

ANÁLISIS PARCIAL DE MICROORGANISMOS METANOGENICOS DURANTE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE ESTIÉRCOL BOVINO CON SUERO DE LECHE EN POLVO

PARTIAL ANALYSIS OF METANOGENIC MICROORGANISMS DURING ANAEROBIC DIGESTION OF CATTLE MANURE WITH WHEY POWDER

María L. Ruiz-Nito¹, Marcela Cárdenas-Manríquez², María M. Rivera-Ramírez²,
José E. Botello-Álvarez¹ y Ramiro Rico-Martínez^{3,*}

(1) Tecnológico Nacional de México Campus Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica-Ambiental, Antonio García Cubas #600, Col. Alfredo Vázquez Bonfil, Celaya, Guanajuato - México

(2) Tecnológico Nacional de México Campus Celaya, Departamento de Ciencias Básicas, Antonio García Cubas #600, Col. Alfredo Vázquez Bonfil, Celaya, Guanajuato - México

(3) Tecnológico Nacional de México Campus Celaya, Departamento de Ingeniería Química, Antonio García Cubas #600, Col. Alfredo Vázquez Bonfil, Celaya, Guanajuato - México

(*correo de contacto: ramiro@iqcelaya.itc.mx)

Recibido: 11/08/2022 - Evaluado: 26/08/2022 - Aceptado: 20/09/2022

RESUMEN

La digestión anaeróbica representa una alternativa sustentable para la conversión de residuos agroindustriales en productos de valor agregado como el biogás. Este estudio evalúa el efecto de la codigestión anaerobia de estiércol bovino con suero de leche en polvo sobre la dinámica de comunidades microbianas en condiciones mesofílicas. Se prepararon por triplicado tratamientos con una relación de inóculo-estiércol de 0.3 gV_{SII}/gV_{SCM} incluyendo acetato de sodio (406 mgC/L), BES (10 mM) o suero de leche en polvo (406 mgC/L). El análisis de la comunidad basada en secuenciación Illumina MiSeq reveló que *Methanosaeta concilii* (metanógeno acetoclástico) fue el arquea dominante durante el experimento completo. Comparado con el grupo control, el tratamiento con suero de leche incrementó la abundancia relativa de *Methanosaeta concilii* hasta en un 120%. Esta abundancia es alcanzada al día 19 y no es mantenida a lo largo de la digestión anaerobia probablemente debida al agotamiento del suero. Los tratamientos afectaron la diversidad y composición de bacterias y arqueas pero los filos dominantes fueron los mismos en todos, con excepción de la enmienda BES.

ABSTRACT

Anaerobic digestion represents a sustainable alternative for the conversion of agro-industrial waste into value-added products such as biogas. This study evaluates the effect of anaerobic co-digestion of cattle manure with whey powder on the dynamics of microbial communities at mesophilic conditions. Amendments were prepared in triplicate with an inoculum-manure ratio of 0.3 gV_{SII}/gV_{SCM} including sodium acetate (406 mgC/L), BES (10mM) or whey powder (406 mgC/L). Illumina MiSeq sequencing-based community analysis revealed that *Methanosaeta concilii* (acetoclastic methanogen) was the dominant archaea during the whole experiment. Compared with the control group, treatment with added whey powder increased the relative abundance of *Methanosaeta concilii* by as much as 120%. This abundance is achieved on day 19 and is not maintained during the anaerobic digestion probably due to whey depletion. The amendments affected the diversity and composition of bacteria and archaea but the dominant phyla were the same in all, except the BES amendment

Palabras clave: Bromoetanosulfonato de sodio (BES), suero de leche en polvo, estiércol bovino, Illumina MiSeq, *Methanosaeta concilii*

Keywords: Sodium bromoethanesulfonate (BES), whey powder, cattle manure, Illumina MiSeq, *Methanosaeta concilii*

INTRODUCCIÓN

El aumento acelerado de la población ejerce fuerte presión en el ambiente. Este incremento está ligado a mayor generación de residuos. El estiércol bovino y el suero de leche son residuos importantes por la cantidad anual producida e impactos ambientales derivados de su manejo inadecuado. En 2021, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2021) reportó una producción anual alrededor de 36 millones de cabezas de ganado bovino a nivel nacional, lo cual corresponde a una producción de estiércol estimada en 500 millones de toneladas, relativo al 10% de su peso (Nennich *et al.*, 2005). En el 2019, se reportó una producción de 476 mil 927 toneladas de quesos y se estima que por 1 kg de queso producido se generan entre 9 y 10 L de suero lo cual representa un problema ambiental serio por la elevada demanda química y bioquímica de oxígeno que aporta este residuo (SIAP, 2020; Osorio-González *et al.*, 2018). Actualmente, la digestión anaerobia (DA) figura como una alternativa sustentable para la producción de energía en forma de biogás a partir de una diversidad de residuos orgánicos, incluyendo estiércol bovino y suero de leche.

La DA es un proceso biológico donde participan sintrófica y secuencialmente una diversidad de microorganismos en cuatro etapas principales para la producción de biogás (50-75% CH₄, 25-45% CO₂). En la etapa de hidrólisis ocurre la conversión de materia orgánica compleja en moléculas más simples como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos por bacterias hidrolíticas principalmente del filo Bacteroidetes y Firmicutes. Durante la acidogénesis, los productos de la hidrólisis son metabolizados principalmente hacia ácidos grasos volátiles con la participación de microorganismos que pertenecen predominantemente a los filos Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes y Proteobacteria (Fan *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2018). En la etapa de acetogénesis, las bacterias productoras de hidrógeno convierten ácidos orgánicos de cadena larga en acetato, H₂ y CO₂. Las reacciones de oxidación acetogénicas tienen que ser acopladas a la remoción de H₂ por metanógenos u otros microorganismos anaerobios hidrogenotróficos para mantener condiciones energéticamente favorables (Tian *et al.*, 2019), razón por la cual existe una relación de crecimiento sintrófico obligado de bacterias acetogénicas y metanogénicas. La última etapa de la DA puede ocurrir por dos vías principales para la producción de biogás, a partir de la conversión de H₂ por arqueas metanogénicas hidrogenotróficas o por la conversión de acetato a través de metanógenos acetoclásticos. La ruta acetotrófica o acetoclástica se sugiere como la vía metanogénica dominante ya que aproximadamente 70-80% del CH₄ es derivado de acetato (Fan *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2021).

Algunos de los factores que pueden determinar el rendimiento de biogás y CH₄ en la DA se atribuye a la relación C/N, pH de operación, tipo y cantidad de sustratos, entre otros (Tian *et al.*, 2019; Xing *et al.*, 2017; Zhanga *et al.*, 2018). Un problema general en la DA que colapsa al sistema es la tendencia a la acidificación por la acumulación de AGV's (Ácidos Grasos Volátiles). Esto se podría evitar proporcionando una apropiada relación de alcalinidades desde el inicio del proceso para asegurar una adecuada capacidad de tamponamiento. De acuerdo con Pérez y Torres (2008), se sugiere una relación de alcalinidades (HCO₃⁻)_{5.75}/TA_{4.3} de 0.7 para mantener la estabilidad en el sistema. A esta relación de alcalinidades también se le conoce como factor α . Para ajustar el factor α se podrían añadir sustancias como bicarbonato de sodio para amortiguar los cambios de pH o a través de la codigestión de diferentes sustratos que aporten un balance adecuado de nutrientes y alcalinidades. Un cosustrato conveniente para la degradación anaeróbica de estiércol bovino es el suero de leche ya que se ha observado que la codigestión de ambos residuos estabiliza el proceso de DA sin necesidad de correctores de pH y se alcanzan mejores rendimientos de CH₄ con respecto a estiércol sólo (Treu *et al.*, 2019; Vivekanand *et al.*, 2018). Por otro lado, mientras que los parámetros fisicoquímicos y de operación que afectan la estabilidad de la DA han sido ampliamente estudiados, en la actualidad aún existe un limitado conocimiento acerca de cómo éstos alteran estructura y dinámica de comunidades microbianas. Debido a que la DA es un proceso conducido por una amplia variedad de microorganismos, cualquier cambio en las condiciones de operación modifica la abundancia y actividad de los consorcios microbianos lo que repercute en el rendimiento y composición del biogás (Xing *et al.*, 2017).

Basado en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de la adición de suero de leche sobre la productividad de CH₄ y la estructura de comunidades microbianas durante la DA de estiércol bovino en condiciones mesofílicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se utilizó estiércol de ganado bovino lechero como sustrato base para la DA de las enmiendas E, EI, S, AC y BES, denominadas acorde con el contenido de sustratos indicados en la Tabla 1. El suero de leche fue utilizado en polvo como componente modelo y se adquirió en la empresa Sólo Química de México, S.A. De C.V. El experimento fue desarrollado en botellas serológicas de 125 mL bajo condiciones mesofílicas a temperatura ambiente. Se utilizó una relación de inóculo-estiércol de $0.3 \text{ gVS}_{\text{II}}/\text{gVS}_{\text{CM}}$, con un volumen de trabajo efectivo de 80 mL. La cantidad de inóculo es un factor importante en el proceso de DA, ya que podría opacar los resultados si la producción de biogás por el inóculo es relativamente alta comparado con lo producido por el compuesto bajo investigación, por el contrario, si la cantidad es pequeña podría conducir a sobrecarga del proceso acidificando el sistema (Agelidaki & Sanders, 2004; Kalloum *et al.*, 2014). Por lo anterior, para determinar la relación inóculo-estiércol apropiada para este trabajo, se realizó un experimento previo para probar varias proporciones y utilizar la más conveniente según lo reportado por Agelidaki & Sanders (2004). Como control negativo para la producción de CH_4 , se utilizó el inhibidor de la metanogénesis 2-Bromoetanosulfonato de sodio (2-BES) a una concentración final de 10 mM (Cárdenas *et al.*, 2020). S y AC se prepararon con una base de cálculo de 406 mgC/L correspondientes a 1000 mg acetato/L (Cárdenas *et al.*, 2020). Los sustratos se agregaron a las botellas serológicas en condiciones anaeróbicas bajo un flujo constante de nitrógeno, posteriormente se sellaron con tapón de goma y anillo de aluminio. Adicionalmente, se purgó el espacio de cabeza gaseando cada botella con nitrógeno durante 1 minuto. La presión excedente fue liberada para ajustar a cero cada microsistema en el tiempo inicial. Los experimentos se realizaron por triplicado con 7 lotes para su muestreo y análisis durante un periodo de 60 días.

Tabla 1: Matriz de enmiendas analizadas

Enmienda	Combinación de sustratos e inóculo		
E	Estiércol	-----	-----
EI	Estiércol	Inóculo	-----
S	Estiércol	Inóculo	Suero de leche en polvo
AC	Estiércol	Inóculo	Acetato de sodio
BES	Estiércol	Inóculo	2-BES
I	-----	Inóculo	-----

Las características de los sustratos iniciales e inóculo (obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Características de los sustratos e inóculo

Parámetro	Unidades	Estiércol (CM)	Suero en polvo	Inóculo (II)
pH	---	7.57 ± 0.03	6.07 ± 0.01	8.20 ± 0.04
Nitrógeno Total	g/100g DW	1.66 ± 0.002	1.90 ± 0.004	8.04 ± 0.06
Materia Orgánica	g/100g DW	64.83 ± 2.32	65.97 ± 8.63	41.20 ± 0.91
Carbono Orgánico Total	g/100g DW	37.60 ± 1.34	38.26 ± 5.00	23.89 ± 0.53
Carbono/Nitrógeno	---	22.65 ± 0.81	20.14 ± 2.63	2.97 ± 0.07
Sólidos Totales	g/100g WW	11.13 ± 0.06	94.50 ± 0.12	11.17 ± 0.42
Sólidos Volátiles (VS)	g/100g WW	8.96 ± 0.03	86.74 ± 0.15	9.73 ± 0.41
$(\text{HCO}_3^-)_{5.75}$	mg CaCO_3/g	3.49 ± 0.32	4.33 ± 0.17	7.59 ± 0.07
$\text{TA}_{4.3}$	mg CaCO_3/g	7.66 ± 0.02	27.29 ± 0.11	11.05 ± 0.09
Factor α	---	0.46 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.69 ± 0.001

$(\text{HCO}_3^-)_{5.75}$: Alcalinidad bicarbonática a pH 5.75; $\text{TA}_{4.3}$: Alcalinidad total a pH 4.3;

Factor α : $(\text{HCO}_3^-)_{5.75}/\text{TA}_{4.3}$; WW: base húmeda; DW: base seca.

La alcalinidad, pH, sólidos totales, volátiles y fijos fueron determinados con métodos estándar APHA (1999). El nitrógeno total se determinó por el método micro-Kjeldahl basado en NOM- F-68-S-1980 (1980). La materia orgánica y carbono orgánico total fueron determinados por el método de pérdida de peso por ignición de acuerdo a Eyherabide *et al.* (2014).

Durante la DA, la producción de biogás fue determinada a partir de la presión en el espacio de cabeza de cada enmienda. La presión se midió con un manómetro digital Dwyer 475 6 FM. Después de cada lectura, el biogás en el espacio de cabeza fue liberado para ajustar la presión a cero como condición inicial para la próxima lectura. La presión (P_1) fue convertida a volumen de biogás ($V_{\text{biogás}}$) utilizando el volumen del espacio de cabeza (V_1) y la temperatura de trabajo (T_1) en condiciones normales de temperatura y presión (ecuación 1).

$$V_{\text{biogás}} = \frac{P_1 V_1 (273.15K)}{T_1 (1 \text{ atm})} \quad (1)$$

La concentración de CH_4 se determinó en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500 GC con Detector de Conductividad Térmica, columna Carboxen-1010 PLOT de 30 m x 0.53 mm de diámetro interno y nitrógeno como gas acarreador. Las condiciones del método fueron horno 100 °C, Inyector 150 °C y detector 150 °C. Para el análisis de comunidades microbianas, las muestras de cada enmienda se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La extracción de ADNg se realizó utilizando el protocolo del kit PowerSoil DNA Isolation de MoBio con modificaciones. Las modificaciones en el protocolo original consistieron en incrementar la temperatura a 70 °C y variar los tiempos de incubación desde 1 hasta 10 min durante la lisis celular. Las muestras de ADNg fueron procesadas, secuenciadas y analizadas por ZymoBIOMICS de Zymo Research, Irvine, CA. Las muestras correspondieron a las enmiendas EI del tiempo cero, S, AC y BES del tiempo cero, día 19 y día 60. Para la creación de la librería se utilizó el kit Quick-16S NGS Library Prep con el conjunto de cebadores Quick-16S Primer Set V3-V4 con los cuales se amplifica la región variable de V3 a V4 del gen RNAr 16S para arqueas y bacterias. La secuenciación se desarrolló utilizando la plataforma Illumina MiSeq con el kit de reactivos v3 (600 ciclos). En el análisis bioinformático se utilizó la tubería Dada2 para eliminar las secuencias quiméricas e inferir las secuencias únicas. La taxonomía fue asignada con la base de datos 16S de Zymo Research utilizando Uclust de Qiime v.1.9.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La relación entre la alcalinidad debida a los bicarbonatos y la alcalinidad total es denominada factor α y puede ser empleada para conocer la estabilidad del proceso anaerobio. Se ha encontrado que valores de factor α alrededor de 0.5 a 0.7 reflejan una condición estable en la DA, incluso valores mayores a 0.7 han demostrado mejor estabilidad y mayor producción de CH_4 (Pérez & Torres, 2008). Esto concuerda con los resultados mostrados en las Figuras 1A y 1B, donde se observa que las enmiendas AC, S y EI han sido estabilizadas por el aporte de alcalinidad del inóculo cuyo factor α oscila entre 0.8-0.9, lo que le atribuye buena capacidad amortiguadora del sistema. Lo anterior influye en la reducción de la fase lag y en el incremento del rendimiento de biogás y metano respecto a E (Figuras 1C y 1D).

Lo anterior refleja una apropiada sintrofia entre el estiércol y el inóculo de tal forma que la aportación de suero de leche o acetato de sodio no resulta significativa. A pesar de que en este trabajo no se logra apreciar una contribución significativa por la adición de suero de leche o acetato de sodio, en la práctica, otros trabajos han demostrado resultados favorables con el uso de estos cosustratos. Treu *et al.* (2019), reportaron que la codigestión de suero de leche con estiércol de ganado incrementa y estabiliza la producción de CH_4 con respecto a la monodigestión de suero. Vivekanand *et al.* (2018), encontraron que la codigestión de estiércol-suero de leche generó mayor rendimiento de metano comparado con la DA de estiércol como único sustrato. Es bien sabido que el rendimiento de CH_4 puede variar en función de factores como el tipo y cantidad de sustrato, relación de alimentación, condiciones de operación, etc. Treu *et al.* (2019), observaron que a 53°C la producción de metano es mayor que a 37°C. Xu *et al.* (2022), obtuvieron un rendimiento de metano de 8 mL/gSV en la codigestión de estiércol de ganado con paja de maíz a 20°C, este rendimiento mejoró con la adición de un cultivo metanogénico adicional al inóculo generando un máximo de 36 mL/gSV. En este trabajo la DA se realizó a temperatura ambiente entre 22 y 31°C con una media de 25°C y una moda de 24°C lo cual pudo influir en el bajo rendimiento obtenido con un máximo de 31.8 mL/gSV para la enmienda AC.

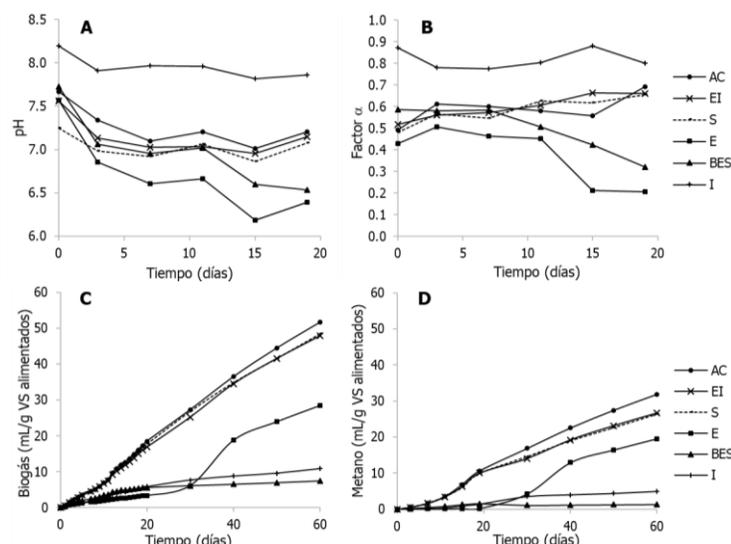


Fig. 1: Seguimiento de la digestión anaerobia. A) pH. B) Factor α . C) Producción de biogás. D) Rendimiento de metano.

Además de su capacidad tampón, el inóculo posee características microbiológicas que favorecen la DA generando mayores rendimientos de CH_4 (Agelidaki & Sanders, 2004; Fan *et al.*, 2022). En este trabajo no se realizó análisis de la comunidad microbiana del inóculo individual sino en mezcla con estiércol por ser el tratamiento control y la base utilizada para preparar las enmiendas examinadas. Para analizar las diferencias en la diversidad microbiana a nivel de Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs), la secuenciación se desarrolló con la plataforma Illumina MiSeq ya que con este método se ha reportado suficiente profundidad para cubrir la mayoría de los grupos taxonómicos presentes en el proceso de DA (Cai *et al.*, 2017; Treu *et al.*, 2019). El análisis arrojó un total de 28 filos, 208 géneros y 482 especies diferentes en el conjunto de los tratamientos analizados. En la figura 2 se muestra a nivel de especie todas las arqueas detectadas y, a nivel de familia, la distribución de la comunidad microbiana total (bacterias y arqueas) con abundancia relativa mayor a 0.5% en promedio. Los Filos Proteobacteria, Chloroflexi, Euryarchaeota, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Synergistetes fueron dominantes en EI_0, S_0, AC_0 y BES_0 con una abundancia conjunta de 94.9%, 95%, 93.6% y 95.4%, respectivamente. La similitud en la abundancia y estructura microbiana en estos tratamientos al inicio de la DA es razonable ya que parten de la misma base estiércol-inóculo en la misma proporción. Sin embargo, la distribución de especies de estos filos mostró diferencias acordes al tipo de sustrato y tiempo de digestión según lo observado en la Figura 2. En la Figura 2A se puede apreciar que la abundancia de arqueas metanogénicas acetoclásticas es dominante con respecto a las hidrogenotróficas en todos los tratamientos y a lo largo del proceso de DA, esto es consistente con estudios previos que reportan mayor abundancia de metanógenos acetoclásticos en condiciones de DA estables, mientras que los hidrogenotróficos están más relacionados con condiciones de operación desfavorables (Cai *et al.*, 2017; Xing *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2022).

Al inicio de la DA, el género *Acinetobacter* (f_Moraxellaceae) abarcó entre el 26-31% de abundancia relativa en las enmiendas EI, S, AC y BES, mientras que entre el día 19 y 60, S tuvo en promedio 0.25%, AC 3.5% y BES 0.49%. Este género está relacionado con procesos de hidrólisis y fermentación por lo cual es razonable que su mayor abundancia se ubique en la primera etapa de la DA. El siguiente género con mayor presencia fue *Methanosaeta* (f_Methanosaetaceae) específicamente *Methanosaeta concilii* con 12.24, 12.89, 14.60 y 14.04% de abundancia relativa en EI, S, AC y BES respectivamente. Esta especie es un arquea metanógena que participa en la ruta acetoclástica para la producción de metano. La presencia de este género al inicio de la DA podría explicar la inexistencia de fase lag en estos tratamientos. Sin embargo, el tratamiento BES no produce CH_4 en la misma medida debido a que se encuentra inhibido por la presencia del 2-Bromoetanosulfonato de sodio (2-BES). De los filos más abundantes en el tratamiento control, BES presenta una disminución al día 19 y 60 de DA en Proteobacteria, Chloroflexi y Euryarchaeota, siendo BES_19 el de la disminución más marcada con 56.5% en la población

metanogénica, 96% en el filo Proteobacteria y 38% en Chloroflexi (Figura 3). Esto concuerda con estudios previos que señalan que 2-BES inhibe la formación de CH₄ a través de diversos mecanismos, algunos involucran la reducción de la población metanogénica y la reducción de bacterias celulolíticas (Galindo *et al.*, 2009; Salvador *et al.*, 2019), lo anterior corresponde con una fase lag más larga y menor producción de CH₄ (Figura 1C y 1D).

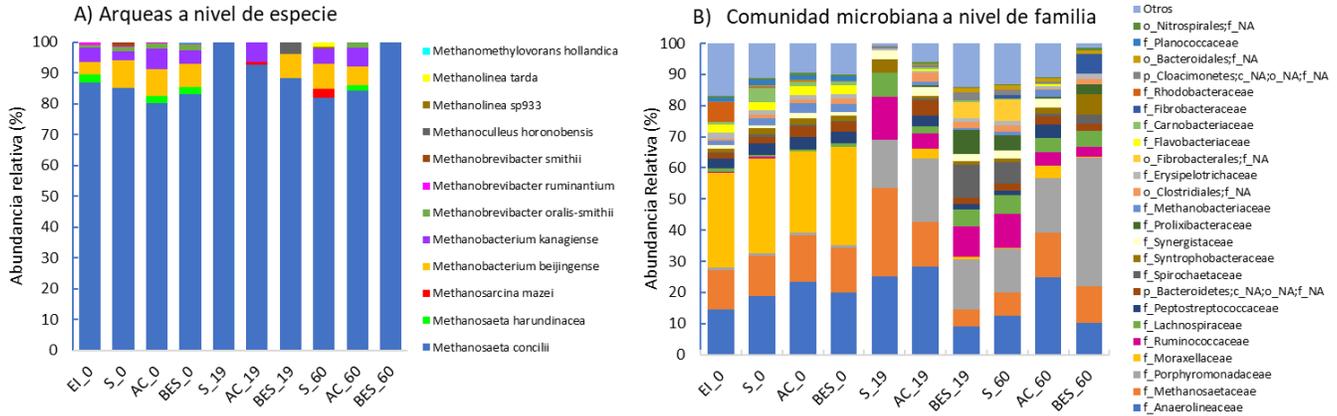


Fig. 2: Composición de la comunidad microbiana.

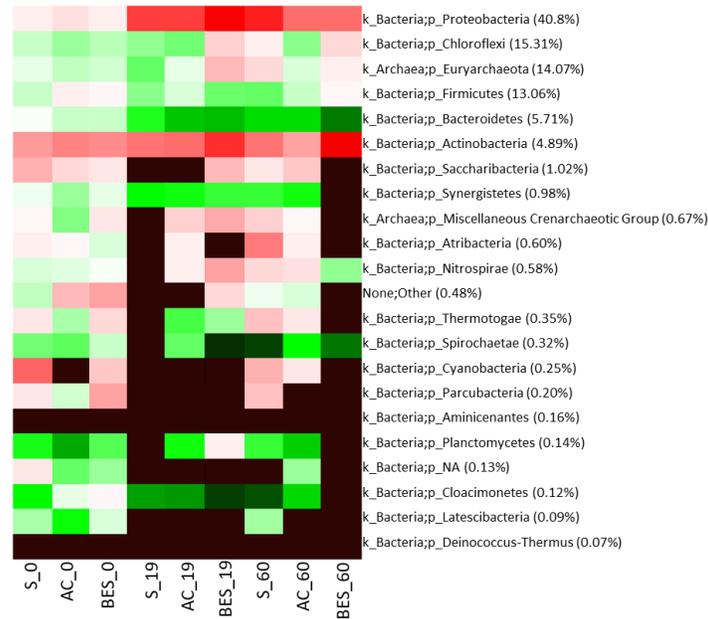


Fig. 3: Mapa de calor de los tratamientos comparados con el grupo control EI₀ a nivel de filo. Entre paréntesis se indica la abundancia de cada filo en EI₀. Se muestra en rojo los que disminuyen, en verde los que aumentan y en negro los que ya no se detectaron. La intensidad del color representa la proporción en que aumentan o disminuyen.

Los resultados sugieren que el suero de leche incentiva la abundancia de metanógenos acetoclásticos pero no su diversidad ya que S₁₉ incrementó la abundancia relativa de *Methanosaeta concilii* en un 120% comparado con EI₀ (Figura 2B y 3), la disminución posterior pudiera ser atribuida a un posible agotamiento del cosustrato, lo que implica una producción final de CH₄ similar a la alcanzada con el tratamiento EI. Las enmiendas EI₀, AC₀, y BES₀ tienen en promedio 1.59% de abundancia relativa en especies del orden Lactobacillales mientras que la enmienda S₀ presenta 5.75%. Este porcentaje podría deberse a la presencia del suero de leche en la enmienda

S, por su contenido de lactosa, ya que el orden Lactobacillales se caracteriza por fermentar azúcares para su conversión en ácido láctico. Entre el día 19 y 60 este porcentaje disminuye hasta un promedio de 0.33% lo que podría confirmar el agotamiento del suero. A pesar del incremento en la abundancia de arqueas metanogénicas al día 19, la producción acumulada de CH₄ en S₁₉ no difiere significativamente de AC₁₉ y EI₁₉ (Figura 1d), posiblemente se debe a la presencia de metanógenos hidrogenotróficos en dichas enmiendas (Figura 2A) ya que se sabe que la ruta hidrogenotrófica produce mayor rendimiento de CH₄ (Liu *et al.*, 2019; Tabatabaei *et al.*, 2020).

En el caso de S₆₀, la abundancia relativa de acetoclásticos disminuye con respecto a S₁₉ de 28% a 7.67%; sin embargo, la producción de CH₄ sigue aumentando, posiblemente atribuido al aumento en la población de hidrogenotróficos de 0% a 1.37% en el mismo periodo (Figura 2A), lo que confirma que esta ruta tiene mayor contribución en la producción de CH₄ que la acetoclástica y a la posible simtrofia con otras especies, como por ejemplo del filum Firmicutes, Chloroflexi y Bacteroidetes. Se ha identificado la participación de especies del filo Chloroflexi durante procesos de hidrólisis, fermentación y acetogénesis (Xu *et al.*, 2021), en este trabajo se deduce una correlación positiva entre su abundancia y la producción de CH₄ ya que AC₁₉ presenta una abundancia relativa de 28.8% con una producción acumulada de CH₄ de 83.2 mL; S₁₉ tiene una abundancia de 25.2% y su producción acumulada de CH₄ es 77.7 mL. Del Filum Firmicutes, entre el día 19 y 60, el promedio de abundancia relativa para S fue de 22.5% y para AC 14.5%. Este grupo de bacterias ha sido asociado a la hidrólisis de lípidos, proteínas y fermentación de carbohidratos para producir principalmente hidrógeno y acetato aunque también se le ha relacionado con la producción de butirato (Flint *et al.*, 2008; Treu *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2021) lo cual ubica a especies de este género a lo largo de la ruta metabólica de DA desde la hidrólisis, fermentación y acidogénesis hasta la acetogénesis, lo cual corresponde con los resultados observados en este trabajo (Figura 2b y 3).

Estudios previos han encontrado una relación sintrófica entre especies de este Filum y comunidades metanogénicas durante la producción de biogás removiendo el hidrógeno para favorecer la DA (Zhou *et al.*, 2021). Por otro lado, Cai *et al.* (2017) encontraron que no hubo relación entre el rendimiento de biogás y la abundancia de Firmicutes. Este comportamiento es consistente con los resultados de este trabajo ya que la mayor producción de biogás en el día 0, 19 y 60 (0, 142.7 y 424.7 mL) se obtiene para AC y la abundancia de Firmicutes corresponde a 11.4, 15.5 y 16.7% respectivamente, lo cual es menor con respecto a S (16, 22 y 26%) cuyo volumen acumulado de biogás fue de 0, 139 y 399.1 mL para los mismos días, mientras que para las enmiendas con BES la producción de biogás fue de 0, 46.4 y 62.1 mL con una abundancia de Firmicutes de 12.8, 25.5 y 12%. Por otro lado, los Bacteroidetes son un grupo de bacterias relacionadas con la hidrólisis de carbohidratos, proteínas y lignocelulosa. También se les ubica en procesos de acidogénesis y acetogénesis. Trabajos previos han reportado que una menor relación de abundancia Firmicutes/Bacteroidetes es un indicativo de un mejor desempeño hidrolítico durante la DA, tal como lo confirma Zhou *et al.* (2021), en donde la menor relación Firmicutes/Bacteroidetes en las muestras analizadas se obtuvo para los grupos con mayor velocidad de producción de CH₄ y menor fase lag. Esto concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo ya que para AC desde el tiempo cero hasta el día 60 se obtuvo una menor relación de abundancia Firmicutes/Bacteroidetes (1.6₀, 0.5₁₉, 0.7₆₀) que para S (2.8₀, 1.4₁₉, 1.1₆₀). En el caso de las muestras con BES, a pesar de presentar un buen desempeño hidrolítico con base a esta relación (1.8₀, 0.8₁₉, 0.3₆₀), la producción de CH₄ no es favorable ya que la comunidad metanogénica se encuentra inhibida y por tanto no puede completarse la ruta para la producción de CH₄.

CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones probadas en este trabajo, se demostró que el inóculo tiene una importante contribución en la DA al reducir la fase lag de 20 a 7 días e incrementar la producción acumulada de CH₄ de 4 a 14 mL/gVS con respecto a estiércol solo, durante los primeros 30 días. Esta facultad del inóculo impidió observar diferencias significativas entre los tratamientos S, AC y EI en cuanto a la producción final de CH₄. Sin embargo, se puede deducir que la adición de suero de leche en polvo a una concentración de 406 mgC/L incentivó la ruta acetoclástica al incrementar la abundancia relativa de *Methanosaeta concilii* de 12.89% (S₀) a 28% (S₁₉). Los resultados

revelaron que las enmiendas afectaron la diversidad y composición de la comunidad microbiana pero los filos dominantes fueron los mismos en todos los tratamientos, con excepción de la enmienda BES que muestra una disminución de la actividad metanogénica acompañada de menor abundancia de *Methanosaeta concilii* y del filo Proteobacteria y Chloroflexi. Por lo anterior, este trabajo podría contribuir al entendimiento de cómo la estructura de las comunidades microbianas cambia por efecto de diferentes cosustratos y condiciones de operación, así como su relación con el rendimiento de CH₄ para promover la presencia y abundancia de microorganismos clave para mejorar el desempeño de la DA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONACYT, al TecNM campus Roque por proporcionar las muestras de estiércol. MLRN agradece al Tecnológico Nacional de México por la beca-comisión asignada.

REFERENCIAS

- Angelidaki, I. & Sanders, W. (2004) Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology*, 3, 117–129. doi:10.1007/s11157-004-2502-3.
- APHA (1999). Standard Methods for the Examination of Water and Waste water. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Cai, Y., Hua, B., Gao, L., Hu, Y., Yuan, X., Cui, Z., *et al.* (2017). Effects of adding trace elements on rice straw an aerobic mono-digestion: Focus on changes in microbial communities using high-throughput Sequencing. *Bioresource Technology*, 239, 454–463.
- Cárdenas, M., Young, R.F., Semple, K.M., Li, C., Coy, D., Underwood, E., *et al.* (2020). Microbially-mediated dewatering and consolidation (“Biodensification”) of oil sands mature fine tailings, amended with agri-business by-products. *Ciencias Naturales e Ingenierías*, 12 (24). doi.org/10.21640/ns.v12i24.2243
- Eyherabide, M., Rozas, H., Barbieri, P. & Echeverría, H. (2014). Comparación de métodos para determinar carbono orgánico en suelo. *Cienc. Suelo (Argentina)*, 32 (1), 13-19.
- Fan, Q., Fan, X., Fu, P., Sun, Y., Li, Y., Long, S., *et al.* (2022). Microbial community evolution, interaction, and functional genes prediction during anaerobic digestion in the presence of refractory organics. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10, 107789.
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R. & White, B.A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (2), 121-131. doi.org/10.1038/nrmicro1817
- Galindo, J., González, N., Sosa, A., Marrero, Y., González, R., Delgado, D., *et al.* (2009). Efecto del bromo etano sulfónico (BES) en la población de bacterias metanogénicas y en la fermentación ruminal in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43 (1), 45-50. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193015398008>
- Kalloum, S., Salem, F., Kouki, A. & Mokaddem, H. (2014). Influence of inoculums/substrate ratios (ISRs) on the mesophilic anaerobic digestion of slaughterhouse waste in batch mode: Process stability and biogas production. *Energy Procedia*, 50, 57–63.
- Liu, Y., Gu, M., Yin, Q. & Wu, G. (2019). Inhibition mitigation and ecological mechanism of mesophilic methanogenesis triggered by supplement of ferrous oxide in sulfate containing systems. *Bioresource Technology*, 288, 121546.

Nennich, T.D., Harrison, J.H., Van Wieringen, L.M., Meyer, D., Heinrichs, A.J., Weiss, W.P., et al. (2005). Prediction of manure and nutrient excretion from dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, *88*, 3721–3733. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73058-7

Norma Oficial Mexicana NOM-F-68-S-1980 (1980). *Alimentos determinación de proteína*.

Osorio-González, C.S., Sandoval-Salas, F., Hernández-Rosas, F., Hidalgo-Contreras, J.V., Gómez-Merino, F.C., Ávalos de la Cruz, D.A. (2018). Potencial de aprovechamiento del suero de queso en México. *Agroproductividad*. *11* (7), 101-106.

Pérez, A. & Torres, P. (2008). Indices de alcalinidad para el control del tratamiento anaerobio de aguas residuales fácilmente acidificables. *Ingeniería y Competitividad*, *10* (2), 41–52.

Salvador, A.F., Cavaleiro, A.J., Paulo, A.M.S., Silva, S.A., Guedes, A.P., Pereira, M.A., et al. (2019). Inhibition studies with 2-bromoethanesulfonate reveal a novel syntrophic relationship in anaerobic oleate degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, *85* (2), e01733-18.

SIAP-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2020). *Panorama de la lechería en México*. <http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20Cuarto%20Trimestre%202019.pdf>

SIAP-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2021). *Bovinos carne y leche. Población ganadera. 2012-2021*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/744951/Inventario_2021_bovinos_carne_y_leche.pdf

Tabatabaei, M., Aghbashlo, M., Valijanian, E., Panahi, H., Nizami, A., Ghanavati, H., et al. (2020). A comprehensive review on recent biological innovations to improve biogas production, Part 2: Mainstream and downstream strategies. *Renewable Energy*, *146*, 1392-1407.

Tian, H., Yan, M., Treu, L., Angelidaki, I. & Fotidis, I. (2019). Hydrogenotrophic methanogens are the key for a successful bioaugmentation to alleviate ammonia inhibition in thermophilic aerobic digesters. *Bioresource Technology*, *293*, 122070.

Treu, L., Tsapekos, P., Peprah, M., Campanaro, S., Giacomini, A., Corich, V., et al. (2019). Microbial profiling during an aerobic digestion of cheese whey in reactors operated at different conditions. *Bioresource Technology*, *275*, 375–385.

Vivekanand, V., Mulat, D.G., Eijsink, V.G. & Horn, S.J. (2018). Synergistic effects of anaerobic co-digestion of whey, manure and fish ensilage. *Bioresource Technology*, *249*, 35–41.

Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L. & Jiang, B. (2018). Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production—A review. *Bioresource Technology*, *248*, 29–36

Xing, L., Yang, S., Yin, Q., Xie, S., Strong, P. & Wu, G. (2017). Effects of carbon source on methanogenic activities and pathways incorporating metagenomic analysis of microbial community. *Bioresource Technology*, *244*, 982-988.

Xu, R., Fang, S., Zhang, L., Huang, W., Shao, Q., Fang, F., et al. (2021). Distribution patterns of functional microbial community in anaerobic digesters under different operational circumstances: A review. *Bioresource Technology*, *341*, 125823.

Xu, X., Sun, Y., Sun, Y. & Li, Y. (2022). Bioaugmentation improves batch psychrophilic aerobic co-digestion of cattle manure and corn straw. *Bioresource Technology*, *343*, 126118.

Zhanga, W., Daib, K., Xiaa, X., Wanga, H., Chena, Y., Lua, Y., *et al.* (2018). Free acetic acid as the key factor for the inhibition of hydrogenotrophic methanogenesis in mesophilic mixed culture fermentation. *Bioresource Technology*, 264, 17-23.

Zhou, Y., Huang, K., Jiao, X., Stanisavljevic, N., Li, L., Vujovic, S., *et al.* (2021). Anaerobic co-digestion of organic fractions of municipal solid waste: Synergy study of methane production and microbial community. *Biomass and Bioenergy*, 151,106137.