe evidencia estadística en que los valores de AME acetoclástica e hidrogenófila fueron significativamente diferentes ( $p=0.00$ ). En la Figura 8 que compara el comportamiento de las medias y varianzas de los reactores, se aprecia que la AME hidrogenófila es superior a la acetoclástica. Tal resultado confirma que, dentro del grupo de arqueobacterias metanógenas, la actividad del grupo funcional hidrogenófilo es mayor en termofilia debido a que la temperatura para su crecimiento óptimo tiene un intervalo amplio, 30-70°C, mientras que, las arqueobacterias metanógenas acetoclásticas crecen en rangos de temperatura más restringidos (30-50°C aunque pueden llegar hasta 60°C, dependiendo de la especie). Por tal razón, la conversión de acetato a metano disminuye cuando se someten los lodos a termofilia (Nielsen *et al.*, 2004; Burak y Sherer, 2008). Un hecho que confirma estas observaciones, es que en mesofilia la AME acetoclástica en los reactores (principalmente industriales) es alta y disminuye inmediatamente al estar en condiciones termófilas, debido a que la temperatura rebasa la tasa óptima de las actividades enzimáticas (Zebranska *et al.*, 2000; De la Rubia *et al.*, 2005). Durante el experimento, este grupo funcional no se recupera. Por el contrario, durante la transición termófila, la actividad hidrogenófila es mayor, lo cual reitera la dominancia de las arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas en termofilia (Burak y Sherer, 2008). Ahring (1995) publicó que las bacterias metanógenas hidrogenófilas son responsables de la mayor remoción de la DQO bajo condiciones de termofilia (55°C) en comparación con las acetoclásticas.

A pesar de que la temperatura se mantuvo constante a 55°C durante los nueve meses, como se recomienda (Roš y Drago, 2003; De la Rubia *et al.*, 2005), existe evidencia estadística de fuertes fluctuaciones de la AME hidrogenófila y acetoclástica en los 4 reactores durante el experimento ( $p=0.00$ ), hecho que se observa en la Figura 8. En dicha Figura, las oscilaciones más pronunciadas son debidas a las metanógenas hidrogenófilas, mientras que las acetoclásticas presentaron oscilaciones menores. Algunas investigaciones concluyen que un sistema inestable es causado porque las especies originales mesófilas están siendo reemplazadas lentamente, en las nuevas condiciones por una población termófila (Nielsen *et al.*, 2004; De la Rubia *et al.*, 2005; Moen *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2004). Otra posible causa que origina fluctuaciones en un reactor es el control inadecuado del pH, debido a que en termofilia la actividad enzimática es más sensible a este parámetro, como resultado de las diferentes velocidades de metabolismo de las bacterias y arqueobacterias del sistema (Angelidaki *et al.*, 2003; Roš y Drago; 2003). Para una buena actividad metanógena, el pH debe estar entre 6 y 8.3 (Burak y Scherer, 2008). Al analizar este valor, se observó que el pH es ligeramente alcalino por encima de 8.3 para los cuatro reactores, a pesar de las altas concentraciones de AGV's en los reactores industriales. Angelidaki y colaboradores (2003) explican que un pH alto con altas concentraciones de AGV's puede ser debido a la existencia de amoníaco en el sistema.

En cuanto a la capacidad amortiguadora, se observó una tendencia a la disminución de este valor en los lodos industriales, mientras que los lodos municipales se registraron próximos a 0.5. Noyola y colaboradores (1993) reportaron que la AME de los lodos anaerobios puede caer hasta 0.2-0.4, sin embargo, en este experimento se observó que las ligeras disminuciones de este parámetro es suficiente para afectar la AME hidrogenófila en ambos lodos.

En contraste con el pH alcalino, y al igual que Tatzuzawa y colaboradores (2006) observaron en termofilia, se encontró una alta concentración de AGV's en los reactores M1 y M8. Principalmente el ácido acético apareció en una elevada concentración en los lodos anaerobios como consecuencia de la aportación inducida de AGV's como fuente de carbono y la alta actividad metabólica de las bacterias acidógenas que rebasó la actividad metanógena acetoclástica para consumir este sustrato (de hecho, dicha actividad acetoclástica disminuyó durante la sucesión en cada lodo). Por ende, existió una tendencia a la acidificación del sistema, como lo muestra la disminución del coeficiente alfa en los últimos meses muestreados, algo que ya había sido reportado en estudios previos realizados en termofilia (Amend y Shock, 2001; Nielsen *et al.*, 2004).

Adicionalmente, se observó que las concentraciones de ácido propiónico en estos lodos (M1 y M8) aumentaron constantemente como resultado de la alta tasa metabólica de las bacterias acetógenas para producir este ácido a partir del butírico (que registró concentraciones bajas), ácido que a su vez, es transformado en ácido acético (Nielsen *et al.*, 2004; De Bok *et al.*, 2004; De Rubia *et al.*, 2005). A pesar de estos resultados, las concentraciones de ácido propiónico en ambos reactores no fueron factor relevante para desestabilizar los sistemas, puesto que se mantuvieron por debajo del límite tóxico establecido, menor a 3000 mg/l (Mata-Alvarez, 2002).

No obstante, a diferencia de los reactores industriales, la concentración de ácido acético en los lodos ORI y UAM está por debajo de la concentración alimentada, debido a que disminuye desde el inicio del experimento. No se observó ácido butírico en los dos reactores y, el ácido propiónico también desaparece en el lodo ORI. En consecuencia, no se observa disminución del coeficiente alfa.

De acuerdo a los reportes de la calidad de biogás (MgHugh *et al.* 2003; Roš y Drago, 2003) se observa un aumento en los días 150 para el lodo ORI y 98 para el lodo UAM, así como la disminución de AGV's y una óptima capacidad amortiguadora en los reactores, de lo cual podríamos esperar un buen funcionamiento de los sistemas. Sin embargo, la AME (principalmente hidrogenófila) es oscilante, aunque en el lodo UAM está dentro del estándar. Estas fuertes variaciones podrían ser debidas a que la sucesión de los grupos metanógenos del ecosistema termófilo no está terminada (Roš y Drago, 2003). Una posible explicación a la disminución de la concentración de AGV's con un bajo metabolismo de arqueobacterias es que las condiciones termófilas de estos reactores son propicias para que algún grupo de microorganismos anaerobios se desarrolle dentro del consorcio y utilice los AGV's como sustrato (Rintala y Lettinga 1992). Como sustento a tal afirmación, se ha reportado que algunas bacterias sulfatorreductoras pueden competir por el sustrato (incluyendo ácidos grasos) con bacterias homoacetógenas y metanógenas, utilizando compuestos orgánicos y sulfatos para producir ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) (Gutiérrez *et al.*, 2008). La presencia de las bacterias sulfatorreductoras podría explicar los bajos niveles de metano en el biogás, debido a que estos microorganismos indican la presencia de azufre (sulfato, sulfito o tiosulfato) en el reactor, compuesto tóxico para las arqueobacterias metanógenas, y provocaría la inestabilización de la metanogénesis. Moreno y colaboradores (2007) confirmaron que el ácido sulfhídrico en los reactores ocasiona una serie de problemas como la reducción en la cantidad y calidad del biogás, mal olor y toxicidad que eventualmente pueden llevar a la inhibición del proceso metanógeno.

### 7.1.2 Análisis bioquímico y fisicoquímico de un lodo mesófilo con un pretratamiento hipertermófilo.

De acuerdo al análisis estadístico aplicado a los datos obtenidos de AME (ANOVA $_{\alpha=0.05}$  de 3 vías), no existe evidencia estadística significativa que indique diferencias entre los tratamientos (Control, A, B y C) ( $p=0.36$ ). Por tal razón, a diferencia de Nielsen y colaboradores (2004), quienes observaron una mejora en la AME con un pretratamiento hipertermófilo, el efecto es el mismo si un lodo mesófilo es sometido a un pretratamiento de 75°C o si se le aumenta la temperatura directamente a 55°C. Se corroboró la tolerancia límite de temperatura previamente reportada para arqueobacterias de sistemas artificiales, que es hasta 75°C (Burak y Sherer, 2008). La hipertermofilia inactivó el metabolismo de las arqueobacterias metanógenas y la producción de CH<sub>4</sub> comenzó después de dos semanas de incubarse a 55°C, como se observa en las Figuras de calidad del biogás (CH<sub>4</sub>%) de los tratamientos.

Adicionalmente, se confirmó lo observado en el primer experimento: la AME acetoclástica e hidrogenófila son significativamente diferentes ( $p=0.00$ ). En la gráfica 5 se observa que la AME hidrogenófila es superior a la acetoclástica como resultado de la dominancia de las primeras en termofilia como se discutió anteriormente (Nielsen, *et al.*, 2004; Burak y Sherer, 2008). Se observó un incremento en la AME hidrogenófila a partir del primer mes, mientras que la AME acetoclástica no se recuperó y osciló en valores muy bajos (menor a 0.17). De acuerdo a los valores estándar de AME para lodos granulares (Noyola y Moreno, 1994), únicamente el valor de AME hidrogenófila de los tratamientos tiende a ajustarse a 0.5 gCH<sub>4</sub>.DQO/gSSV/d.

De acuerdo a la prueba Tuckey-Kramer $_{\alpha<0.05}$ , a pesar de que se registra un aumento constante de la AME de los tratamientos (la hidrogenófila principalmente), existe evidencia estadística de que a partir del primer mes no hay cambios significativos de tal valor ( $p=0.00$ ). En consecuencia, las AME hidrogenófila y acetoclástica son estadísticamente similares para los tiempos 1, 2.5 y 4 dentro de cada función. Los trabajos existentes sobre termofilia extrema se realizaron en un intervalo de 68-70°C, en el cual se observó que la metanogénesis disminuyó mientras que la actividad de las bacterias hidrolíticas y fermentativas no fue afectada (Ahring *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2004). En este experimento, la hipertermofilia (75°C) no afecta a los grupos funcionales de arqueobacterias metanógenas, hidrogenófilas y acetoclásticas, aunque a 75°C no se observa producción de CH<sub>4</sub>. Cabe mencionar que en el tratamiento A, en el primer mes, el aumento de la AME hidrogenófila ocurre a una velocidad mayor a la del control.

En cuanto a la concentración de AGV's, se observó que en los cuatro tratamientos (CONTROL, A, B y C) disminuyó a través del tiempo, a diferencia de lo reportado a altas temperaturas por Tatzuzawa y colaboradores (2006). Se ha reportado que en termofilia se favorece al crecimiento de arqueobacterias metanógenas termófilas, bacterias acidogénicas, acetógenas y sulfatorreductoras, aunque estas últimas no han causado problemas en la operación de los reactores (Hori *et al.*, 2006). Se piensa que la causa de la disminución de los AGV's (aún en los tratamientos donde no se produjo metano) es consecuencia de dos factores: la gran actividad metabólica de las bacterias fermentativas que probablemente no fueron afectada por las condiciones extremas de temperatura (Ahring *et al.*, 2001) y la competencia por sustrato entre bacterias sulfatorreductoras y arqueobacterias metanógenas hipertermófilas que podrían estar

presentes en el sistema (Moreno *et al.*, 2007), al igual que ocurrió en el primer experimento.

Aunque los AGV's disminuyen gradualmente durante el experimento, se confirmó lo observado en el primer experimento: la concentración de ácido acético fue superior que el ácido propiónico y butírico, en ese orden (y estos últimos se mantienen en bajas concentraciones durante toda la cinética). Este resultado es debido a que el ácido acético es formado por la degradación de los AGV's a través de dos vías metabólicas bacterianas que son poco afectadas por la hipertermofilia (como sucede con las bacterias OHPA): heterofermentadora y homoacetogénesis (Ahring, *et al.*, 2001; Cabirol *et al.*, 2003). De esta forma, los ácidos propiónico y butírico son intermediarios que dependen de la concentración del ácido acético (Madigan *et al.*, 2004).

El pH alcalino tiende a disminuir, a pesar que en el primer mes de termofilia alcanzó valores cercanos a 8.3. Al final del experimento, el pH del tratamiento CONTROL (el cual produjo metano después de los primeros catorce días de arrancar los reactores) alcanzó un valor de 7.81, el tratamiento A de 7.63, el del B de 7.48, mientras que el del tratamiento C (que estuvo más tiempo a hipertermofilia y no produjo metano) registró el pH más bajo en el último tiempo muestreado (7.35). Al relacionar el pH y la concentración de AGV's, se observó que ambos parámetros disminuyeron a partir del primer mes (contrario a lo que se esperaba, un pH elevado por la pérdida de ácidos grasos). Esto, junto con la nula producción de metano en hipertermofilia, es indicio que además de las bacterias homoacetógenas, las sulfatoredutoras y arqueobacterias extremófilas pueden estar presentes en los sistemas y competir por los AGV's como sustrato, para producir ácido sulfhídrico que lentamente acidificó el medio, tal como lo demuestra la disminución de pH (Gutiérrez *et al.*, 2007; Moreno, *et al.*, 2007). Sin embargo, este factor fue poco determinante para desestabilizar los tratamientos debido a que los cuatro tratamientos mantuvieron un buen equilibrio entre carbonatos y ácidos (grasos y probablemente sulfhídricos) puesto que el coeficiente alfa fue inicialmente de 0.83 y para el cuarto mes disminuyó a 0.50 (valor que es recomendable para el funcionamiento del consorcio) (Noyola *et al.*, 1993).

Conforme a los resultados fisicoquímicos de ambos experimentos, se observa que es importante mantener las condiciones óptimas reportadas (pH, coeficiente alfa y concentración de AGV's), para que las arqueobacterias metanógenas se aclimaten en un mes y su metabolismo comience a funcionar adecuadamente en condiciones termófilas (Angelidaki, 2003; Nielsen *et al.*, 2004).

## **7.2 Análisis de la diversidad arqueobacteriana durante la sucesión de mesofilia a termofilia.**

En los últimos años, la aplicación de las técnicas moleculares en el estudio de los sistemas de tratamiento de lodos residuales han permitido desarrollar avances importantes en el conocimiento de la ecología microbiana, fundamentalmente debido a que son una herramienta complementaria para el estudio de microorganismos de difícil aislamiento (Kirk *et al.*, 2004; O'Flaherty *et al.*, 2006).

Sin embargo, al igual que otras técnicas aplicadas a la investigación, existen limitantes que dificultan la representatividad de la comunidad microbiana total (Marzorati *et al.*, 2008). Primero, la extracción del ADN puede generar un sesgo, principalmente en el caso de las arqueobacterias, debido a que las propiedades de su envoltura celular hacen difícil la extracción de sus ácidos nucleicos (Leclerc *et al.*, 2004): la pared celular contiene pseudomureina que es un pseudopeptidoglucano resistente a algunas lisozimas y la membrana celular que contiene ácidos grasos con enlaces muy estables éter-glicerol (García *et al.*, 2000). En segundo lugar, el TGGE es una técnica cualitativa que genera perfiles de UTO's que representan únicamente a las poblaciones dominantes dentro de la comunidad (Leclerc *et al.*, 2004; Chouari *et al.*, 2005), aunque Muyzer y Smalla (1998) indican que esta técnica es capaz de detectar organismos que constituyan al menos el 1% de la comunidad total. Por último, la reacción de PCR puede generar artefactos como la formación de quimeras, moléculas heterodúplex o errores en la síntesis del ADN (Wang y Wang, 1997). También es importante el sesgo que origina la reacción de PCR.

### **7.2.1 Análisis de la diversidad arqueobacterias en cuatro lodos de diferente procedencia**

A pesar de que en los perfiles genéticos de los cuatro lodos anaerobios, no se observa una sucesión de UTO's en la comunidad de arqueobacterias de cada lodo, los resultados en esta investigación son importantes porque, de forma integral, complementan la información obtenida de los parámetros fisicoquímicos. De acuerdo al análisis del índice de riqueza ponderada ( $R_r$ ) propuesto por Marzorati y colaboradores (2008), se encontró que la mediana de la riqueza ponderada de los reactores es baja ( $M1=2.1$ ,  $M8=2.5$ ,  $ORI=1$  y  $UAM = 0.4$ ). Al analizar la DAM de los datos, se puede observar que no existe una diferencia significativa entre los lodos procedentes del mismo tratamiento  $M1$  y  $M8$ . Mientras que  $ORI$  es un lodo parecido a  $M8$  y  $UAM$ . El reactor  $M8$  tiene la DAM más alta porque estima la dispersión del número de UTO's que aparecen en los distintos tiempos. En este reactor se observa una clara tendencia secuencial hacia el aumento de UTO's (de 5 a 9).

De acuerdo a la clasificación propuesta por Marzorati y colaboradores (2008), la diversidad de la comunidad de arqueobacterias de los cuatro tratamientos es baja, se encuentra inferior a 10, y no se observa un cambio significativo en el tiempo, debido a que los valores obtenidos son inferiores a 2, lo cual corresponde a ambientes adversos o restringidos a colonización semejante a suelos contaminados, como es también el caso de las comunidades de arqueobacterias que interactúan en la digestión anaerobia termófila. Este resultado coincide con la conclusión de investigaciones realizadas en digestión anaerobia, en las cuales indican que la diversidad de las arqueobacterias es baja como consecuencia de su baja tasa metabólica (Van Lier, 1996; Konopka *et al.*, 1999; Ahring *et al.*, 2001; Angenent *et al.*, 2002; Moen *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004; Burak y Sherer, 2008). Con este análisis ( $R_r$ ), se observó que la mediana de la diversidad de arqueobacterias del lodo proveniente de la  $UAM$  ( $R_r=0.60$ ) es inferior al resto y a pesar de ello, alcanza los valores más altos de AME en termofilia (principalmente hidrogenófila) (Anexo 7). Por ello, no parece existir relación entre la diversidad microbiana y la actividad metabólica, en este caso para la producción de  $CH_4$ . Los factores fisicoquímicos pueden ser, así, determinantes en el funcionamiento del sistema como se discutió anteriormente (Angelidaki *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004). Sin embargo, para evaluar la robustez del TGGE es necesario aplicar otras

técnicas moleculares de huella génica (DGGE ó ARDRA) o bien, aplicar la técnica a una muestra con un número de especies conocido.

Con respecto a la estabilidad de la comunidad de arqueobacterias en el sistema, Apajalahti y colaboradores (2001) definen que en una comunidad microbiana donde nuevas especies arriban y superan en número a las originales (por unidad de tiempo), propiciarán un cambio en la estructura de la comunidad inicial por tal motivo será más dinámica y la estabilidad disminuirá. Los resultados obtenidos de los lodos estudiados indican que la comunidad arqueobacterias tiene una dinámica (Dy) tipo mediana a alta, debido a que las tasas de cambio son mayores al 13%. Este valor se caracteriza porque muchas poblaciones dominantes disminuyen y aumentan fluctuadamente dentro de la comunidad (Marzorati *et al.*, 2008); por el contrario a lo descrito por Ahring y colaboradores (2001), las poblaciones metanógenas disminuyen y son inestables como consecuencia de la termofilia (Angenent *et al.*, 2002; Burak y Sherer, 2008).

Al analizar el patrón de los perfiles obtenidos del TGGE para el Dominio *Archaea*, se observó que de los 11 UTO's determinados, cuatro (36.36%) tuvieron identidad con dos familias de metanógenas hidrogenófilas: Methanobacteriaceae (R6, R13, R14) y Methanomicrobiaceae (R16). Un único UTO (9% del total) tuvo identidad con Methanosaetaceae (R7), familia de metanógenas acetoclásticas. El 54.54% restante correspondió a seis UTO's de la familia Desulfurococcaceae, que son arqueobacterias hipertermófilas del *Phylum* Crenarchaeota (R1, R2, R4, R5, R9, R10). Las arqueobacterias hipertermófilas son un grupo anaerobio que tienen un crecimiento óptimo de 80-85°C (Hito, 2003) y su presencia tiene importantes implicaciones ecológicas en el sistema, puesto que ayudan a comprender el funcionamiento del consorcio y corroboran lo observado fisicoquímicamente, como se discutirá más adelante. Sin embargo, es necesario mencionar que la posición de los UTO's tiene un considerable nivel de incertidumbre, debido a que al calcular el árbol filogenético se crearon ambigüedades en las secuencias como consecuencia del tamaño pequeño de los fragmentos amplificados, lo que se sugiere la amplificación de un fragmento mayor del gen ADNr 16S para conocer la identidad real de los organismos.

Con respecto al grupo funcional de arqueobacterias metanógenas acetoclásticas, el UTO R7 (afín a *Methanosaeta*) se detectó únicamente en los tiempos 3.5 del reactor M8 y 7 meses de la UAM. En contraste con lo indicado por Sekiguchi y colaboradores (1998) y Chen y colaboradores. (2004), se observó que este grupo es muy sensible y su crecimiento se encuentra limitado por condiciones extremas, tales como el pH, concentración de AGV's, temperatura y, muy probablemente amoníaco y ácido sulfhídrico (Angenent *et al.* 2002; Tatsuzawa, *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007). La temperatura óptima de crecimiento, particularmente del género encontrado, *Methanosaeta*, está entre 30-50°C (Burak y Sherer, 2008). Por tal razón, la termofilia limita directamente el metabolismo y crecimiento de este grupo, provocando que disminuya la producción de metano (tal como lo indican los bajos valores de AME registrados en el experimento). En cuanto al pH, el género *Methanosaeta* tolera un intervalo de pH neutro que oscila entre 7 y 7.5 (Burak y Sherer, 2008): los reactores presentaron valores por arriba de este rango. La abundancia de *Methanosaeta* también disminuye cuando están sometidas a altas concentraciones de AGV's (Tatsuzawa *et al.*, 2006; Burak y Sherer, 2008), tal y como sucede en los reactores M1 y M8. Adicionalmente, en los lodos de los reactores ORI y UAM, a pesar de que la concentración de AGV's disminuye constantemente (en forma opuesta a los reactores



M1 y M8) podrían existir ácido sulfhídrico y amoníaco que repercutirían y afectarían al crecimiento de tal grupo.

Las arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas representan el 36.36% de los UTO's identificados, después de las arqueobacterias hipertermófilas (que representan el 54.54% dentro de la comunidad total). Se detectaron tres UTO's afines a la familia Methanobacteriaceae (R6, R13, R14) y uno a Methanomicrobiaceae (R16). De acuerdo con las investigaciones que se han realizado para arqueobacterias metanógenas, este grupo funcional tiene un intervalo óptimo de crecimiento de entre 35 y 70°C, aunque varía según el género (Cabirol *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; Burak y Sherer, 2008), y la familia Methanomicrobiaceae tiene un intervalo inferior (40°C). En la huella genética estudiada, la dominancia de este grupo de organismos sobre las metanógenas acetoclásticas coincide con los datos obtenidos de AME en termofilia, debido a que se observó una mayor actividad metanógena AME hidrogenófila que acetoclástica. Para el reactor M1, el UTO R6 aparece en todos los tiempos, microorganismo afín a Methanobacteriaceae y que, puede tolerar hasta 70°C y un pH alcalino. Mientras tanto, Methanomicrobiaceae (R16), organismo que tolera temperaturas moderadas y pH ligeramente ácido aparece en los meses 7 y 9. Este reactor no presenta (o no es posible detectarlas en él) arqueobacterias metanógenas acetoclásticas. Para el reactor M8, presenta UTO's poco definidos. En el mes 3.5 se detecta la presencia de *Methanosaeta*, que es un OTU interesante debido a que es el único género de arqueobacterias acetoclásticas que se detectaron en el experimento. Estos resultados son interesantes porque los lodos M1 y M8 provienen de la misma industria cervecera y los resultados fisicoquímicos son similares en ambos, por lo que se esperaría que los perfiles de cada uno tuvieran los mismos OTU's. Sin embargo, no es así. No se puede descartar la posibilidad de que la sensibilidad de la técnica TGGE y el sesgo citado anteriormente para la reacción de PCR no permitió reflejar la diversidad real de los reactores. Por su parte, el reactor ORI presenta en los dos primeros tiempos muestreados el UTO (R16) afín a Methanomicrobiaceae. Esta banda, intensa y definida, que su desaparece en el gel concordando con la aparición del UTO Methanobacteriaceae (R6, R13, R14) en el mes 3.5. Los perfiles del lodo UAM indican que los UTO's R13 y R14 (Methanobacteriaceae) están presentes en todos los tiempos, salvo en el tiempo 0.5 donde se observan UTO's difusos. *Methanosaeta* (R7) únicamente aparece en el tiempo 7.

Las bandas intensas de los reactores M1 y M8 nos podrían indicar mayor abundancia de las especies de la comunidad en comparación de los reactores ORI y UAM (Figura 15) y que existe una tendencia de los UTO's del lodo M1 a ser más abundantes en los últimos tiempos. Esto es debido a que, si no hay sesgo en la amplificación, la polimerasa duplica el ADN disponible en las muestras. Sin embargo, se debe tener cuidado con la interpretación de este dato, debido a que la intensidad podría representar el número de copias del gen dentro del organismo (Eguiarte *et al.*, 2007).

El estudio molecular corrobora que la mayor parte del metano producido en los lodos de los cuatro reactores proviene del metabolismo de las arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas (seis UTO's identificados que pertenecen a los géneros *Methanobacterium*, *Methanothermobacter*, y *Methanoculleus*) que corresponden al 36% de la comunidad total. Debido a que la termofilia y el pH limitan el metabolismo y crecimiento óptimo del grupo acetoclástico, la producción de metano es disminuida, tal como lo indican los valores de AME registrados en el experimento. Asimismo, este

hecho corrobora los resultados de los parámetros fisicoquímicos, en el cual, se piensa en la posibilidad de que el ácido acético es consumido por el metabolismo de bacterias homoacetogénicas, sulfatorreductoras y arqueobacterias no metanógenas como algunos autores han sugerido (Casslerly y Erijman, 2003; Moreno *et al.*, 2007).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, se observaron seis UTO's afines a la familia Desulfurococcaceae (que tienen un alto porcentaje de identidad con los géneros *Staphylothermus*, *Vulcanisaeta* y *Sulfolobus*), arqueobacterias hipertermófilas no metanógenas del filum *Crenarchaeota*, que tuvieron un alto porcentaje en la diversidad total (54.54%) y estuvieron presentes en todos los lodos (M1, M8, ORI y UAM). Este grupo es anaerobio obligado, el cual se ha reportado en ambientes con elevada temperatura y con pH óptimo de 5.5 a 7.5, como es el caso de las ventilas geotermiales (Hito, 2003). No existen reportes de la aparición de este grupo, por lo que la detección de dichos UTO's en el experimento puede ser un importante aporte para explicar algunas causantes de la inestabilidad del sistema.

La actual taxonomía basada en el gen ADNr 16S aceptada y validada por el Comité en Taxonomía de Metanógenas indica que existe una relación filogenética cercana entre la familia Methanosaetaceae y Methanomicrobiaceae, mientras que Methanobacteriaceae es la familia más alejada (cluster II, III y IV de la Figura 16) (García *et al.*, 2001). Los UTO's R7 (*Methanosaeta*) y R16 (*Methanoculleus*) tienen identidad con el cluster II, sin embargo, los algoritmos que se usaron para la construcción del árbol filogenético los agrupó con los UTO's R9 y R10 (familia Desulfurococcaceae, arqueobacterias no metanógenas cercana al cluster I). Los UTO's R6, R13 y R14 (familia Methanobacteriaceae) y R1, R2, R4, R5 (familia Desulfurococcaceae) son agrupados en un cluster cercano al IV (Methanobacteriaceae). El agrupamiento de los UTO's con diferente identidad podría ser resultado del alto número de sitios de coincidencias entre las secuencias de los nucleótidos, cuyo cálculo se realizó con la matriz de distancias (método *Neighbour-Joining*) y la frecuencia de alineamientos del bootstrap. Estas ambigüedades en las secuencias de nucleótidos puede ser resultado del pequeño tamaño del amplicon (150 pb) con el cual se trabajó. Por tal motivo, los UTO's obtenidos en el gel de TGGE quedaron excluidos de los principales grupos del árbol. Para resolver este problema y conocer la identidad real de los organismos procedentes de los reactores se deben diseñar cebadores universales de *Archaea* que amplifiquen una secuencia de mayor tamaño del ADNr 16S que corra en el TGGE (de 600 pb. aprox.) y que amplifiquen más de una región variable del gen ADNr 16S (Schmalenberger *et al.*, 2001).

Los UTO's afines a la familia Desulfurococcaceae aparecen en el reactor M1 gradualmente (R9 y R10), mientras que en el reactor M8 son los UTO's R1, R2 y R4. Para el caso de los lodos del reactor ORI, los UTO's R1 y R2 sólo aparecen en el primer tiempo muestreado, mientras que la R5 aparece en el último tiempo. Por último, en el lodo UAM, aparecen gradualmente los UTO's R4, R5, R13 y R14. Como se mencionó anteriormente, las arqueobacterias hipertermófilas aparecen constantemente en los perfiles de TGGE de todos los lodos. Este resultado es un indicativo de que se indujeron las condiciones necesarias para el desarrollo de estos microorganismos dentro del consorcio microbiano. Es de suponer que la presencia de este tipo de arqueobacterias nos revela la presencia de azufre (S<sub>2</sub>), un problema muy grave que induce la inestabilidad de la digestión anaerobia, debido a que esta molécula es propiciadora de fallas por su alta toxicidad para las arqueobacterias metanógenas (Hori *et al.*, 2006;

Moreno *et al.* 2007). No debe descartarse la posibilidad que tanto arqueobacterias hipertermófilas como bacterias sulfatorreductoras utilicen el S<sub>2</sub> como aceptor de electrones y que, junto a componentes orgánicos (como AGV's) formen ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) (Perevalova *et al.* 2005). Si éste fuera el caso, en los cuatro reactores, los AGV's disminuirían, a pesar de la baja producción de metano. La evidencia molecular acerca de que microorganismos dependientes de S<sub>2</sub> se desarrollaron en los lodos y compitieron por el sustrato, explicaría la disminución de los AGV's y la producción de ácido sulfhídrico, lo cual fue una de las posibles causas de la inestabilidad del consorcio (Hori *et al.*, 2006).

La diversidad microbiana resultante en el presente experimento se explicaría porque el grupo funcional de arqueobacterias metanógenas acetoclásticas sería el principal afectado en termofilia, debido a que la temperatura óptima de crecimiento de este grupo puede ser restringida (dependiendo de la especie) (Van Lier, 1996; Nielsen *et al.*, 2004), mientras que el de las arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas es más alto (Burak y Sherer, 2008). A su vez, la concentración de amoníaco, ácido sulfhídrico y AGV's podrían causar inestabilidad en los sistemas y disminución en la AME. El seguimiento completo de dichos elementos permitiría confirmar su papel en la inestabilidad observada.

El bajo número de UTO's de arqueobacterias metanógenas acetoclásticas se relacionaría con la baja abundancia de la población y disponibilidad de ADN para la amplificación por PCR, de acuerdo a lo mencionado anteriormente. Los datos obtenidos son, por lo tanto una aproximación y estimación de la diversidad parcial de la comunidad microbiana (Leclerc *et al.*, 2004).

### **7.2.2 Diversidad arqueobacteriana en un lodo anaerobio vía un pretratamiento hipertermófilo.**

De acuerdo a la huella genética obtenida, no se observa una sucesión de UTO's en la comunidad de arqueobacterias de los tratamientos. Estos resultados son importantes porque ratifican los resultados obtenidos en el primer experimento, particularmente con los lodos de la UAM. Conforme al análisis del índice de riqueza ponderada ( $R_r$ ) se observó que este valor es bajo en los cuatro tratamientos (CONTROL=1.03, A=0.50, B=0.31, C=0.84), por lo que de acuerdo a la gran varianza y desviación estándar de los datos (Tabla 19) no existe una diferencia significativa entre el resultado de cada tratamiento, lo que a su vez es consistente con los resultados del reactor UAM del primer experimento. Este resultado corresponde a  $R_r < 10$ , valor que está relacionado con ambientes adversos, como es la digestión anaerobia termófila (Van Lier, 1996; Konopka *et al.*, 1999; Angenent *et al.*, 2002; Burak y Sherer, 2008; Marzorati *et al.*, 2008). Estos valores confirman, como se discutió anteriormente, que la baja diversidad no necesariamente se correlaciona de forma directa con la tasa metabólica de las arqueobacterias (Van Lier, 1996; Konopka *et al.*, 1999; Ahring *et al.*, 2001; Angenent *et al.*, 2002; Moen *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004; Burak y Sherer, 2008).

Con respecto a la estabilidad de la comunidad de las arqueobacterias en el sistema, los resultados obtenidos indican que la comunidad tiene una dinámica ( $D_y$ ) mediana a alta, debido a que las tasas de cambio son igual o mayores al 13% (Figura 22), valor que es

contrario al obtenido en el primer experimento con el mismo lodo de la UAM. El tratamiento hipertermófilo provoca un aumento de la dinámica, por lo tanto una disminución de la estabilidad del consorcio. Algunos autores encontraron que es posible aumentar la diversidad de las arqueobacterias al aumentar la temperatura a 65°C, y en consecuencia conseguir un aumento de la dinámica microbiana (Ahring *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2004). Sin embargo, la actividad de las arqueobacterias metanógenas es afectada, mientras que la de las bacterias puede desarrollarse. El aumento en la dinámica microbiana en los tratamientos indica que la hipertermofilia afectó a la estabilidad microbiana, sin afectar como tal la actividad metanógena. Sin embargo, no fue suficientemente fuerte como para desplazar a las especies dominantes. Por el contrario, el control de pH, concentración de AGV's y la capacidad amortiguadora sí son factores que determinan la estabilidad de operación y la presencia de las poblaciones metanógenas dominantes (Angelidaki *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2004).

De acuerdo al patrón de bandas del TGGE, se obtuvieron ocho UTO's con una similitud significativa con secuencias contenidas en NCBI, de las cuales el 37.5% correspondió a la familia Methanobacteriaceae (R6, R13, R14), el 14.28% a la familia Methanomicrobiaceae (R16), que comprende arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas, y el 57.14% a arqueobacterias hipertermófilas no metanógenas pertenecientes a la familia Desulfurococcaceae (R1, R4, R5, R9). Cabe mencionar que no se encontró algún UTO relacionado con el grupo funcional de arqueobacterias metanógenas acetoclásticas, tal hecho ratifica que este grupo funcional es el más sensible dentro del consorcio, como se observó en el anterior experimento (Van Lier, 1996; Nielsen *et al.*, 2004; Burak y Sherer, 2008). De todas formas, y como también se mencionó anteriormente, el árbol filogenético presenta ambigüedades y no es posible precisar la verdadera identidad de los UTO's; para resolverlo será necesario amplificar un fragmento de mayor tamaño del ADNr 16S para conocer con más precisión la identidad del organismo.

Dentro del grupo de arqueobacterias metanógenas, los UTO's que aparecen constantemente en los cuatro tratamientos son R6 y R13, afines a Methanobacteriaceae, mientras que R16 (Methanomicrobiaceae) sólo aparece como banda tenue en el primer mes del tratamiento A y C. Estas familias son reportadas en diversos trabajos las como dominantes en la comunidad anaerobia (Godon *et al.*, 1997; Sekiguchi *et al.*, 1998; Leclerc *et al.*, 2004; Tatsuzawa *et al.*, 2006), y su estabilidad en termofilia depende de su rango óptimo de temperatura (Burak y Sherer, 2008). En cuanto a los UTO's afines a la familia Desulfurococcaceae (R1, R5 y R6) aparecen constantemente en cada tratamiento y el UTO R9, afín a *Staphylothermus marinus*, aparece únicamente en los tiempos muestreados del tratamiento C (el cual estuvo expuesto a 75°C durante todo el experimento).

La baja diversidad de arqueobacterias contenida en los reactores no es factor que afecte el buen funcionamiento de cada tratamiento en termofilia (55°C). Por el contrario, se observó que aunque se determinaron pocos UTO's de arqueobacterias metanógenas, se alcanzó una estabilización metabólica en el primer mes después que se colocaron en condiciones termófilas, como resultado a que las condiciones fisicoquímicas estuvieron controladas dentro de los intervalos óptimos de las actividades metabólicas de estos organismos (Angelidaki, *et al.*, 2003; Nielsen, *et al.*, 2004). Los factores más importantes que afectan a este grupo son el pH y la concentración de ácidos grasos volátiles que deben estar dentro de los límites de tolerancia. En ese sentido, las

arqueobacterias hipertermófilas y sulfurosas encuentran condiciones menos favorables para competir por el sustrato e inestabilizar el sistema, tal y como sucedió en el primer experimento (Griffin *et al.*, 1997; Casserly *et al.*, 2003).

El hecho que los UTO's R6, R13 y R14 (metanógenas) aparezcan como bandas fuertes y constantes en los perfiles nos indica estabilidad de estas especies en la comunidad. Es muy probable que estas especies sean las que producen la mayor parte del metano en los reactores. Sin embargo, se debe tener cuidado con la interpretación, debido a que la intensidad podría representar el número de copias del gen dentro del organismo y no su real abundancia como se mencionó anteriormente (Eguiarte *et al.*, 2007).

## 8. CONCLUSIONES

Se caracterizó parcialmente la comunidad de arqueobacterias de lodos anaerobios durante el arranque en termofilia con seguimiento fisicoquímico y la técnica molecular PCR-TGGE. Con base en los resultados experimentales se concluyó lo siguiente:

Con un buen control fisicoquímico es posible obtener en un mes un lodo termófilo con un aumento directo de temperatura a 55°C, sin necesidad de un pretratamiento.

La Actividad Metanógena Especifica confirma que en la digestión anaerobia termófila predominó la actividad de las arqueobacterias metanógenas hidrogenófilas sobre la acetoclástica.

A 75°C la actividad metabólica de las arqueobacterias metanógenas es silenciada, mientras que la de algunas bacterias y arqueobacterias hipertermófilas puede presentarse, compitiendo por sustrato.

La presencia de los tres géneros representantes hidrogenófilos (*Methanobacterium* sp. *Methanothermobacter* sp. y *Methanoculleus* sp.) por solo un género acetoclástico (*Methanosaeta harundinacea*) corrobora que en condiciones termófilas el grupo funcional hidrogenófilo predomina en el consorcio de arqueobacterias metanógenas.

La estabilidad metabólica de la comunidad de arqueobacterias depende de los parámetros fisicoquímicos y no de la diversidad de los consorcios presentes en los lodos.

Se detectó una alta presencia de arqueobacterias hipertermófilas de la familia Desulfurococcaceae, que no se han reportado en sistemas anaerobios y que pueden ser organismos desestabilizadores del arranque de un sistema termófilo anaerobio.

La técnica molecular PCR-TGGE es una excelente herramienta en los estudios de diversidad en muestras ambientales, como una alternativa para el estudio de microorganismos no cultivables.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Ahring, B. 1995. Methanogenesis in thermophilic biogas reactors. *Antonie van Leeuwenhoek*. **67**: 91-102.
  
- Ahring, B.; Ibrahim, A. A. y Mladenovska, Z. 2001. Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Res.* **35** (10): 2446-2452.
  
- Amend, J.P. y Shock, E.L. 2001. Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 175-243.
  
- Angelidaki, I.; Ellegaard, L. y Ahring, B. K. 2003. Applications of the anaerobic digestion process. *Adv. Bio. Eng. Biotech.* **82**: 1-10.
  
- Angenent, L. T.; Sung, S. y Raskin, L. 2002. Methanogenic population dynamic during start-up of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Res.* **36**: 4648-4654.
  
- Apalajahti, J.; Kettunen, A.; Bedford, M. R. y Holben, W. E. 2001. Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5656-5667.
  
- APHA. 1995. Standard methods. 19th edition. American Public Health Association, Washington, DC.
  
- Arango Restrepo, P.; Briceño, I.; De Castro, P.; Díaz-López, M.; Fruhbeck, G. Gómez-Ambrosi, J. y Iwasaki, T. 2005. Fundamentos moleculares. Bogotá, Universidad de La Sabana. 348 pag.
  
- Atlas, R. y Bartha, R., 1998. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Ed. Pearson educación. Madrid, España. pp. 669.
  
- Barber, R.D. y **Ferry; J.G.**. 2001. Methanogenesis Ecology. *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group. John Wiley and Sons. London.
  
- Batstone, D.; Keller, J.; Angelidaki, I.; Kalyuzhnyi, S.; Pavlostathis, S.; Rozzi, A.; Sanders, W.; Siegris, H. y Vavilin, V. A. 2002. The IWA anaerobic digestion model No 1 (ADM1). *Water Sci. Technol.* **45** (10): 65-73.
  
- Beltrame, K. G.; Aloisi, R. R.; Vitti, G. C. y Boluda, R. 1999. Compostaje de un lodo biológico de la industria cervecera con aireación forzada y virutas de eucalipto. *Edafología*. **6**: 85-93
  
- Beveridge, T. J. y Schultze-Lam S. 1996. The response of selected members of the *Archae* to the Gram stain. *Microbiology*. **142**: 2887-2895.

- Boone, D.R. y Garrity, G. 2001.. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. Springer Verlag. New York. Tome 1. 721 pp.
- Brosius, J.; Palmer, M.; Kennedy, P. y Noller, H. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **75**: 4801-4805.
- Burak, D. y Scherer, P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. **7**: 173-190.
- Cabirol, N.; Rojas-Oropeza, M. y Noyola, A. 2002. Removal of helminth and fecal coliform by anaerobic thermophilic sludge digestion. Water Sci. Technol. **45** (10): 269-274.
- Cabirol, N.; Fernández, F. J.; Mendoza, L. y Noyola, A. 2003. Acclimation of mesophilic anaerobic sludge to thermophilic conditions: PCR detection methodology. Water Sc. Technol. **48** (6): 81-86.
- Campos Pozuelo, E. 2001. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Tesis Doctoral. España. Universidad de Lleida. 394 págs.
- Casserly, C. y Erijman, L. 2003. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. Internat. Biodeter. Biodegra. **52**: 7-12.
- Chen, C.L.; Macarie, H.; Ramirez, I.; Olmos, A.; Ong, S.L.; Monroy, O. y Liu, W.T. 2004. Microbial community structure in a thermophilic anaerobic hybrid reactor degrading terephthalate. Microbiol. **150**: 3429-3440.
- Chouari, R.; Le Paslier, D.; Daegelen, P.; Ginestet, P.; Weissenbach, J. y Sghir, A. 2005. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. Environ. Microbiol. **7**: 1104-1115.
- De Bok F.; Plugge, C. y Stams, A. 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. Water Res. **38**: 1368-1375.
- De la Rubia, M. A.; Romero, L. I.; Sales, D. y Pérez, M. 2005. Temperature conversión (mesophilic to thermophilic) of municipal sludge digestion. AICHE J. **51** (9): 2581-2593.
- Duineveld, B.; Kowalchuk, G.; Keijzer, A. y Van-Elsas, J. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragment coding for 16S RNA. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 172-178.
- Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginsky, L (editores). 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ed. INTA. Argentina. En <http://www.argenbio.org/h/biblioteca/libro.php>



- Eguiarte, L.; Souza, V. y Aguirre, Xitlali (editores). 2007. Ecología Molecular. INE. México. 594 pag.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1996. A plain english guide to the EPA part 503 biosolids rule. USA.
- Ferry, J. G. 1992. Methane from acetate. *J. Bacteriol.* **174** (17): 5489- 5495
- Ferry, J. G. 1993. *Metanogenesis: Ecology, physiology, biochemistry and genetics.* Ed. Chapman and hall. New York. pp. 536.
- Franklin, R.J. 2001. Full-scales experiences whit anaerobic treatment of industrial wastewater. *Water Sci. Tech.* **44**:1-6.
- Foerstner, K. U.; Von Mering, C.; Hooper, S. D. y Bork, P. 2005. Environments shape the nucleotide composition of genomes. *EMBO Rep.* **6**: 1208- 1213.
- Fournier, G. P. y Gogarten, J. P. 2008. Evolution of acetoclastic methanogenesis in *Methanosarcina* via horizontal gene transfer from celullolytic *Clostridia*. *J. Bacteriol.* **190** (3): 1124-1127.
- García, J. L.; Patel, B. K. C. y Olivier, B. 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*. *Anaerobe.* **6**: 205- 226.
- García-Chavez, M. y Díaz-Baez, M. C. 2003. Evaluating brewery wastewater toxicity using a methanogenic activity inhibition test. *Rev. Col. Biotecnol.* **5**(2): 23-31
- Godon, J.; Zumstein, E.; Dabert, P.; Habouzit, F. y Moletta, R. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2802-2813.
- Gutiérrez, O.; Mohanakrishnan, J.; Raj, K.; Meyer, R.; Keller, J. y Zhiguo, Y. 2008. Evaluation of oxygen injection as a means of controlling sulfide production in a sewer system. *Water Res.* **42** (17): 4549-4561
- Griffin, M. E.; McMahon K. D.; Mackie, R. I. y Raskin, L. 1997. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnol. Bioeng.* **57** (3): 342-355.
- Hito, Takashi. 2003. Taxonomy of nonmethanogenic hyperthermophilic and related thermophilic *Archaea*. *J. Biosci. Bioeng.* **96** (3):203-212.
- Hori, T.; Haruta, S.; Ueno, Y.; Ishii, M. y Igarashi, Y. 2006. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (2):1623-1630.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática de México, INEGI. 2004. Censo Económico 2004 . México.

- Kim, M.; Ahn, Y. H. y Speece, R. E. 2002. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion: mesophilic vs. thermophilic. *Water Res.* **36**: 4369-4385.
- Kim, M.; Gomec, C. Y.; Ahn, Y. y Speece, R. E. 2003. Hidrolysis and acidogénesis of particulateorganic material in mesophilic anaerobic digestion. *Environ. Technol.* **24**: 1183-1190.
- Kirk, J.L.; Beaudette, L.A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J.N.; Lee, H. y Trevors, J.T. 2004. **Methods** of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods.* **58**: 169-188
- Konopka, A.; Zakharova, T. y LaParra, T.M. 1999. Bacterial function and community structure in reactors treating biopolymers and surfactants at mesophilic and thermophilic temperatures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 127-132.
- Kortenkamp, A.; Casadevall, M.; Faux, S.P.; Jenner, A.; Shayer, R.O.J.; Woodbridge, N. y O'Brien, P. 1996. A role for molecular oxygen in the formation of DNA damage during the reduction of the carcinogen chromium (VI) by glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **329** (2): 199-208.
- Leclerc, M.; Delgènes, J. P. y Godon, J. J. 2004. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environ. Microbiol.* **6**: 809-819.
- Liu, Y. y Whitman, W. 2008. Metabolic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic archaea. *Ann. New York Acad. Sci.* **1125**: 171-189.
- Lue-Hing, C.; Zens, D. R.; Tata, P.; Kuchenrither, R.; Malina, J. F. y Sawyer, B. 1998. *Municipal Sludge Management: A reference text on processing, utilization and disposal.* Second edition. Technomic Publishing. USA. págs.790.
- Madigan, M.T.; John M. y Parker, Jack. 2004. *Brock: Biología de los microorganismos.* 10a Edición. Prentice Hall., España. 984 págs.
- Martin-Laurent, F.; L. Philippot, S.; Hallet, R.; Chaussod, J.C. y G. Soulas. 2001. ADN Extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(5):2354-2359.
- Mata-Alvarez, J. 2002. *Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes.* IWA Publishing. 336 pags.
- Marzorati, M.; Wittebolle, Lieven; Boon, Nico; Daffonchio, Daniele y Verstraete, Willy. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol.* **10**(6): 1571-1581.
- McCarty, P. L. 2001. The development of anaerobic treatment and its future. *Water Sci. Tech.* **44** (8): 149-156.

- McHugh, S.; O'reilly, C.; Mahony, thérèse; Colleran, M. y O'flaherty, V. 2003. Rev. Environ. Sci. Biotech. **2**: 225-245.
- Mendoza-Sánchez Lucila. 2004. Seguimiento de bacterias metanógenas durante la aclimatación de un lodo anaerobio mesófilo a condición termófila. Tesis de Maestría. México. UNAM. 78 págs.
- Merkel, W.; Manz, W.; Szewzyk, U. y Krauth, K. 1999. Population dynamics in anaerobic wastewater reactors: modelling and *in situ* characterization. Water Res. **33**: 2392-2402.
- Metcalf y Eddy. 1996. Ingeniería de aguas residuales: Tratamiento, vertido y reutilización. Tercera edición. Segundo tomo. McGraw-Hill. pp. 753-1485.
- Moen, G.; Stensel, H. D.; Lepistö, R. y Ferguson, J. 2003. Effect of solid retention time on the performance of thermophilic and mesophilic digestion. Water Environ. Res. **75**: 539-548.
- Mogens-Henze, M.; Van Loosdrecht y Ekama, G. 2008. Biological wastewater treatment : principles, modelling and design. Edit. IWA. London. 511 págs.
- Montalvo, S. y Guerrero, L. 2003. Tratamiento anaerobio de residuos. Universidad Técnica de Santan María, Valparaíso. Chile, 413.
- Moreno, G.; Moreno, J. y Buitrón, G. 2007. Aclimatación de un inoculo sulfato reductor para la eliminación de sulfatos en un reactor discontinuo anaerobio. Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, Desarrollo y Práctica. **1**(2): *on line*. <http://www.metrik.cl/aidis/?p=495>
- Muyzer, G. y 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.
- Neefs, J.C., Van de Peer, Y., Hendriks, L. y De Wachter, R. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequence. Nucl. Acids. Res. **18** (supp.): 2237- 2317.
- Nielsen, H.B., Mladenovska, Z., Westermann, P. y 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. Biotechnol. Bioeng. **86** (3): 291-300.
- Nomanbhay, S. M. y Palanisamy, K. 2005. Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal. J. Biotechnol. **8** (1): 43-53.
- Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002. Protección ambiental.- Lodos y biosólidos.- Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. 15 de agosto del 2003. *Diario Oficial de la Federación*. pp. 18-60.
- Noyola, A., Moreno, G., Espinosa, A. y Briones, R. 1993. Tratamiento anaerobio de aguas residuales. Curso elaborado para IMTA. Instituto de Ingeniería. UNAM. México.

- Noyola, A. y Moreno, G. 1994. Granule production from row waste activated sludge. *Wat. Sci. Technol.* **30**(12): 339-346.
- O'Flaherty, V.; Collins, G.; Kavanagh, S.; McHugh, S; Connaughton, S.; Kearney, A.; Rice, O.; Carrigg, C.; Scully, C.; Bhreathnach, N.; Mahony, T.; Madden, P. y Enright, A. M. 2006. Accessing the black box of microbial diversity and ecophysiology: recent advances through polyphasic experiments. *J. Environ. Sci. Health Tox Hazard Subst Environ Eng.* **41**: 897-922
- **Perevalova, A.; Svetlichny, V.; Kublan, I.; Chernyh, N.; Kostrikina, N.; Tourova, T.; Kuznetsov B. y Bonch-Osmolovskaya E. 2005** *Desulfurococcus fermentans* sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon from a Kamchatka hot spring, and emended description of the genus *Desulfurococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 995-999.
- Rasche, M. y **Ferry, J.** 2005. Molecular biology of methanogens and the archaeobacteria. *Encyclop. Mol. Cell Biol. Mol. Med.* Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. Weinheim. 237-261 págs.
- Rimkus, R.; Ryan, J. y Cook, E. 1982. Full scale thermophilic digestion at the west-southwest sewage treatment works, Chicago. *J. Water Poll. Control Fed.***54**: 1447-1457.
- Rintala, J. y Lettinga, G. 1992. Effects of temperature elevation from 37 to 55°C on anaerobic treatment of sulphate rich acidified wastewaters. *Environ. Technol.* **13**: 801-812.
- Rodicio M. y Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc. Microbiol. Clin.* **4**:238-45.
- Rojas-Oropeza, M. 2001. Remoción de patógenos y parásitos (coliformes fecales y huevos de helmintos) durante el tratamiento de lodos por digestión anaerobia bajo condiciones de mesofilia y termofilia. Tesis de Licenciatura. Mexico. UNAM. 91 págs.
- Roš, M. y Drago, G. 2003. Thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge. *Acta Chim. Slov.* **50**: 359-374.
- Sallys, P.J. y Uyanik, S. 2003. Granule development in a split-feed anaerobic baffled reactor. *Biores. Tech.* **89**:255-265.
- Sambrook, J. y Russell, D. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold spring harbor laboratory press. New York. **2**: 763 págs.
- Schmalenberger, A.; Schwieger, F. y Tebbe C. 2001. effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (8):3557-3563

- Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Syutsubo, K.; Ohashi, A.; Harada, H. y Nakamura, K. 1998. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*. **144**: 2655-2665.
- Shmidt, J. E. y Ahring, B. K. 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 229-246.
- Song, Y. C.; Kwon, S. J. y Woo, J. H. 2004. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic- and thermophilic digestion of sewage sludge. *Water res.* **38**: 1653-1662.
- Sørensen, A. H. y Ahring, B. 1993. Measurements of the specific methanogenic activity of anaerobic digester biomass. *Appl. Microbiol. Biotech.* **40**: 427-431.
- Tatsuzawa, T.; Hao, L.; Ayame, S.; Shimomura, T.; Kataoka, N. y Milla, A. 2006. Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic methanogenic sludge treating paper-containing solid waste. *Water Res.* **54**(9): 113-119.
- Van de Peer, Y.; Chapelle, S. y De Wachter, R. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucl. Acids Res.* **24**: 3381-3391.
- Van Lier, J.B. 1996. Limitations of thermophilic anaerobic wastewater treatment and the consequences for process design. *Antonie van Leeuwenhoek.* **69**:1-14.
- Vavilin, V.A.; Fernández, B.; Palatsi, J. y Flotats, X. 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Managem.* **28**: 939-951.
- Visser, F.A.; Van Lier, J.B.; Macario, A.J.L. y De Macario, E.C. 1991. Diversity and population dynamics of methanogenic bacteria in a granular consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1728-1734.
- Wang, G. y Wang C-Y. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4645-4650.
- Winkler, M. 1996. Tratamiento biológico de aguas de desecho. Editorial Limusa. México. 337 págs.
- Wittebolle, L.; Boon, N.; Vanparys, B.; Heylen, K.; De Vos, p. y Verstraete, W. 2005. Failure of the ammonia oxidation process in two pharmaceutical waste treatment plants is linked to shifts in the bacterial communities. *J. Appl. Microbiology.* **99**: 997-1006.
- Woese, C.; Magrum, L. y Fox, G. 1978. Archaeobacteria. *J. Mol. Evol.* **11**:245-252.
- Wu, J.H.; Liu, W.T.; Tseng, I.C. y Cheng, S.S. 2001. Characterization of microbial consortia in a terephthalate degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiol.* **147**: 373-382.

- Zebranska, J.; Dohanius, M.; Jenicek, P. y Kutil, J. 2000. Thermophilic process and enhancement of excess activated sludge degradability-two ways of intensification of sludge treatment in Prague central wastewater treatment plant. *Water Sci. Technol.* **73**:265-272.

## ANEXO 1.

### MEDIO MINERAL

COMPOSICIÓN DEL MEDIO GENERAL (1000 ml)	
Solución mineral 1	50 ml
Solución mineral 2 (con sulfatos)	--
Solución mineral 2 (con cloruros)	50 ml
Solución de oligoelementos	10 ml
Solución de vitaminas	10 ml
Resazurina (0.1% p/v-agua dest.)	1.0 ml
Extracto de levadura	1.0 g
Peptona de caseína	1.0 g
Acetato de sodio	--
Bicarbonato de sodio	3.0 g
Solución de FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (0.2% p/v-agua dest.)	1.0 ml
Solución de NiCl <sub>2</sub> (5 mg/100 ml)	10 ml
Cisteína	0.5 g

#### PROCEDIMIENTO:

- Calcular el volumen aproximado de medio que se requiere, cada botella debe tener 16 ml de medio.
- Calcular los volúmenes y pesos necesarios de cada reactivo y solución a utilizar.
- Mezclar los reactivos y soluciones, excepto la cisteína, en un matraz Erlenmeyer de capacidad adecuada para el volumen de medio a preparar, se recomienda:
  - Para volúmenes entre 400 - 600 ml, matraces de 1000 ml
  - Para volúmenes entre 150 - 350 ml, matraces de 500 ml
  - Poco comunes serán volúmenes menores a 100 ml, matraces de 250 ml.
- Agregar agua destilada en un exceso de aproximadamente un tercio del volumen a preparar, disolver y mezclar perfectamente, el medio presentará una coloración azul.
- Poner a ebullición el medio en una parrilla caliente hasta que presente coloración violeta ligero a rosa intenso y el medio llegue a la cantidad deseada. Enfriar con hielo y agregar la cisteína. Distribuir 16 ml de medio en cada botella con ayuda del dosificador.
- En la rampa de gases, cambiar la atmósfera con la mezcla de N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80%-20%) de cada botella durante 3 minutos.
- Esterilizar en autoclave durante 15 min. con una presión de 15 psi y a 120°C.

## ANEXO 2

### ACTIVIDAD METANOGENA ESPECÍFICA

Medición de los SSV de cada lodo cada vez que se realiza una AME para conocer la cantidad de ácido acético (sustrato) que se adiciona a las botellas serológicas.

- En la cámara anaerobia, a las botellas serológicas se les agregó 4 ml de lodo, 16 ml de medio general y la cantidad de ácido acético calculado ó Hidrogeno a presión de 15 psi (mezcla H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>, 80-20%).
- Incubar a 55°C las botellas por triplicado durante el tiempo que dura la prueba
- Extraer biogas de la botella e inyectar periódicamente 0.5 ml de biogas en el cromatógrafo de gases.
- Encontrar el momento en que se produce mayor cantidad de CH<sub>4</sub>
- Realizar una curva de estándar para conocer el número de moles de CH<sub>4</sub>. Tal curva se usara para calcular la producción real de este biogás.
- Extrapolar la curva estándar con el CH<sub>4</sub> producido en las botellas para calcular el número de moles. Multiplicar el valor con un factor de corrección para obtener el número de moles totales. El numero de moles totales se Grafica VS tiempo para conocer la velocidad máxima de producción de metano (Vmax). Por último, se correlaciona la Vmax con los SSV de la botella y se multiplica por el número oxidación del metano y el peso molecular del oxígeno para obtener el valor de Actividad Metanógena Especifica (gCH<sub>4</sub>-DQO/gSSV/d) para cada sustrato.



### ANEXO 3.

#### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA *ARCHAEA* (CULTIVOS PUROS) (CABIROL *ET AL.*, 1998)

- Centrifugar 20 ml de muestra a 7500 rpm durante 30 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 5 ml de solución amortiguadora (*buffer*) TEN (Tris/EDTA/ NaCl) pH 8.0.
- Agregar 500  $\mu$ l de SDS al 20% (concentración final del 2%) y 50  $\mu$ l de mercaptoetanol (concentración final de aproximadamente el 1%).
- Congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  ( $\text{N}_2$  líquido o hielo seco con etanol) y descongelar a  $65^{\circ}\text{C}$ , repetir este ciclo 3 veces.
- Agregar proteinasa K (concentración final de 50–100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) e incubar a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 2 ó 3 horas.
- Purificar adicionando fenol neutro en una proporción 1:1 v/v (6 ml muestra + 6 ml de fenol), mezclar suavemente y centrifugar a 3000 rpm durante 5 min.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio y adicionar fenol neutro, en las mismas condiciones, mezclar y centrifugar. Repetir 4 ó 5 veces este paso.
- Adicionar un volumen igual de fenol/cloroformo-alcohol isoamílico 1:1 v/v, mezclar y centrifugar a 3000 rpm durante 5 min.
- Recuperar el sobrenadante y agregar 2  $\mu$ l de ARNasa (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , concentración final), incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.
- Agregar 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 0.25 volúmenes de acetato de sodio (3 M, pH 7.2), congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante por lo menos 2 horas.
- Centrifugar a 8000 rpm durante 15 min. Adicionar un volumen igual de etanol al 70% para lavar el ADN, centrifugar a 7500 rpm durante 5 min.
- Recuperar el ADN del cultivo (todo lo visible) en 100  $\mu$ l de agua en un tubo Eppendorf estéril, agregar 50  $\mu$ l de agua, hasta un volumen final de 150  $\mu$ l.
- Precipitar nuevamente con 2.5 volúmenes de etanol al 100% y 0.25 volúmenes de acetato de sodio (3 M, pH 7.2), refrigerar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un mínimo de 2 horas. Centrifugar a 8000 rpm durante 15 min. Adicionar un volumen igual de etanol al 70% para lavar el ADN, centrifugar a 7500 rpm durante 5 min.
- Resuspender el ADN en 50  $\mu$ l de TE a  $4^{\circ}\text{C}$  durante por lo menos 1 hora.
- Cuantificar el ADN por espectrofotometría (260 nm).

## ANEXO 4.

Resultados de los parámetros fisicoquímicos medidos de los reactores M1, M8, ORI y UAM durante los 9 meses del experimento.

REACTOR	TIEMPO (MESES)	pH	ALFA $\alpha$	SSV g/l	AGV'S (mg/l)		
					ACETICO	PROPIONICO	BUTIRICO
<b>M1</b>	0	*	*	16.20	*	*	*
	0.5	8.07	0.38	12.73	187.10	34.17	200.98
	1	8.5	0.67	13.93	4116.00	701.27	210.61
	2	9.34	0.56	9.20	3422.20	891.23	220.34
	3.5	8.8	0.55	10.58	2723.75	1016.85	230.10
	4.5	8.92	0.39	12.35	3590.22	1134.23	330.10
	7	8.7	0.33	12.33	4013.02	1393.45	449.02
	9	8.64	0.43	14.79	3828.57	1277.07	454.65
<b>M8</b>	0	*	*	22.13	*	*	*
	0.5	6.8	0.47	23.10	1959.30	813.44	258.92
	1	8.37	0.47	14.50	2107.24	541.67	772.27
	2	8.49	0.53	15.55	1654.32	843.69	123.88
	3.5	8.48	0.52	12.55	1850.44	931.70	155.44
	4.5	8.6	0.50	8.00	2323.96	952.33	167.29
	7	8.5	0.21	7.87	2948.65	1594.54	92.09
	9	8.37	0.31	8.00	2406.95	1294.91	73.17
<b>ORI</b>	0	*	*	36.90	*	*	*
	0.5	7.95	0.50	28.70	286.74	530.73	23.96
	1	8.43	0.43	21.93	133.84	24.91	ND
	2	9	0.43	20.30	131.43	ND	ND
	3.5	8.74	0.51	20.20	132.71	ND	ND
	4.5	8.93	0.43	16.45	130.21	ND	ND
	7	8.8	0.41	13.43	60.12	ND	ND
	9	8.68	0.46	12.50	80.34	ND	ND
<b>UAM</b>	0	*	*	6.28	*	*	*
	0.5	8.43	0.57	3.33	285.35	24.20	ND
	1	8.77	0.56	2.20	171.63	85.91	39.61
	2	8.76	0.60	2.53	222.27	25.65	ND
	3.5	8.96	0.81	1.68	196.86	57.68	ND
	4.5	8.69	0.46	1.03	199.64	38.09	ND
	7	8.59	0.50	4.60	125.61	100.63	ND
	9	8.55	0.50	2.00	185.49	79.63	ND

\*No determinado, ND=No definido

## ANEXO 5.

Análisis de varianza (ANOVA  $\alpha=0.05$ ) de los reactores M1, M8, ORI y UAM

Variable dependiente: AME

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Variable dependiente: AME					
FUENTE	sumatoria de cuadrados Tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Modelo corregido</b>	49.386(a)	63	.784	46.721	.000
<b>Intercepción</b>	21.895	1	21.895	1304.975	.000
<b>reactor</b>	9.059	2	4.530	269.973	.000
<b>tiempo</b>	3.864	7	.552	32.899	.000
<b>lodo</b>	0.02	1	0.01	1.08	0.36
<b>sustrato</b>	11.101	1	11.101	661.647	.000
<b>reactor * tiempo</b>	4.227	14	.302	17.993	.000
<b>reactor * lodo</b>	0.03	3	0.01	1.49	0.22
<b>tiempo * lodo</b>	.002	2	0.03	1.35	0.19
<b>reactor * tiempo * lodo</b>	.003	3	0.04	1.01	0.099
<b>reactor * sustrato</b>	6.034	2	3.017	179.819	.000
<b>tiempo * sustrato</b>	3.394	7	.485	28.901	.000
<b>reactor * tiempo * sustrato</b>	3.087	14	.220	13.141	.000
<b>lodo * sustrato</b>	0.03	5	0.02	1.51	0.23
<b>reactor * lodo * sustrato</b>	.002	7	0.06	1.41	0.21
<b>tiempo * lodo * sustrato</b>	.003	3	0.05	1.13	0.12
<b>reactor * tiempo * lodo * sustrato</b>	.000	3	0.08	1.13	0.21
<b>Error</b>	2.148	128	.017		
<b>Total</b>	73.429	192			
<b>Total corregido</b>	51.534	191			

ANOVA  $\alpha=0.05$

**ANEXO 6.**

Correlación de Spearman para AME y capacidad búfer.

<b>Correlaciones</b>			
<b>M1</b>			AME hidrógeno
Rho de Spearman	M1	Coeficiente de correlación	1.000
		Sig. (bilateral)	.
		N	7
	AME hidrógeno -Búfer	Coeficiente de correlación	-.321
		Sig. (bilateral)	.482
		N	7

<b>M1</b>			AME acético
Rho de Spearman	M1	Coeficiente de correlación	1.000
		Sig. (bilateral)	.
		N	7
	AME acético -búfer	Coeficiente de correlación	-.214
		Sig. (bilateral)	.645
		N	7

<b>Correlaciones</b>			
<b>M8</b>			AME hidrógeno
Rho de Spearman	M8	Coeficiente de correlación	1.000
		Sig. (bilateral)	.
		N	7
	AME hidrógeno - Búfer	Coeficiente de correlación	-.582
		Sig. (bilateral)	.171
		N	7

<b>M8</b>			AME Acético
Rho de Spearman	M8	Coeficiente de correlación	1.000
		Sig. (bilateral)	.
		N	7
	AME acético - búfer	Coeficiente de correlación	-.464
		Sig. (bilateral)	.295
		N	7

**ANEXO 6 (Continuacion).**

<b>Correlaciones</b>			
<b>ORI</b>			AME ORI hidrógeno
Rho de Spearman	ORI	Coeficiente de correlación	1.000
		Sig. (bilateral)	.
		N	7
	AME hidrógeno -Búfer	Coeficiente de correlación	-.324
		Sig. (bilateral)	.478
		N	7
<b>ORI</b>			AME ORI acético
Rho de Spearman	ORI	Coeficiente de correlación	1
		Sig. (bilateral)	.
		N	7
	AME acético - búfer	Coeficiente de correlación	-0.704
		Sig. (bilateral)	0.077
		N	7

<b>Correlaciones</b>			
<b>UAM</b>			AME UAM hidrógeno
Rho de Spearman	UAM	Coeficiente de correlación	1.000
		Sig. (bilateral)	.
		N	7
	AMENhidrógeno -Búfer	Coeficiente de correlación	.321
		Sig. (bilateral)	.482
		N	7

<b>Correlaciones</b>			
<b>UAM</b>			AME UAM acético
Rho de Spearman	UAM	Coeficiente de correlación	1
		Sig. (bilateral)	.
		N	7
	AME acético -búfer	Coeficiente de correlación	0.108
		Sig. (bilateral)	0.818
		N	7

## ANEXO 7.

Resultados de los parámetros fisicoquímicos durante los 4 meses del experimento.

TRATAMIENTO	TIEMPO	pH	ALFA $\alpha$ (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	SSV g/l	AGV'S		
					ACETICO	PROPIONICO	BUTIRICO
<b>control</b>	0	7.53	0.83	12.50	3752.28	429.86	580.54
	1	8.13	0.52	16.98	934.80	205.07	175.67
	2.5	7.89	0.59	15.28	1744.14	167.52	82.60
	4	7.81	0.58	14.25	120.94	146.01	ND
<b>A</b>	0	7.53	0.83	12.50	3752.28	429.86	100.41
	1	8.18	0.69	16.88	2206.13	123.75	158.91
	2.5	7.64	0.57	16.63	1159.26	135.10	93.50
	4	7.63	0.53	14.25	152.36	144.98	ND
<b>B</b>	0	7.53	0.83	12.50	3752.28	429.86	100.41
	1	8.24	0.74	17.19	2206.13	123.75	175.67
	2.5	7.92	0.50	14.93	813.79	54.89	85.15
	4	7.48	0.51	15.75	280.83	233.32	28.26
<b>C</b>	0	7.53	0.83	12.50	3752.28	429.86	100.41
	1	8.27	0.70	17.16	2206.13	123.75	130.55
	2.5	7.83	0.51	13.20	813.79	54.89	132.53
	4	7.35	0.50	17.63	481.60	87.36	ND

## ANEXO 8.

Análisis de varianza (ANOVA  $\alpha=0.05$ ) de los tratamientos del lodo UAM.

<b>ANALISIS DE VARIANZA</b> Variable dependiente: AME					
<b>FUENTE</b>	<b>sumatoria de cuadrados Tipo III</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadratica</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Modelo corregido</b>	13.80	31.00	0.45	59.50	0.00
<b>Intercepción</b>	11.62	1.00	11.62	1553.08	0.00
<b>TIEMPO</b>	0.91	3.00	0.30	40.53	0.00
<b>TRATAMIENTO</b>	0.02	3.00	0.01	1.08	0.36
<b>SUSTRATO</b>	6.76	1.00	6.76	903.46	0.00
<b>TIEMPO * TRATAMIENTO</b>	0.58	9.00	0.06	8.59	0.00
<b>TIEMPO * SUSTRATO</b>	0.86	3.00	0.29	38.24	0.00
<b>TRATAMIENTO * SUSTRATO</b>	0.03	3.00	0.01	1.49	0.22
<b>TIEMPO * TRATAMIENTO * SUSTRATO</b>	0.44	9.00	0.05	6.51	0.00
<b>Error</b>	1.56	208.00	0.01		
<b>Total</b>	33.71	240.00			
<b>Total corregido</b>	15.36	239.00			

ANOVA  $\alpha=0.05$