



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN AGRONOMÍA

BIODEGRADACIÓN ANAERÓBICA DEL
RESIDUO DE LA PRODUCCIÓN DE
CEBOLLA DEL VALLE BONAERENSE DEL
RÍO COLORADO

María Emilia Rinland

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2015

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Departamento de Agronomía, durante el período comprendido entre el 10 de Agosto de 2010 y el 10 de Diciembre de 2015, bajo la dirección de la Dra. Marisa A. Gómez, Profesora Titular del Departamento de Agronomía - UNS.

María Emilia Rinland

merinland@cerzos-conicet.gob.ar

Bahía Blanca, 10 de Diciembre de 2015

Departamento de Agronomía

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el / /, mereciendo la
calificación de (.....)

Agradecimientos

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas, que de una u otra forma, contribuyeron a la realización de esta Tesis:

A la Dra. Marisa Gómez, por haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su dirección, transmitiéndome su experiencia en microbiología y orientándome a lo largo de toda esta etapa;

A la Dra. Celina Zabaloy, por compartir sus conocimientos sobre biología molecular, por su colaboración y asesoramiento desinteresado en el desarrollo de la tesis;

A todos los compañeros del laboratorio de microbiología, Ani, Carmen, Darío, Gastón, Magalí, Miguel y Teresa, por su colaboración y los momentos compartidos;

A los integrantes de los laboratorios de Fisiología y Nutrición Animal, Sistemática Vegetal y Suelos Salinos y Sódicos del Departamento de Agronomía y de la cátedra de Análisis Clínicos II del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, por abrirme las puertas de sus laboratorios para hacer uso del equipamiento;

Al grupo de horticultura de la EEA INTA Hilario Ascasubi, especialmente a las Ing. Agr. Andrea Mairosser y Verónica Caracotche por su valiosa y permanente contribución y trabajo conjunto para desarrollar los ensayos de biodigestión;

Al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, donde se llevó a cabo este trabajo, por haber aportado el espacio físico y los recursos humanos necesarios para completar mis estudios de postgrado;

A la Universidad Nacional del Sur, por financiar los costos de esta investigación a través de los Proyectos de Grupos de Investigación (PGI) y Proyectos de Grupos de Investigación en Temáticas de Interés Regional (PGI-TIR) otorgados a la Dra. Marisa Gómez;

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme concedido las becas Internas de Posgrado Tipo I y II para realizar el doctorado;

A mi familia por su estímulo y amor incondicional. A Fede, por su infinito apoyo, aliento y paciencia. Sin duda esto no hubiera sido posible sin ustedes.

Muchísimas gracias a todos!

Resumen

En el sur de la provincia de Buenos Aires se encuentra el Valle Bonaerense del Río Colorado (VBRC). Esta región es la principal productora de cebolla en el país. En el área se descartan anualmente entre 12.000 y 20.000 toneladas de cebollas por problemas de calidad y sanidad. Estos residuos suelen ser abandonados en el lugar de producción, trasladados a rellenos sanitarios o incorporados en terrenos cercanos a las plantas de empaque, convirtiéndose en una fuente de contaminación. La biometanización es la degradación anaeróbica de la materia orgánica a biogás (70 % metano y 30 % dióxido de carbono) por un consorcio de arqueas metanogénicas y bacterias facultativas y anaeróbicas que actúan en forma secuencial y sinérgica. La producción de biogás a partir del residuo de la producción de cebolla podría resolver el grave problema medioambiental que causa actualmente. Sin embargo, el residuo de cebolla no es un sustrato convencional para la biometanización, sumado a ello, este residuo presenta características que pueden influenciar negativamente su degradación anaeróbica. Una alteración de la interacción entre las comunidades procarióticas involucradas en la degradación anaeróbica tiene como resultado una producción de biogás reducida, pudiendo provocar la interrupción del proceso. Ante la falta de información específica, en esta Tesis se decidió abordar simultáneamente los estudios de la microbiota nativa y de la factibilidad de la biometanización del residuo. Se recolectaron muestras de residuo de cebolla de diferentes localidades y en distinto estado de degradación y se aislaron bacterias nativas. Se desarrolló un

medio de cultivo, a partir de los nutrientes de la cebolla, con el que se caracterizaron los aislamientos. Las cepas con mejor performance en la degradación aeróbica de las hojas internas de la cebolla se identificaron filogenéticamente, destacándose *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* MB2-62 y *Pseudomonas poae* VE-74. Además se obtuvieron cultivos mixtos con actividad hidrolítica en anaerobiosis y se seleccionaron aquellos con alta capacidad de degradar la catáfila externa. Posteriormente, fueron aisladas e identificadas las bacterias integrantes de los cultivos degradadores. Todas las cepas pertenecieron al phylum *Firmicutes*, entre ellas, *Desulfotomaculum guttoideum* fue la especie más frecuente en la degradación anaeróbica de cebolla. Se realizaron distintos experimentos que permitieron determinar que las condiciones más adecuadas para optimizar la biodegradación anaeróbica del residuo de cebolla fueron incorporar urea e inocular con barros de anteriores digestiones. También se detectó que el residuo de cebolla contiene todos los grupos funcionales necesarios para la etapa hidrolítica-acetogénica de la biometanización. Sin embargo, para lograr la producción de metano, es necesario incorporar en el reactor otro sustrato que aporte arqueas metanogénicas. En conclusión, a partir de los estudios realizados en esta Tesis, fue posible determinar las condiciones para emplear el residuo de la producción de cebolla del VBRC como sustrato en la biometanización. Estas condiciones son incorporarlo en el biorreactor en partes iguales con barro activado a partir de estiércol vacuno en condiciones mesofílicas. En consecuencia, se logró establecer una alternativa de reutilización viable para estos residuos.

Abstract

Colorado River Bonaerense Valley (VBRC) is located in south Buenos Aires province and is the major onion producing region of Argentina. The production of onion in this region generates annually 12,000 to 20,000 tons of discarded onion bulbs on account of their shape, size or sanitary conditions. Generally, this waste is thrown away in fields nearby packhouses, disposed in landfills or left in growing areas, turning into a contamination source. Biomethanation is the anaerobic degradation of organic matter to biogas (70 % methane and 30 % carbon dioxide) by a consortium of facultative anaerobic and strictly anaerobic bacteria and methanogenic archaea that work sequentially and synergistically. Biogas production from onion waste could be a valuable alternative in order to solve the environmental problem it causes today. However, onion waste is an unconventional substrate for biogas production. In addition, it has characteristics that may negatively influence the anaerobic degradation. If the interaction between the prokaryotic communities involved in the anaerobic degradation is disrupted, biogas production decreases and the digestion process could be interrupted. To our knowledge, there is no specific information available about de anaerobic digestion of this type of onion waste. As a consequence, this thesis addresses simultaneously studies about the native microbiota and the feasibility of onion waste to be used as a substrate for biomethanation. We isolated bacterial strains from onion waste in different degradation stages and from different localities. In order to characterize the isolates we developed a culture medium prepared with onion juice as the main

source of nutrients. The most remarkable strains in the aerobic degradation of onion inner fleshy leaves were identified by 16S rRNA gene sequencing and *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* MB2-62 and *Pseudomonas poae* VE-74 were the most outstanding. In addition, mixed-cultures with anaerobic hydrolytic activity were also obtained from onion waste. We selected those with high efficiency to anaerobically degrade onion outer leaves. Then, we isolated and identified the members of each culture. All the strains belonged to phylum *Firmicutes*, among them, *Desulfotomaculum guttoideum* was frequently detected. Several experiments allowed us to determine the most appropriate conditions for onion waste anaerobic biodegradation, namely, addition of urea and inoculation with sludge from previous digestions. It was also detected that onion waste contains all the functional groups needed for the hydrolytic-acetogenic stage of biomethanation. However, in order to produce methane it is necessary to load other substrate in the reactor as source of methanogenic archaea. In conclusion, based on the studies performed in this thesis, it was possible to determine the conditions for using the onion waste of VBRC as substrate for biomethanation. These conditions are loading the reactor with the same ratio of onion waste and activated sludge from manure in mesophilic conditions. Consequently, a possible alternative for onion waste reutilization was established.

Índice general

Agradecimientos.....	I
Resumen.....	III
Abstract.....	V
1. Introducción general.....	- 1 -
1.1. Antecedentes.....	- 1 -
1.1.1. La problemática de los residuos orgánicos.....	- 1 -
1.2. Residuo de la producción de cebolla.....	- 2 -
1.2.1. Producción de cebolla a nivel mundial.....	- 2 -
1.2.2. Producción de cebolla en Argentina.....	- 3 -
1.2.3. Problemática ambiental de la producción de cebolla en el VBRC.....	- 8 -
1.3. Biodegradación de la materia orgánica.....	- 12 -
1.3.1. Ecología de la degradación anaerobia de la materia orgánica.....	- 13 -
1.4. Microbiología de la biometanización.....	- 14 -
1.4.1. Hidrólisis.....	- 15 -
1.4.2. Fermentación (Acidogénesis).....	- 17 -
1.4.3. Acetogénesis.....	- 18 -
1.4.4. Metanogénesis.....	- 19 -
1.5. Sustratos para la biometanización.....	- 21 -
1.5.1. Residuos agrícolas empleados en la biometanización.....	- 22 -
1.5.2. Pretratamiento de residuos sólidos.....	- 23 -
1.5.3. Codigestión de residuos de biomasa.....	- 23 -
1.5.4. Sustancias inhibidoras de la biometanización.....	- 24 -
1.6. Tecnología de la biometanización.....	- 25 -

1.6.1.	Sistemas de digestión.....	- 25 -
1.6.2.	Puesta en marcha del proceso.....	- 26 -
1.6.3.	Parámetros operacionales.....	- 26 -
1.6.4.	Control del proceso.....	- 30 -
1.7.	Métodos de estudio de las comunidades microbianas.....	- 30 -
1.7.1.	Técnicas basadas en el cultivo de microorganismos.....	- 31 -
1.7.2.	Técnicas basadas en ácidos nucleicos.....	- 32 -
1.8.	Objetivos.....	- 34 -
PARTE I: Estudio de la microbiota nativa degradadora del residuo de cebolla.....		- 36 -
2.	Aislamiento y caracterización de bacterias aeróbicas degradadoras de cebolla.....	- 37 -
2.1.	Introducción.....	- 37 -
2.2.	Materiales y métodos.....	- 38 -
2.2.1.	Descripción de los sitios de muestreo y de los tratamientos.....	- 38 -
2.2.2.	Recuento de bacterias heterótrofas aerobias, hongos filamentosos y levaduras y aislamiento de cepas.....	- 39 -
2.2.3.	Desarrollo en medio de cultivo elaborado con extracto de cebolla.....	- 40 -
2.2.4.	Utilización de sustratos carbonados.....	- 40 -
2.2.5.	Catáfila de cebolla como fuente de nutrientes en medio base mineral..	- 41 -
2.2.6.	Análisis estadístico.....	- 42 -
2.2.7.	Identificación de los aislamientos.....	- 42 -
2.3.	Resultados.....	- 44 -
2.3.1.	Bacterias Heterótrofas Aerobias, Hongos y Levaduras.....	- 44 -
2.3.2.	Crecimiento en el medio de cebolla.....	- 45 -
2.3.3.	Patrones de utilización de sustratos carbonados.....	- 47 -
2.3.4.	Desarrollo con trozos de cebolla como fuente de nutrientes.....	- 51 -
2.3.5.	Identificación de las cepas.....	- 52 -
2.4.	Discusión.....	- 54 -
2.4.1.	BHA, hongos filamentosos y levaduras cultivables.....	- 54 -
2.4.2.	Desarrollo en medio de cultivo preparado con jugo de cebolla.....	- 55 -
2.4.3.	Perfiles de utilización de sustratos carbonados.....	- 56 -
2.4.4.	Selección de cepas degradadoras del residuo de cebolla.....	- 58 -

2.5. Conclusiones.....	- 59 -
3. Detección y aislamiento de bacterias celulolíticas anaerobias.....	- 61 -
3.1. Introducción.....	- 61 -
3.2. Materiales y métodos.....	- 64 -
3.2.1. Muestras utilizadas como fuente de microorganismos.....	- 64 -
3.2.2. Obtención de cultivos celulolíticos anaerobios.....	- 65 -
3.2.3. Verificación de la capacidad celulolítica en papel.....	- 65 -
3.2.4. Degradación de sustrato natural: catáfila de cebolla.....	- 66 -
3.2.5. Diferencia en el modo de degradación de la catáfila.....	- 66 -
3.2.6. Aislamiento de bacterias celulolíticas anaerobias esporuladas.....	- 67 -
3.2.7. Análisis filogenéticos de los aislamientos.....	- 67 -
3.3. Resultados.....	- 68 -
3.3.1. Detección de cultivos celulolíticos anaerobios.....	- 68 -
3.3.2. Verificación de la capacidad celulolítica en papel.....	- 68 -
3.3.3. Aislamiento de bacterias celulolíticas anaerobias esporuladas.....	- 69 -
3.3.4. Análisis de la capacidad celulolítica en catáfila.....	- 70 -
3.3.5. Diferencia en el modo de degradación de la catáfila.....	- 71 -
3.3.6. Identificación de las cepas integrantes de los cultivos degradadores.....	- 74 -
3.4. Discusión.....	- 77 -
3.5. Conclusiones.....	- 81 -
PARTE II: Estudios experimentales de la capacidad degradativa del residuo de cebolla bajo las condiciones de biometanización.....	- 82 -
4. Factibilidad de la degradación anaeróbica del residuo de cebolla y optimización de la etapa hidrolítica-acetogénica.....	- 83 -
4.1. Introducción.....	- 83 -
4.2. Materiales y métodos.....	- 86 -
4.2.1. Dinámica de las BSR y BNR en la biodegradación anaeróbica del residuo de cebolla.....	- 86 -
4.2.2. Estudio de variables para la optimización de la biodegradación anaeróbica de cebolla.....	- 87 -
4.2.3. Análisis estadístico.....	- 89 -
4.2.4. Análisis moleculares.....	- 90 -

4.2.5. Efecto de la sanidad del residuo sobre la presencia de BSR.....	- 95 -
4.3. Resultados y Discusión.....	- 96 -
4.3.1. Dinámica de las BSR y BNR.....	- 96 -
4.3.2. Métodos de optimización de la biodegradación anaeróbica de cebolla...	- 98 -
4.3.3. Resultados de los análisis moleculares.....	- 101 -
4.3.4. Efecto de la sanidad del residuo sobre la presencia de BSR.....	- 105 -
4.4. Conclusiones.....	- 105 -
5. Efecto de cargas sucesivas sobre la codigestión del residuo de cebolla con barros activados.....	- 107 -
5.1. Introducción.....	- 107 -
5.2. Materiales y métodos.....	- 109 -
5.2.1. Materias primas.....	- 109 -
5.2.2. Biorreactores.....	- 109 -
5.2.3. Procedimiento experimental.....	- 110 -
5.2.4. Análisis químicos.....	- 111 -
5.2.5. Análisis Moleculares.....	- 113 -
5.3. Resultados.....	- 114 -
5.3.1. Codigestión a 35 °C.....	- 114 -
5.3.2. Codigestión a 18 °C.....	- 120 -
5.3.3. Ensayos realizados en EEA INTA Ascasubi.....	- 126 -
5.4. Discusión.....	- 128 -
5.4.1. Codigestión a 35 °C.....	- 128 -
5.4.2. Codigestión a 18 °C.....	- 131 -
5.5. Conclusiones.....	- 133 -
6. Conclusiones generales y perspectivas futuras.....	- 134 -
Bibliografía.....	- 138 -
Anexos.....	- 154 -
Anexo I – Medios de cultivo.....	- 155 -
Anexo II - Alineamiento de las secuencias del gen ADNr 16S.....	- 157 -
Anexo III - Determinación de Sólidos Totales y Volátiles.....	- 171 -

Índice de figuras

1.1 Zonas productoras de cebolla en Argentina: ▲ norte, ▲ centro oeste y ▲ sur. Las principales áreas productoras de cebolla de la zona sur son el Valle Medio e Inferior del río Negro y el Valle Bonaerense del Río Colorado. Otras regiones de menor relevancia son el Valle de General Conesa, el Alto Valle del río Negro y Neuquén y la zona circundante a la localidad de Río Colorado.....	- 4 -
1.2 La cebolla cosechada se almacena en el campo en pilas que son cubiertas con nylon para protegerlas del clima y lograr una mejor conservación. En primer plano se observan los restos de hojas, tallos y bulbos pequeños que quedaron luego de desarmar una pila para embolsar las cebollas a campo.....	- 7 -
1.3 Acumulación de catáfilas durante el proceso de cepillado en el galpón de empaque.....	- 8 -
1.4 Acumulación de bulbos de descarte durante la etapa de selección en la planta de empaque.....	- 9 -
1.5 Las catáfilas y bulbos remanentes del procesado de la cebolla suelen ser incinerados en los galpones de empaque.....	- 10 -
1.6 Lote baldío, en la localidad de Hilario Ascasubi, con acumulación del descarte de la producción de cebolla, año 2010.....	- 10 -
1.7 Bidones de 200 l puestos para la generación de biofertilizante en la EEA INTA Hilario Ascasubi. Luego de doce meses no se observó degradación de los bulbos.....	- 11 -
1.8 Composición del biogás.....	- 15 -
1.9 Degradación anaeróbica de la materia orgánica en el interior del biorreactor para la formación de metano.....	- 21 -
1.10 En los digestores se producen diferentes capas como resultado de la degradación de la materia orgánica. Estas capas son (<i>de arriba hacia abajo</i>): biogás, espuma, sobrenadante, biomasa activa y sólidos estabilizados.....	- 25 -
2.1 Recuento de bacterias heterótrofas aerobias (BHA), hongos filamentosos (H) y levaduras (L) en el descarte de cebolla de las distintas localidades. <i>MB</i> Mayor Buratovich, <i>VL</i> Villalonga, <i>VE</i> Viedma.....	- 45 -

2.2 Crecimiento bacteriano en caldo nutritivo (CN) y medio de cebolla (MJC) a 4 y 28 °C luego de 7 días de incubación. En los gráficos se representa la cepa más cercana al valor medio de cada grupo. <i>Grupo 1</i> representa las cepas que desarrollaron mejor en CN; <i>Grupo 2</i> corresponde a las bacterias que lograron la misma turbidez en ambos medios; <i>Grupo 3</i> esquematiza las cepas que crecieron mejor en MJC; <i>Grupo 4</i> incluye a las bacterias que fueron capaces de desarrollar en ambos medios a 4 y 28 °C. La cepa VE-74 tuvo una respuesta de crecimiento única.....	- 46 -
2.3 Dendrograma mostrando la relación fenotípica, basado en la utilización de 20 fuentes carbonadas entre 29 cepas. El análisis de cluster se realizó con el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA) y la distancia Euclídea. El coeficiente de relación cofenética (r) fue 0,867.....	- 49 -
2.4 Curvas de crecimiento de las cepas MB2-5, MB1-42, MB1-46 y VE-74 utilizando trozos de cebolla como única fuente de nutrientes.....	- 51 -
2.5 Imágenes de trozos de cebolla con diferentes niveles de maceración del tejido tomadas con microscopio estereoscópico luego del ensayo de degradación: a control, b VE-74, c MB2-62 y d VL-80.....	- 52 -
2.6 Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados con los cebadores 38r y 72f. Todas las cepas amplificaron un patrón de bandas único. Agarosa 2 % (p/v) en buffer TAE 1x, teñido con GelRed. <i>M</i> marcador de peso molecular de 100 pb.....	- 53 -
3.1 Esquema del procedimiento desarrollado para la obtención de cultivos degradadores de celulosa.....	- 66 -
3.2 Vista del frasco de cultivo celular utilizado en el ensayo.....	- 67 -
3.3 Degradación del papel <i>tissue</i> por los cultivos. <i>De izquierda a derecha</i> , los tres primeros cultivos presentan degradación total del papel <i>tissue</i> , el último no fue capaz de degradarlo (la flecha azul indica el papel <i>tissue</i> sin degradar).....	- 69 -
3.4 Degradación de la catáfila por los cultivos hidrolíticos luego de 60 días de incubación a 28 °C. (A) Cultivo con degradación parcial, (B) control y (C) cultivo con degradación total.....	- 70 -
3.5 Cultivo con degradación parcial, se observa en la porción inferior de la catáfila, una zona más clara como consecuencia de la degradación.....	- 71 -
3.6 Desarrollo del cultivo hidrolítico en catáfila como única fuente de carbono. <i>Izquierda</i> : cultivo luego de la inoculación. <i>Derecha</i> : luego de 10 días de incubación a 28 °C la catáfila presenta degradación.....	- 72 -
3.7 Cultivo con degradación de catáfila en capas. Se indica con una flecha la lámina transparente que se desprende de la catáfila.....	- 72 -
3.8 Cultivo con degradación con acumulación de cristales. Se observa depósito de cristales en la pared inferior del frasco.....	- 73 -
3.9 Cultivo con degradación en nube. Como consecuencia de la degradación se forma una masa con coloración marrón-rojiza alrededor de la catáfila.....	- 73 -

3.10 Degradación de la catáfila luego de 60 días de incubación a 28 °C. Se muestran los cultivos con mejor performance en la degradación, a) control, b) cultivo B, c) cultivo E, d) cultivo D y e) cultivo V.....	- 74 -
3.11 Árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias del 16S rDNA que muestra la relación entre las cepas aisladas y las bacterias con mayor similitud según el análisis BLAST. Se utilizó <i>Escherichia coli</i> como <i>outgroup</i> . Las secuencias de referencia fueron obtenidas de GenBank (N° Acceso entre paréntesis). El árbol se construyó utilizando el método del vecino más cercano (ligamiento simple) siguiendo el análisis de distancia de las secuencias alineadas. La escala representa 0,05 sustituciones por nucleótido. Los valores del análisis <i>bootstrap</i> mayores al 70 % se muestran en los nodos.....	- 76 -
4.1 Diseño experimental.....	- 89 -
4.2 Se analizaron cebollas en dos estados sanitarios diferentes. a) Vista externa de cebolla sana, b) vista externa de cebolla con bacteriosis, c) vista interna de cebolla sana y d) vista interna de cebolla con bacteriosis.....	- 95 -
4.3 Tratamientos BC y BU al final del ensayo.....	- 96 -
4.4 Tratamientos al inicio del ensayo. <i>De izquierda a derecha</i> , MR-C, MR-I y MR-IU.....	- 98 -
4.5 Tratamientos MR-C, MR-I y MR-IU a los 42 días del ensayo. Se aprecia la licuefacción solo en el tratamiento MR-IU.....	- 100 -
4.6 Dendrograma basado en las curvas densitométricas de los perfiles de la comunidad de <i>Eubacteria</i> de los biorreactores. El análisis se realizó con la correlación de Pearson y se utilizó el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA). En cada nodo, el número del lado izquierdo indica el valor de similitud y el número a la derecha la correlación cofenética.....	- 104 -
5.1 Sifón plástico utilizado como biorreactor.....	- 110 -
5.2 Esquema de los tratamientos diseñados para el ensayo de codigestión. Se expresa la proporción de los sustratos en función del volumen de trabajo del reactor.....	- 111 -
5.3 Sifón conectado a un mechero de Bunsen para comprobar la producción de gas inflamable.....	- 113 -
5.4 Volumen total de biogás producido en cada carga de los biorreactores a 35 °C. Los valores corresponden a la media de las repeticiones. En azul se representan las codigestiones con barro activado vacuno (<i>V</i>) y en verde con barro activado porcino (<i>P</i>). Los números entre paréntesis corresponden a los distintos ensayos: (1) carga inicial, (2) segunda carga, (3) tercera carga.....	- 116 -
5.5 Tratamiento V al inicio (<i>derecha</i>) y final (<i>izquierda</i>) de la primera carga. Se observa la degradación del residuo de cebolla luego de 77 días de ensayo.....	- 116 -

5.6 Dendrograma basado en las curvas densitométricas de los perfiles de la comunidad de <i>Eubacteria</i> de los biorreactores incubados a 35 °C y de los barros inoculados. El análisis se realizó con la correlación de Pearson y se utilizó el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA). En cada nodo, el número del lado izquierdo indica el valor de similitud y el número a la derecha la correlación cofenética. <i>BV</i> barro activado con estiércol vacuno; <i>BP</i> barro activado con estiércol porcino; <i>V</i> codigestión de cebolla con BV; <i>P</i> codigestión de cebolla con BP; <i>1</i> carga inicial; <i>2</i> segunda carga; <i>3</i> tercera carga; <i>i</i> muestreo inicial; <i>f</i> muestreo final.....	- 119 -
5.7 Volumen total de biogás producido en cada carga de los biorreactores a 18 °C. Los valores corresponden a la media de las repeticiones. En azul se representan las codigestiones con barro activado vacuno (<i>V</i>) y en verde con barro activado porcino (<i>P</i>). Los números entre paréntesis corresponden a los distintos ensayos: (<i>1</i>) carga inicial, (<i>2</i>) segunda carga, (<i>3</i>) tercera carga.....	- 121 -
5.8 Tratamiento <i>V</i> al inicio (<i>derecha</i>) y final (<i>izquierda</i>) de la primera carga. La degradación del residuo de cebolla no es completa luego de 77 días de ensayo.....	- 121 -
5.9 Tratamiento <i>V</i> al final de la tercera carga. Se observa que el residuo de cebolla no fue degradado durante el período de ensayo.....	- 122 -
5.10 Dendrograma basado en las curvas densitométricas de los perfiles de la comunidad de <i>Eubacteria</i> de los biorreactores incubados a 18 °C y de los barros inoculados. El análisis se realizó con la correlación de Pearson y se utilizó el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA). En cada nodo, el número del lado izquierdo indica el valor de similitud y el número a la derecha la correlación cofenética. <i>BV</i> barro activado con estiércol vacuno; <i>BP</i> barro activado con estiércol porcino; <i>V</i> codigestión de cebolla con BV; <i>P</i> codigestión de cebolla con BP; <i>1</i> carga inicial; <i>2</i> segunda carga; <i>3</i> tercera carga; <i>i</i> muestreo inicial; <i>f</i> muestreo final.....	- 125 -
5.11 Biorreactores utilizados en los ensayos realizados en la EEA INTA Ascasubi. <i>Izquierda</i> Erlenmeyers conectados a una columna de agua para medición diaria de la producción de biogás; <i>derecha</i> los reactores se colocaron en bateas para lograr la digestión a 35 °C.....	- 127 -
5.12 Acumulación de biogás durante la codigestión del residuo de cebolla con barro activado. <i>Leyenda</i> : se indica el número de ensayo delante del tratamiento y detrás la proporción de barro utilizada. <i>BV</i> barro activado con estiércol vacuno; <i>BR</i> barro formado durante la digestión del primer ensayo.....	- 127 -

Índice de tablas

1.1 Composición química cada 100 g de cebolla fresca.....	- 5 -
1.2 Resumen de los principales requerimientos de las etapas de la biometanización.....	- 29 -
2.1 Sustratos carbonados incluidos en las microplacas clasificados de acuerdo a su naturaleza química.....	- 41 -
2.2 Condiciones de PCR para la amplificación del ITS.....	- 43 -
2.3 Número de cepas por grupo de crecimiento y localidad de procedencia.....	- 47 -
2.4 Utilización de sustratos carbonados (SC) por clusters y cepas <i>outlier</i>	- 50 -
3.1 Composición de los cultivos con mejor capacidad de degradación de la catáfila en anaerobiosis.....	- 75 -
4.1 Composición (% del volumen de trabajo del reactor) de los tratamientos evaluados en el ensayo.....	- 86 -
4.2 Composición (% del volumen de trabajo del reactor) de los tratamientos.....	- 88 -
4.3 Composición (% del volumen de trabajo del reactor) de los tratamientos.....	- 89 -
4.4 Secuencias de los cebadores empleados en el método PCR para la amplificación de genes de función.....	- 91 -
4.5 Condiciones de PCR para la amplificación de los genes <i>dsrAB</i> , <i>narG</i> , <i>FTHFS</i> y <i>mcrA</i>	- 92 -
4.6 Cebadores y condiciones de PCR para la amplificación de la región V6 - V8 del 16S ARNr.....	- 94 -
4.7 Recuento de BSR y BNR en los distintos tratamientos, expresado en Log ₁₀ NMP. Los valores corresponden a la media de las repeticiones.....	- 97 -
4.8 Porcentaje de reducción de sólidos totales (ST) y volátiles (SV) y pH de cada tratamiento.....	- 101 -

4.9 Fragmentos amplificados (pb) mediante PCR de los genes de función	- 102 -
5.1 Resultados de la digestión anaeróbica de cebolla con barro activado vacuno (V) y con barro activado porcino (P) a 35 °C. Se muestran los valores medios de cuatro repeticiones y los errores estándar.....	- 117 -
5.2 Fragmentos amplificados (pb) del gen <i>mcrA</i> en los biorreactores incubados a 35 °C.....	- 118 -
5.3 Resultados de la digestión anaeróbica de cebolla con barro activado vacuno (V) y con barro activado porcino (P) a 18 °C. Se muestran los valores medios de cuatro repeticiones y los errores estándar.....	- 123 -
5.4 Fragmentos amplificados (pb) del gen <i>mcrA</i> en los biorreactores incubados a 18 °C.....	- 124 -

Capítulo I

Introducción general

1.1. Antecedentes

1.1.1. La problemática de los residuos orgánicos

Cada año se producen millones de toneladas de residuos sólidos orgánicos debido a la actividad antropogénica mundial. Gran parte de los desechos provenientes de la agricultura, la industria y los municipios no reciben un tratamiento y se acumulan en el ambiente. Esto resulta en la producción de gases nauseabundos, diseminación de patógenos y pérdidas de nutrientes los cuales contaminan el suelo, el agua y el aire. Además, como consecuencia de la descomposición de la materia orgánica (MO) en condiciones no controladas, se emite metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) a la atmósfera, contribuyendo al calentamiento global. Las corrientes de residuos orgánicos no sólo representan una amenaza para la calidad del medio ambiente, sino que también son una potencial fuente de energía que se desperdicia a pesar de ser un recurso renovable, económico y abundante en gran parte del mundo (Baldasano y Soriano 2000; Chynoweth *et al.* 2001).

Con el incremento de los niveles de producción de residuos y de la concientización del impacto ambiental, cada vez es más frecuente la búsqueda de alternativas eficientes para el tratamiento y eliminación de los desechos orgánicos.

1.1 Antecedentes

La biomasa puede ser convertida en diferentes formas de energía, como calor (a través de la quema), vapor de agua, electricidad, hidrógeno, etanol, metanol y CH₄. La elección del método de conversión debe basarse siempre en la máxima seguridad, el mínimo impacto ambiental, en la valorización de los residuos y en el uso de los productos finales. Bajo la mayoría de las circunstancias, la producción de CH₄ es la solución ideal debido a que este proceso permite reducir la cantidad de residuos destinados a los rellenos sanitarios, producir energía y reciclar la MO y los nutrientes nuevamente al suelo. Otros beneficios ambientales son la disminución de olores, el control de patógenos y la reducción de emisiones de gases de efecto invernadero (Ahring 2003; Braun 2007; Chynoweth *et al.* 2001; Vaneeckhaute *et al.* 2013). La utilización de los residuos orgánicos como fuente de energía ayuda al reciclaje del CO₂ atmosférico, debido a que la biomasa libera durante su combustión la misma cantidad de CO₂ que absorbió durante su crecimiento, por lo que no contribuye al efecto invernadero. Simultáneamente, la producción de biocombustibles podría mitigar los niveles de CO₂ en la atmósfera a través de la sustitución de los combustibles fósiles y proporcionar nuevas oportunidades de ingresos y empleo en las zonas rurales. Por lo tanto, existe interés en la producción y uso de combustibles originados a partir de desechos orgánicos para alcanzar un desarrollo sustentable de la economía y de la sociedad (Chandra *et al.* 2012).

1.2. Residuo de la producción de cebolla

1.2.1. Producción de cebolla a nivel mundial

La cebolla (*Allium cepa* L) es una hortaliza de importancia socioeconómica, alimenticia y medicinal a nivel global. En el mundo, la superficie anual dedicada al cultivo de cebolla ronda las 3,5 millones de hectáreas, con una producción de 61,1 millones de toneladas métricas de cebolla fresca (17,5 t·ha⁻¹), y un consumo aparente per cápita de 10,5 kilogramos habitante⁻¹ año⁻¹ (Medina 2008).

La cebolla ocupa el segundo lugar, por el volumen producido, entre las principales hortalizas a nivel mundial. Esta especie solo es superada en superficie

1.2 Residuo de la producción de cebolla

de siembra por el tomate. La producción de América Latina representa el 9 % del total y los países más importantes son Méjico, Brasil, Argentina, Colombia y Chile (Galmarini 1997).

1.2.2. Producción de cebolla en Argentina

En el país se cultivan alrededor de 19.000 hectáreas de cebolla con una producción que supera las 500.000 toneladas. Esta superficie incluye cebollas de días cortos, intermedios y largos (Funbapa 2012; Galmarini 1997).

Argentina es uno de los principales exportadores mundiales de cebolla por el volumen comercializado, ocupando entre el séptimo y décimo lugar de acuerdo al año según los datos de FAO (2013). La cebolla es la principal hortaliza argentina de exportación en volumen, con 250.000 toneladas en 2010 y tercera en valor, con 106 millones de U\$S en ese mismo año (primero ajo con 186 y luego poroto con 127 millones de U\$S respectivamente). La totalidad de la producción se destina a consumo fresco, comercializándose tanto en el mercado interno como en el externo. El principal destino histórico de las exportaciones de cebolla es Brasil, seguido por la Unión Europea y luego otros países de Sudamérica.

1.2.2.1. Áreas de cultivo

En Argentina hay tres grandes zonas productoras de cebolla (Fig. 1.1):

- a) *Zona norte*: abarca las provincias de Santiago del Estero, Catamarca, Salta y Córdoba. La superficie cultivada tiene una media de 3.000 ha año⁻¹.
- b) *Zona centro oeste*: comprende las provincias de San Juan y Mendoza. Se cultivan alrededor de 3.600 ha de cebolla.
- c) *Zona sur*: incluye las provincias de Buenos Aires (13.800 ha) y Río Negro (4.800 ha) (Funbapa 2012; Galmarini 1997).

Particularmente, el sur de la provincia de Buenos Aires y el Alto Valle, Valle Medio e Inferior del Río Negro, se encuentran dentro de la Región Protegida Patagónica. Esta región posee estatus zoo y fitosanitarios diferenciados del resto del país (área libre de mosca de los frutos y de fiebre aftosa), lo que permite la comercialización de su producción en los mercados internacionales.

1.2 Residuo de la producción de cebolla

En el sur de la provincia de Buenos Aires se encuentra el Valle Bonaerense del Río Colorado (VBRC) (Fig. 1.1), conformado por las localidades de Mayor Buratovich, Hilario Ascasubi, Pedro Luro (partido de Villarino), Juan A. Pradere y Villalonga (partido de Patagones). El VBRC es el principal productor de cebolla en el país, donde se cultivan anualmente entre 7.000 y 15.000 ha de cebolla. En esta región se produce más del 50 % de la cebolla que se consume en Argentina y más del 80 % de la destinada a exportación.

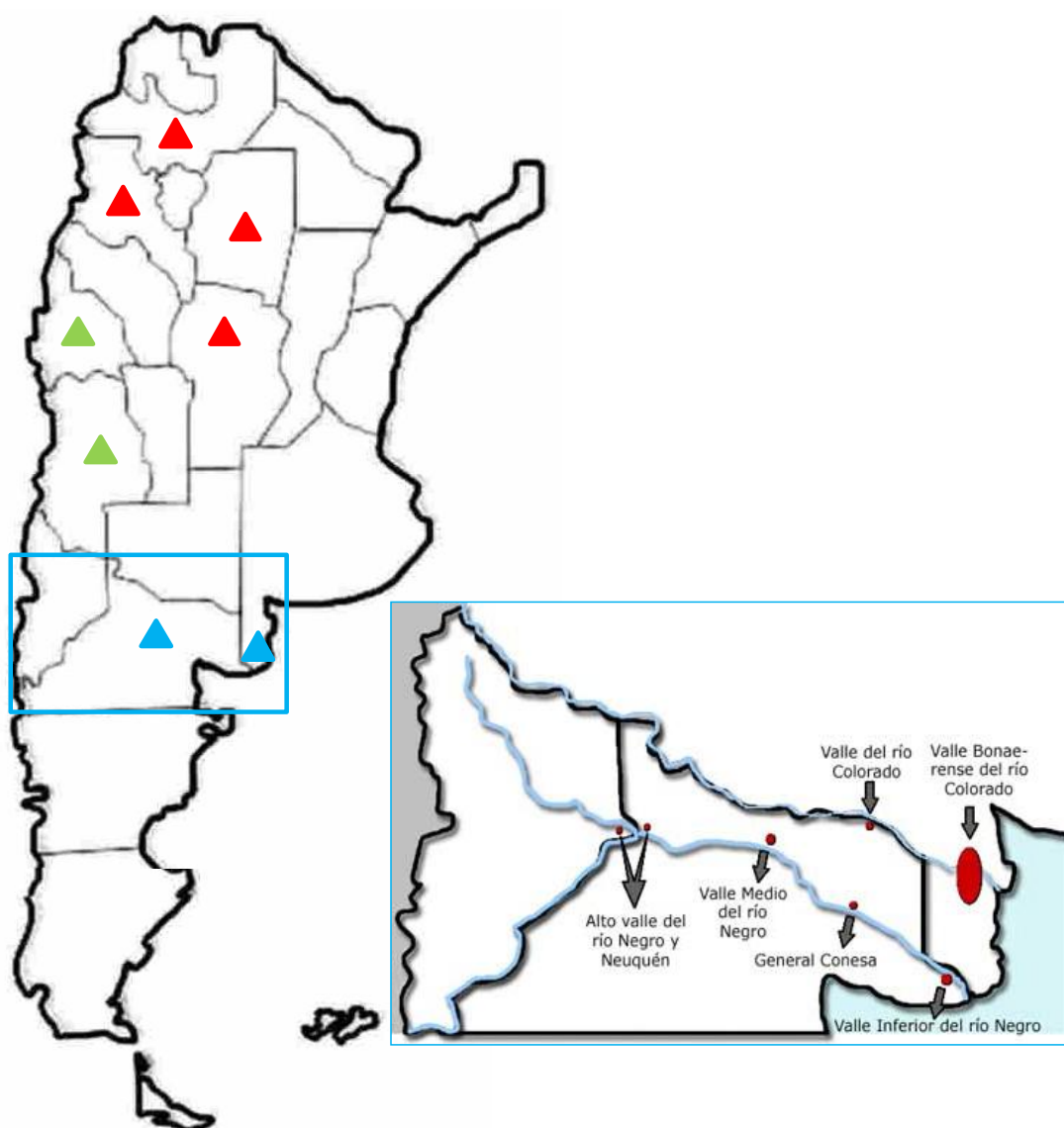


Figura 1.1 Zonas productoras de cebolla en Argentina: ▲ norte, ▲ centro oeste y ▲ sur. Las principales áreas productoras de cebolla de la zona sur son el Valle Medio e Inferior del río Negro y el Valle Bonaerense del Río Colorado. Otras regiones de menor relevancia son el Valle de General Conesa, el Alto Valle del río Negro y Neuquén y la zona circundante a la localidad de Río Colorado

1.2 Residuo de la producción de cebolla

1.2.2.2. Variedades

Los cultivares más utilizados en el VBRC corresponden a días largos, principalmente Valcatorce INTA (abarca más del 80 % de la superficie cultivada) y en menor medida Grano de oro, Cobriza INTA y Valuno INTA. En menor proporción se siembran cultivares de días intermedios, del tipo Torrentinas (Navideña INTA) (Funbapa 2012; Galmarini *et al.* 2003). Por su color, las cebollas se pueden clasificar en amarillas, blancas y rojas. En la zona del VBRC, las cebollas sembradas en mayor proporción son las denominadas amarillas, que presentan las hojas protectoras o catáfilas externas de color anaranjado (Funbapa 2012).

1.2.2.3. Características de la cebolla

La composición nutricional de la cebolla varía de acuerdo al cultivar, la sección del bulbo, las condiciones de crecimiento y la duración y tipo de almacenamiento. En general, la cebolla presenta entre 80-95 % de agua y tiene un contenido moderadamente alto de azúcares y fibra (Tabla 1.1). Los carbohidratos no estructurales componen el 65-80 % del peso seco y están constituidos fundamentalmente por glucosa, fructosa y sacarosa. La cebolla tiene también una importante cantidad de fibra dietaria total y una alta proporción de fibra insoluble. La fibra dietaria total decrece desde la parte exterior del bulbo a la interior (Benítez *et al.* 2011; Jaime *et al.* 2001; Jaime *et al.* 2002). Además de las mencionadas características, la cebolla posee pH ácido, el cual varía entre 4 y 5 de acuerdo a las condiciones del bulbo.

Tabla 1.1 Composición química cada 100 g de cebolla fresca

Compuesto	Gramos
Agua	89
Carbohidratos	8,6
Fibra	1,8
Lípidos	0,16
Potasio	0,157
Azufre	0,07
Calcio	0,02
Fósforo	0,033

1.2 Residuo de la producción de cebolla

La cebolla, al igual que todos los cultivos del género *Allium*, contiene gran cantidad de compuestos azufrados, responsables de sus aromas fuertes y penetrantes. Este tipo de aromas sólo se ponen de manifiesto cuando se destruyen los tejidos y la enzima alliinasa entra en contacto con los precursores del sabor S-alquencil-cisteín-sulfóxidos (ACSOs), convirtiéndolos en compuestos olorosos (Griffiths *et al.* 2002; Rose *et al.* 2005). El mayor contenido de azufre se encuentra en las hojas internas y el menor en las catáfilas externas. El azufre es incorporado en los precursores del sabor de las cebollas (Benítez *et al.* 2011).

Se ha comprobado que extractos de cebolla tienen actividad antifúngica, antibacteriana, antiparasitaria y antiviral, siendo los compuestos azufrados los principales agentes antimicrobianos (Corzo-Martínez *et al.* 2007; Rose *et al.* 2005; Zohri *et al.* 1995).

1.2.2.4. Tecnología de cultivo y principales aspectos de manejo

La siembra de las variedades de días largos se efectúa desde mediados de agosto hasta mediados de septiembre y la de días intermedios en junio. Esta labor se realiza principalmente con sembradoras que simultáneamente realizan las tareas de rotocultivado, formación de la cama, fertilización y siembra. En el VBRC se ha generalizado el sistema de siembra a cuatro caras, es decir cuatro hileras sobre el camellón. Sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a sembrar en platabanda o tablón, con diez o doce hileras contiguas. La densidad de siembra por hectárea varía entre 4 y 6 kg para siembras en surco y entre 6 y 8 kg para siembras en platabanda. En 2013 se sembraron aproximadamente 10.563 ha de cebolla, de las que 4.624 ha fueron en surco y 4.265 ha en tablón.

El riego se realiza principalmente por gravedad mediante sifones de 3 pulgadas, mientras que algunos pocos productores usan aspersión. La cosecha se realiza desde diciembre (para las variedades tempranas) hasta mediados de marzo. Tradicionalmente, la recolección se realiza en forma manual, sin embargo, últimamente se ha observado un aumento en el uso de cosechadoras mecánicas. La cebolla se almacena habitualmente a campo, formando “pilas” o “ballenas” que se cubren con nylon para protegerlas de las inclemencias del tiempo (Fig. 1.2). Si

1.2 Residuo de la producción de cebolla

bien este almacenaje es económicamente muy viable, presenta una serie de factores, como enfermedades fúngicas de postcosecha, que lo hacen ineficiente (Becker 1997; Funbapa 2012).

La cebolla se comercializa en el mercado interno durante todo el año. La exportación se inicia en el mes de marzo, alcanza los mayores volúmenes en los meses de abril a mayo y comienza a decrecer a partir de junio, finalizando generalmente en el mes de septiembre. En los dos últimos meses del año sólo hay comercialización para consumo interno.



Figura 1.2 La cebolla cosechada se almacena en el campo en pilas que son cubiertas con nylon para protegerlas del clima y lograr una mejor conservación. En primer plano se observan los restos de hojas, tallos y bulbos pequeños que quedaron luego de desarmar una pila para embolsar las cebollas a campo

1.2 Residuo de la producción de cebolla

1.2.3. Problemática ambiental de la producción de cebolla en el VBRC

En esta región, la producción de cebolla genera residuos constituidos por restos de hojas, tallos, raíces, catáfilas y bulbos descartados por su forma, tamaño o estado sanitario. Se estima que se descartan entre 12.000 a 20.000 toneladas de desechos anualmente.

Existen dos situaciones principales de generación de residuos. La primera es la producida en los lotes cosechados, donde la cebolla se acondiciona *in situ* para ser comercializada en el mercado interno o para ser trasladada a los galpones de empaque para su posterior procesamiento para exportación. Cualquiera sea el destino, los tallos, raíces, catáfilas y demás restos quedan en el lote. La segunda situación se origina en las plantas de empaque, donde los residuos generados son básicamente catáfilas y bulbos de descarte. Estos se acumulan en diferentes etapas del proceso de empaque, las catáfilas principalmente en la zona de cepillado (Fig. 1.3) y los bulbos en la línea de descarte (Fig. 1.4).



Figura 1.3 Acumulación de catáfilas durante el proceso de cepillado en el galpón de empaque

1.2 Residuo de la producción de cebolla



Figura 1.4 Acumulación de bulbos de descarte durante la etapa de selección en la planta de empaque

En general, estos residuos son una fuente de contaminación ambiental ya que son quemados en el campo o en las plantas de empaque (Fig. 1.5). También suelen ser abandonados en el lugar de producción, trasladados a rellenos sanitarios o incorporados en terrenos cercanos a los galpones (Fig. 1.6). En esta última modalidad, los residuos son esparcidos sobre el terreno a la intemperie, donde se deshidratan, su volumen disminuye y finalmente se incorporan al suelo. Estas formas arbitrarias de descarte causan además serios inconvenientes a las poblaciones aledañas debido a que provocan malos olores y aparición de insectos.

1.2 Residuo de la producción de cebolla



Figura 1.5 Las catáfilas y bulbos remanentes del procesado de la cebolla suelen ser incinerados en los galpones de empaque



Figura 1.6 Lote baldío, en la localidad de Hilario Ascasubi, con acumulación del descarte de la producción de cebolla, año 2010

1.2 Residuo de la producción de cebolla

1.2.3.1. Alternativas de manejo del residuo de la producción de cebolla

Se han planteado diferentes estrategias para solucionar los inconvenientes producidos por el descarte de cebolla y proporcionarle una reutilización adecuada al residuo.

Martínez *et al.* (2008) evaluaron el compostaje del residuo del procesamiento de cebolla generado en la localidad de Viedma, provincia de Río Negro. Para realizar el compostaje, mezclaron estos residuos junto con estiércol bovino y alfalfa como agentes estructurantes. Estos autores lograron convertir estos residuos en compost luego de 223 días de ensayo. Posteriormente se comprobó que el compost obtenido puede ser utilizado como enmienda orgánica en agricultura (Cardoso *et al.* 2015; Pellejero *et al.* 2015) y como sustrato en la producción de plantines hortícolas (Miglierina *et al.* 2011).

En la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Hilario Ascasubi se probó la producción de biofertilizante a partir de los bulbos de descarte. Para ello se instalaron en el campo de la experimental, bidones de 200 l a los que se incorporaron bulbos enteros y agua. Los bidones se cerraron herméticamente y se mantuvieron por un período de doce meses en el que no se observó degradación del residuo (Fig. 1.7) (Ing. Agr. Andrea Mairosser, com. pers.).



Figura 1.7 Bidones de 200 l puestos para la generación de biofertilizante en la EEA INTA Hilario Ascasubi. Luego de doce meses no se observó degradación de los bulbos

1.2 Residuo de la producción de cebolla

Estas dos alternativas de reutilización no son viables para el residuo de la producción de cebolla del VBRC. En primer lugar, los plazos de degradación son demasiado largos en función del volumen y la rapidez de generación del descarte. Conjuntamente, la composición del residuo generado en la región del Valle de Río Negro es diferente a la del VBRC, lo que modifica el compostaje. Los desechos del Valle de Río Negro están compuestos principalmente por catáfilas, en cambio los del VBRC están formados principalmente por bulbos. Esto tiene como consecuencia que el compostaje sea más dificultoso y necesite la incorporación de mayor proporción de agentes estructurantes. Además, el cortado del bulbo libera mucho líquido lo que causa que el residuo se comprima, formando una costra que impide el correcto armado y funcionamiento de la pila de compostaje.

El aprovechamiento y la valorización de los residuos de la producción de cebolla constituyen un reto que requiere una solución rápida y práctica para dar respuesta a la industria agroalimentaria y para el beneficio de la comunidad y el medioambiente.

1.3. Biodegradación de la materia orgánica

El ciclo de los nutrientes esenciales para la vida depende tanto de la actividad de los microorganismos como de los macroorganismos, sin embargo son los primeros los que dominan estos procesos. Durante la biodegradación, tanto aerobia como anaerobia, toda la MO pasa a través del *pool* de descomposición microbiano. Los microorganismos tienen un rol principal en el reciclado de la MO, por lo cual es necesario facilitar su actividad para asegurar que actúen de un modo rápido y apropiado. Para ello, es importante comprender el funcionamiento del reciclado de nutrientes por los microorganismos debido a que son fundamentales para la agricultura y para una vida sustentable en el planeta (Insam *et al.* 2010; Madigan *et al.* 2010).

La descomposición de la MO genera subproductos útiles. El tipo de subproducto depende de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la descomposición. Ésta puede producirse tanto bajo condiciones aeróbicas como

1.3 Biodegradación de la materia orgánica

anaeróbicas. Ambos procesos naturales pueden ser imitados y acelerados por el hombre. La *descomposición aeróbica* puede ser lograda en pilas de compostaje a cielo abierto, mientras que la *descomposición anaeróbica* se alcanza en digestores herméticos, llamados **biorreactores** (Fry y Merrill 1973).

El proceso de compostaje ha sido descrito en diversos libros y artículos (Fogarty y Tuovinen 1991; Insam *et al.* 2002; Kutzner 2008; Schuchardt 2005; Sharma *et al.* 1997; Shilev *et al.* 2007). Bajo condiciones aeróbicas, la degradación de la MO es un proceso exotérmico durante el cual el oxígeno actúa como un aceptor final de electrones y la MO se transforma en CO₂, agua, minerales y MO estabilizada (compost con un alto contenido de ácidos húmicos). La transformación de la MO en compost tiene varias ventajas: elimina la fitotoxicidad y los patógenos de la MO no estabilizada y produce un material orgánico estable, rico en nutrientes y carbono (C) que puede ser utilizado para mejorar y mantener la calidad y la fertilidad del suelo (Gómez-Brandón *et al.* 2013; Insam *et al.* 2010).

1.3.1. Ecología de la degradación anaerobia de la materia orgánica

La estrecha asociación entre el material vegetal en descomposición y la generación de “aire inflamable” fue descrita por primera vez en 1776 por Alessandro Volta. Este físico italiano informó que el gas liberado luego de perturbar pantanos y sedimentos de lagos producía una llama azul al encenderlo con una vela. Posteriormente, Antoine Béchamp fue el primero en establecer que la metanogénesis era un proceso microbiano (Sowers 2009).

La **metanogénesis** es la transformación biológica mediante la cual la MO se degrada a CH₄ y CO₂ en condiciones anaeróbicas. El paso final de esta transformación es catalizado exclusivamente por las arqueas metanogénicas (**AM**). Aunque estos procariotas requieren condiciones anaeróbicas para crecer, la metanogénesis es ubicua en el medio ambiente y tiene un rol importante en el ciclo global del C (Sowers 2009). En general se pueden distinguir dos tipos de ecosistemas naturales metanogénicos. El primer tipo de ecosistema existe en pantanos (Amaral y Knowles 1994), sedimentos acuáticos (Wang *et al.* 2010), marismas y suelos anegados (Oremland *et al.* 1982), donde los polímeros de las

1.3 Biodegradación de la materia orgánica

plantas son completamente convertidos en CH_4 y CO_2 . El segundo tipo, una conversión parcial, está presente en el tracto intestinal de animales y artrópodos y en el rumen de los rumiantes, donde se producen cantidades significativas de ácidos grasos de cadena corta como ácido acético, propiónico y butírico. Estos productos de la fermentación son absorbidos por el torrente sanguíneo y sirven como fuente de energía al hospedador. El hidrógeno (H_2) producido durante las reacciones de fermentación es usado por las AM para reducir el CO_2 a CH_4 (Mizrahi 2013). La principal diferencia entre los dos ecosistemas es el tiempo de reciclaje. En los sedimentos, el tiempo de reciclado para la degradación completa de los polímeros vegetales ricos en lignocelulosa a CH_4 puede ser de una semana a meses. En cambio, en el tracto gastrointestinal de mamíferos herbívoros e insectos, el tiempo de reciclado es de aproximadamente uno a dos días. Los productos finales en este último caso son los ácidos grasos de cadena corta (Wuhrmann 1982).

Adicionalmente a la metanogénesis de los sistemas naturales, se produce CH_4 a través de las actividades humanas en rellenos sanitarios, biorreactores, arrozales y por la cría de ganado (Braun 2007).

1.4. Microbiología de la biometanización

La aplicación técnica de la metanogénesis en un biorreactor se conoce como **biometanización**. Dentro del reactor, la metanogénesis es realizada por una mezcla compleja de microorganismos simbióticos, que bajo condiciones anaeróbicas, transforman la MO soluble principalmente en CH_4 , CO_2 , nutrientes y 5-10 % de nuevo material celular. El producto principal de este proceso es una mezcla de gases, denominado **biogás**, compuesto principalmente de CH_4 y CO_2 con trazas de sulfuro de hidrógeno (H_2S) y vapor de agua (Fig. 1.8). Las sales y la materia orgánica e inorgánica refractaria quedan como subproductos y permanecen, junto con la nueva masa de células, como residuo de la fermentación, conocido como **digerido** (Braun 2007; Chynoweth *et al.* 2001).

1.4 Microbiología de la biometanización

El término **digestión anaeróbica (DA)** se utiliza ampliamente como sinónimo de biometanización, aunque puede dar lugar a confusión debido a que no todos los procesos de digestión anaeróbica implican estrictamente la generación de CH_4 (Braun 2007).

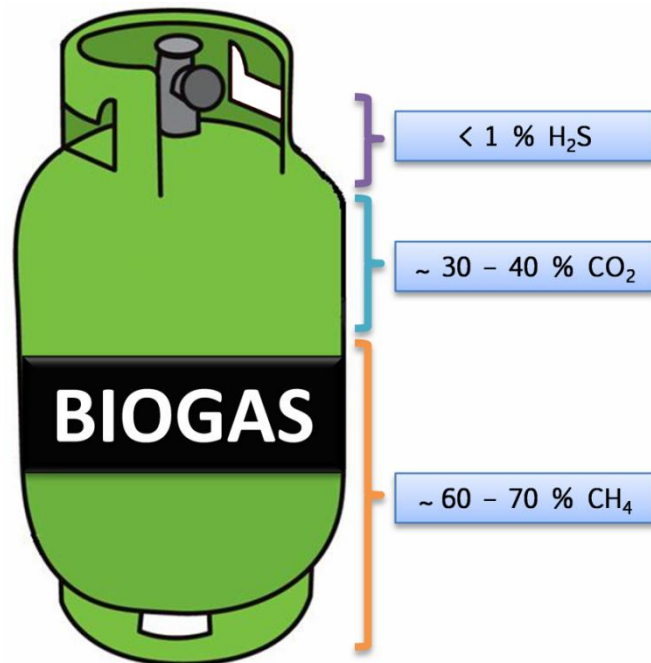


Figura 1.8 Composición del biogás

La degradación anaeróbica de la MO se caracteriza por ser el resultado de múltiples y recíprocas interacciones entre distintos consorcios microbianos con diferentes roles. Los distintos grupos de microorganismos actúan en forma secuencial y paralela, siendo los productos de un grupo el sustrato para el siguiente. Al menos cuatro grupos metabólicos pueden distinguirse: hidrolíticos, fermentativos, acetogénicos y metanogénicos. Las diferentes etapas de la biometanización se describen a continuación.

1.4.1. Hidrólisis

En el primer paso de la cadena alimentaria anaerobia, los biopolímeros (polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) son depolimerizados e hidrolizados a compuestos monoméricos solubles (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, purinas y pirimidinas) que pueden ser absorbidos por las bacterias (Fig. 1.9).

1.4 Microbiología de la biometanización

Una comunidad compleja de hongos y bacterias fibrolíticos producen enzimas hidrolíticas extracelulares (ej. celulasas, xilanasas, proteasas, lipasas) que se unen para degradar los biopolímeros en sus unidades estructurales (Gerardi 2003; Insam *et al.* 2010).

La primera etapa del proceso es muy importante debido a que los compuestos orgánicos complejos insolubles (como la celulosa, proteínas y lípidos) no pueden ser absorbidos y utilizados directamente por los microorganismos como sustrato. La tasa de descomposición durante la etapa de hidrólisis depende en gran medida de las características físicas y químicas del sustrato. Los polisacáridos, particularmente la celulosa, son los componentes estructurales y de reserva más abundantes de la biomasa. Por lo tanto su hidrólisis es uno de los procesos enzimáticos más importantes que determinan la eficacia de los reactores anaeróbicos. En general, la hidrólisis de polisacáridos procede lentamente bajo condiciones anaeróbicas debido a la heterogeneidad de formas en las que la celulosa está presente en la naturaleza. La velocidad y eficiencia de la hidrólisis de celulosa está relacionada, entre otros factores, con la composición particular de especies microbianas, ya que los organismos celulolíticos difieren en el tiempo de generación y en el nivel de producción y actividad de sus enzimas (Béguin y Aubert 1994; Deublein y Steinhauser 2008; Insam *et al.* 2010; Noike *et al.* 1985; Schnürer y Jarvis 2010). Debido a que la hidrólisis frecuentemente es la etapa limitante del proceso, varias estrategias de optimización del proceso de DA buscan fomentar la producción y actividad de enzimas extracelulares o incluir un pretratamiento térmico o mecánico (Mata-Alvarez *et al.* 2000).

Los hongos hidrolíticos anaeróbicos son de lento crecimiento comparados con las bacterias y, por lo tanto, son menos abundantes en los reactores anaerobios. En cambio, las bacterias hidrolíticas son extremadamente diversas en los biorreactores, lo que refleja su flexibilidad metabólica. Representantes de los géneros *Clostridium*, *Acetivibrio*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Selenomonas* y *Ruminococcus* suelen estar presentes en la primera fase del proceso. Algunos de estos microorganismos poseen, en la pared celular, celulosomas en los que se agrupan diferentes enzimas. Además, los celulosomas contienen proteínas que

1.4 Microbiología de la biometanización

tienen la capacidad de unirse a la celulosa, lo que hace que la descomposición sea más eficiente (Insam *et al.* 2010; Schnürer y Jarvis 2010).

La dinámica de los grupos fisiológicos bacterianos está normalmente asociada a la descomposición del residuo. Incluso bajo condiciones estables del funcionamiento del biorreactor, las poblaciones bacterianas son muy dinámicas, probablemente debido a la redundancia funcional, permitiendo oscilaciones entre los grupos filogenéticos sin producir cambios en el rendimiento del reactor. Además, es importante destacar, que los mismos microorganismos participan en diferentes etapas, por ejemplo, los que hidrolizan los biopolímeros son los que fermentan los monómeros resultantes de esta etapa (Insam *et al.* 2010).

1.4.2. Fermentación (Acidogénesis)

La etapa acidogénica es una fase compleja que involucra la formación de ácido y la producción de H_2 . Los monómeros liberados luego de la hidrólisis son fermentados a ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico, butírico, fórmico, succínico, láctico, entre otros), alcoholes, CO_2 e H_2 (Fig. 1.9). Los productos formados varían con los tipos de bacterias presentes y con los sustratos, así como con las condiciones ambientales. Las bacterias responsables de la producción de ácido incluyen bacterias anaerobias facultativas y bacterias anaerobias estrictas. En esta etapa hay mayor cantidad de microorganismos diferentes que durante las otras etapas. Muchos de los organismos que llevan a cabo la fermentación son los mismos que realizaron la hidrólisis durante la primera etapa (*Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium*). Otros géneros también están activos, por ejemplo, *Enterobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Eubacterium* (Deublein y Steinhauser 2008; Insam *et al.* 2010; Schnürer y Jarvis 2010).

El H_2 es producido por las bacterias acidogénicas. La concentración de H_2 afecta a la clase de productos que se forman en la fermentación. Cuanto mayor es la presión parcial de H_2 , menor es la formación de compuestos reducidos como el acetato. Los típicos productos de la fermentación son sustancias ácidas que disminuyen el pH extracelular. El aumento de los ácidos grasos de cadena corta, y el consecuente descenso en el pH inhibe y detiene la fermentación, siendo una de

1.4 Microbiología de la biometanización

las razones más comunes de falla del reactor. Por lo tanto, el equilibrio entre las bacterias fermentativas y las que consumen ácidos es crucial para mantener el balance de pH en el sistema (Deublein y Steinhauser 2008; Insam *et al.* 2010).

1.4.3. Acetogénesis

El acetato puede producirse no solo a través de la fermentación de compuestos orgánicos solubles, sino además a través de la acetogénesis. Los productos de la fermentación son utilizados como sustrato por las bacterias acetogénicas. Los microorganismos **homoacetogénicos** reducen constantemente H_2 y CO_2 a ácido acético, mientras que los **heteroacetogénicos** oxidan ácidos grasos, como el propiónico y el butírico, a ácido acético, H_2 y CO_2 (Fig. 1.9) (Deublein y Steinhauser 2008; Insam *et al.* 2010; Schnürer y Jarvis 2010).

La acetogénesis es un paso muy importante en la biometanización que requiere una estrecha colaboración entre los organismos que llevan a cabo la oxidación anaerobia y las AM que están activas en la próxima etapa (ver sección 1.4.4). La razón de que dos grupos diferentes de organismos tengan que actuar en conjunto está fuertemente ligada a la concentración de H_2 . La formación de acetato mediante la oxidación de ácidos grasos, es termodinámicamente posible solo con una presión parcial de H_2 baja. Por lo tanto, las reacciones acetogénicas, termodinámicamente desfavorables en condiciones estándar, requieren de una asociación sintrófica entre una acetogénica y una metanogénica hidrogenotrófica (ver sección 1.4.4). Esto significa que ambos procariotas cooperan para degradar un sustrato con una ganancia neta de energía que no obtendrían a partir de la degradación del sustrato individualmente. Estos socios son, por lo tanto, obligatoriamente interdependientes y su vínculo metabólico está mediado por el H_2 . Esta interacción entre estos dos tipos de microorganismos se conoce comúnmente como *transferencia de hidrógeno entre especies*. Cuando la presión parcial de H_2 es baja, las bacterias acetogénicas forman predominantemente H_2 , CO_2 y acetato. Cuando la presión parcial de H_2 es mayor, se forman predominantemente etanol y los ácidos butírico, caprónico, propiónico y valérico. La fase acetogénica es la que

1.4 Microbiología de la biometanización

limita la velocidad de la metanogénesis (Deublein y Steinhauser 2008; Insam *et al.* 2010; Schnürer y Jarvis 2010).

En los sistemas biológicos en los que hay presentes compuestos orgánicos de nitrógeno o azufre, existen otros organismos capaces de consumir el H₂ que pueden conducir la oxidación anaerobia, tales como las bacterias sulfato reductoras (BSR) o las nitrato reductoras (BNR) (Deublein y Steinhauser 2008; Schnürer y Jarvis 2010).

Las acetógenas son filogenéticamente diversas, pero la mayoría se agrupan dentro de la rama de bajo G+C de los *Firmicutes*. La mayoría de los géneros que abarcan especies acetogénicas, por ejemplo, *Clostridium*, *Eubacterium* o *Ruminococcus*, también incluyen miembros no acetogénicos. Ejemplos de géneros con numerosos organismos capaces de realizar oxidaciones anaeróbicas en simbiosis con otro organismo que utilice H₂ son *Syntrophomonas*, *Syntrophus*, *Clostridium* y *Syntrobacter* (Gerardi 2003; Insam *et al.* 2010; Schnürer y Jarvis 2010).

1.4.4. Metanogénesis

El último paso de la degradación anaeróbica de la MO es la formación de CH₄ y CO₂ por las AM. Los sustratos más importantes para las AM son acetato, H₂ y CO₂. Además, el CH₄ puede formarse a partir de compuestos de metilo. Por lo tanto, los demás productos de la fermentación deben ser convertidos a compuestos que puedan ser utilizados directa o indirectamente por las AM. Los ácidos, alcoholes y compuestos orgánicos que no son degradados por las AM se acumulan en el sobrenadante del digestor (Gerardi 2003). Dos tipos de AM están frecuentemente activas durante la biometanización. El primer grupo, las **metanogénicas acetotróficas**, utilizan el acetato como sustrato y usualmente dominan el proceso, produciendo el 70 % del CH₄. En el otro grupo, las **metanogénicas hidrogenotróficas**, el sustrato principal para la formación de CH₄ es el H₂ y CO₂, generando sólo el 27–30 % del CH₄ (Fig. 1.9). La formación de CH₄ se lleva a cabo en condiciones anaerobias estrictas, siendo una reacción exergónica (Deublein y Steinhauser 2008).

1.4 Microbiología de la biometanización

Cuando la formación de CH₄ funciona sin inconvenientes, la fase acetogénica también procede correctamente. Cuando se altera la formación de CH₄, se produce una super acidificación. Los problemas pueden ocurrir cuando las bacterias acetogénicas viven en simbiosis con microorganismos diferentes a las AM. Por ejemplo, en algunos reactores pueden ocurrir simbiosis con las BSR, que reducen el sulfato (SO₄²⁻) a H₂S. Por lo tanto compiten con las AM por el H₂. Las AM reciben menor cantidad de sustrato y en consecuencia forman menos CH₄. Además, el H₂S producido afecta a las AM tóxicamente (Deublein y Steinhauser 2008).

A su vez, la metanogénesis, es la etapa más sensible a desequilibrios del proceso dentro de los biorreactores. Esto se ha atribuido a la baja diversidad metanogénica y redundancia funcional, lo que hace que sea sencillo inhibirla. Los únicos organismos metanogénicos conocidos son las arqueas perteneciente al phylum *Euryarchaeota*. Entre los cinco órdenes conocidos de AM, cuatro se encuentran comúnmente en los biorreactores (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales*). El quinto orden, Methanopyrales, incluye una sola especie hipertermofílica. Dentro de estos grupos, sólo *Methanosaeta* y *Methanosarcina* son capaces de degradar acetato, mientras que varias AM utilizan H₂, incluyendo *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanospirillum*, *Methanogenium* y *Methanobrevibacter* (Insam *et al.* 2010; Schnürer y Jarvis 2010).

La tasa de conversión de sustrato está determinada por las características cinéticas de la etapa limitante. Cuál de las etapas es limitante de la velocidad depende en gran medida de la composición del sustrato. Si el material a degradar contiene principalmente compuestos orgánicos solubles, la metanogénesis y acetogénesis serán las limitantes de la velocidad. Para los compuestos orgánicos que son poco biodegradables, la etapa de hidrólisis puede convertirse en el paso limitante de la velocidad (Gerardi 2003; Leschine 1995).

La biometanización es inducida por un cultivo bacteriano de múltiples cepas mezcladas, que se obtiene generalmente por el enriquecimiento natural de los respectivos sustratos utilizados. Dependiendo del sustrato aplicado y de las condiciones de fermentación, la constitución y el número de bacterias que participan pueden variar considerablemente. Las etapas descriptas anteriormente

1.4 Microbiología de la biometanización

tienen lugar simultáneamente, si todos los microorganismos involucrados permanecen en un equilibrio adecuadamente balanceado (Braun *et al.* 2010).

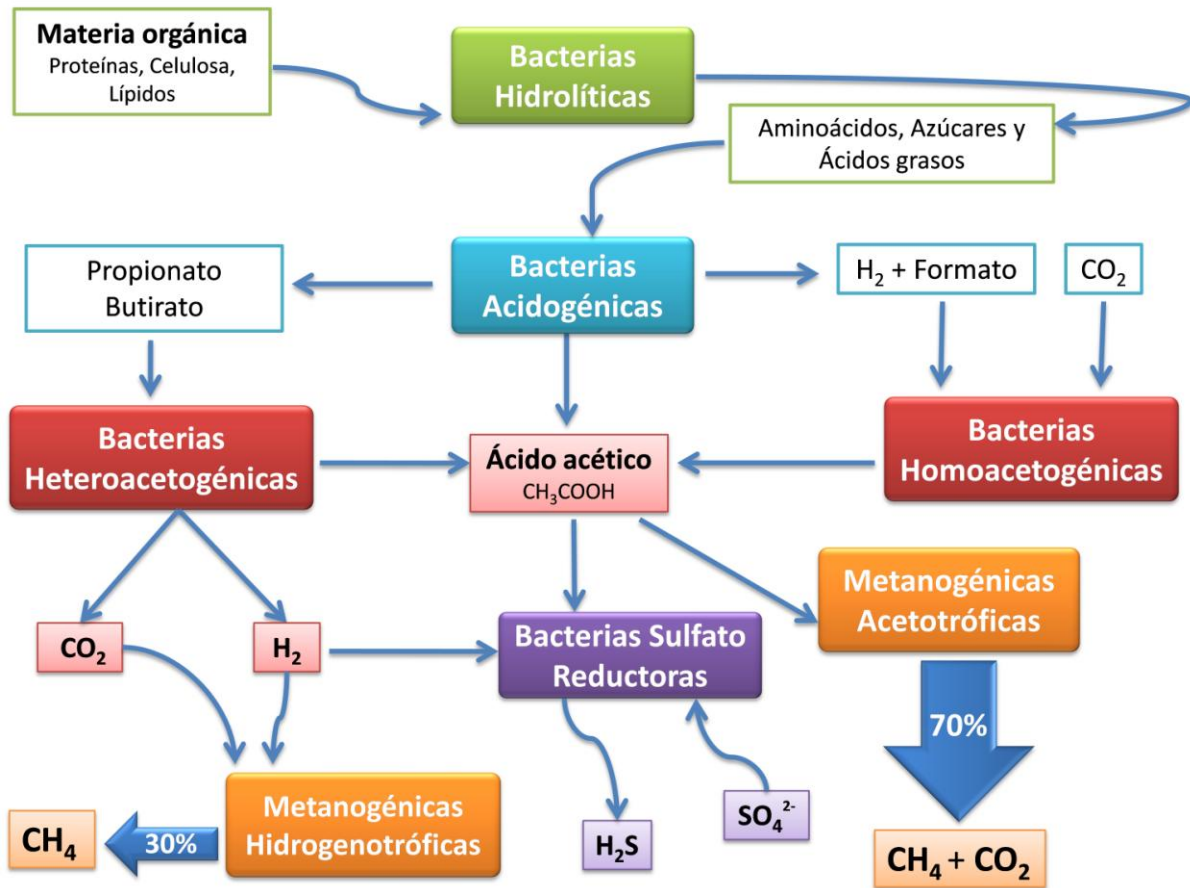


Figura 1.9 Degradación anaeróbica de la materia orgánica en el interior del biorreactor para la formación de metano

1.5. Sustratos para la biometanización

El material añadido a un biorreactor es el sustrato para los microorganismos y sus propiedades tienen una gran influencia en la estabilidad y la eficiencia del proceso. La composición del sustrato es importante tanto para la cantidad como para la calidad del gas que se produzca. Además, la composición afecta a la calidad de los residuos de la digestión (digerido), en términos de contenido de nutrientes para las plantas y de contaminación potencial (metales, compuestos orgánicos, patógenos, etc.). A su vez, la performance de un determinado sustrato

1.5 Sustratos para la biometanización

puede depender del pretratamiento aplicado previo a la incorporación al reactor y de si es el único sustrato o si se codigiere con otros materiales. La presencia de sustancias tóxicas o lignina, que no se descomponen en el proceso, también tienen un rol importante (Schnürer y Jarvis 2010).

Cada residuo tiene características propias que deben considerarse al momento de iniciar el tratamiento por DA. Como con cualquier proceso microbiano, la composición química de los residuos, la temperatura y la presencia de compuestos tóxicos se encuentran entre los factores que determinan la eficacia del proceso (Archer y Thompson 1987). Es importante que las siguientes características sean tomadas en consideración antes de utilizar un sustrato:

- El contenido de MO debe ser apropiado para el proceso de DA.
- Preferentemente el sustrato debe estar libre de patógenos antes del proceso de fermentación. En caso contrario se debe verificar la inocuidad del digerido antes de la aplicación.
- El contenido de sustancias nocivas debe ser bajo para permitir que el proceso de fermentación se lleve a cabo sin inconvenientes (Deublein y Steinhauser 2008).

1.5.1. Residuos agrícolas empleados en la biometanización

Los residuos agrícolas incluyen una amplia cantidad de sustratos, entre los que podemos encontrar desechos provenientes de la horticultura, agricultura (paja de arroz, mazorcas de maíz, bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, hojas y tallos de distintos cultivos), silvicultura y residuos de animales (estiércol, guano, purines y camas de animales) (Chakraborty *et al.* 2002; Chanakya *et al.* 1999; Ferreira-Leitao *et al.* 2010; Kirchmayr *et al.* 2007; Misi y Forster 2001; Schievano *et al.* 2009).

Los residuos agrícolas de origen vegetal no poseen en cantidad suficiente los microorganismos necesarios para la biometanización, por lo que deben ser inoculados con una fuente de bacterias hidrolíticas y AM. Se ha comprobado que los microorganismos procedentes de distintos estiércoles animales se adaptan bien a la biomasa vegetal, logrando su degradación a CH₄ (Chakraborty *et al.* 2002).

1.5 Sustratos para la biometanización

El empleo de estiércol como sustrato para la DA tiene algunas ventajas: es un ambiente natural de las AM, tienen un contenido de sólidos totales apropiados para el proceso, es económico y puede ser recolectado fácilmente. Sin embargo, los estiércoles como único sustrato de la DA suelen tener un rendimiento bajo en la producción de CH₄ como resultado de su alto contenido en fibras (El-Mashad y Zhang 2010).

1.5.2. Pretratamiento de residuos sólidos

Comúnmente los sustratos sólidos son pretratados antes de que ingresen al biorreactor. Los pretratamientos evitan interferencias u obstrucciones de la metanogénesis en el digestor. Un requisito esencial es garantizar que el sustrato se distribuya homogéneamente dentro del reactor, lo que permite una transferencia ininterrumpida de masa entre las partículas sólidas, y las fases líquida y gaseosa. Para ello, los sustratos son triturados a fin de reducir su tamaño. La dimensión de partícula ideal para una digestión adecuada es de 12 mm. La reducción del tamaño del sustrato aumenta la solubilidad y la disponibilidad del material orgánico para los microorganismos, logrando una biodegradación más rápida (Braun 2007; Schnürer y Jarvis 2010)

En algunos casos, los sustratos con alto contenido de materia seca, pueden requerir dilución con agua o con otros sustratos menos concentrados. De esta manera se pueden evitar variaciones de pH perjudiciales, concentraciones demasiado altas o efectos inhibidores de los sustratos (Braun 2007).

1.5.3. Codigestión de residuos de biomasa

La digestión conjunta, o **codigestión**, de diferentes materiales generalmente produce mayor cantidad de biogás que la degradación de los sustratos individualmente (mono-digestión). Esto se debe a que es más probable que un sustrato complejo incluya todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. Por ejemplo, puede proporcionar mayor disponibilidad de elementos traza o una mejor relación C/N. La mezcla de sustratos aumenta la probabilidad de que el proceso sea estable y robusto ya que se desarrolla una comunidad

1.5 Sustratos para la biometanización

microbiana diversa al descomponer diferentes tipos de compuestos (Agyeman y Tao 2014; Albertson *et al.* 2006).

1.5.4. Sustancias inhibidoras de la biometanización

Numerosos componentes del sustrato pueden causar un mal funcionamiento de la metanogénesis. Los compuestos inhibidores o tóxicos pueden generar un retraso en la formación de CH₄, una disminución del contenido de CH₄ en el biogás o incluso pueden provocar una inhibición completa de la biometanización. Han sido reportadas inhibiciones a partir de ácidos grasos de cadena larga, de algunos antibióticos, de fenoles y de altos niveles (10⁻³ a 10⁻⁴ mol) de metales pesados. En la mayoría de los casos, la inhibición es reversible y desaparece después de la eliminación de la sustancia tóxica. Además, frecuentemente se puede observar una adaptación gradual a las sustancias inhibidoras e incluso, la degradación completa de los compuestos tóxicos (Braun 2007).

Entre los compuestos que causan frecuentemente inhibición de la DA se encuentran los aceptores de electrones alternativos, el amoníaco y el sulfuro. Los aceptores de electrones alternativos, como el SO₄²⁻ y nitrato (NO₃⁻), son compuestos que causan que el flujo de electrones de la biometanización se aleje de la producción de CH₄ y aumente la actividad de microorganismos competidores, como las BSR y BNR. Como consecuencia, disminuye la cantidad de CH₄ y aumenta la formación de H₂S y compuestos nitrogenados. El amoníaco es liberado durante la descomposición de sustratos ricos en proteínas, e inhibe principalmente a las AM. El amoníaco (NH₃) suele estar en equilibrio con el ión amonio (NH₄⁺), sin embargo la forma predominante depende de la temperatura y del pH del proceso. Los distintos microorganismos involucrados en la metanización pueden ser inhibidos por el H₂S. Este gas no sólo es producido por la actividad de las BSR, sino también por la fermentación de aminoácidos que contienen azufre, como la cisteína y la metionina. El grado de inhibición del H₂S aumenta con la disminución del pH (Schnürer y Jarvis 2010).

1.6. Tecnología de la biometanización

1.6.1. Sistemas de digestión

Existen dos tipos básicos de sistema de digestión:

- 1) *Batch*: los digestores son cargados completamente una única vez, sellados, y vaciados cuando el sustrato deja de producir gas.
- 2) *Continuo*: los digestores son cargados de a poco, regularmente, por lo tanto el gas y el fertilizante se producen continuamente.

La elección del tipo de sistema depende fundamentalmente de las características del residuo a ser tratado. En general, los biodigestores se cargan con una mezcla de agua y residuos orgánicos. La digestión progresa gradualmente a lo largo del digestor y el residuo empieza a estratificarse en distintas capas (Fig. 1.10) (Fry y Merrill 1973; Gerardi 2003; Schnürer y Jarvis 2010).

Información detallada sobre los distintos tipos de digestores anaeróbicos puede encontrarse en Gerardi (2003).

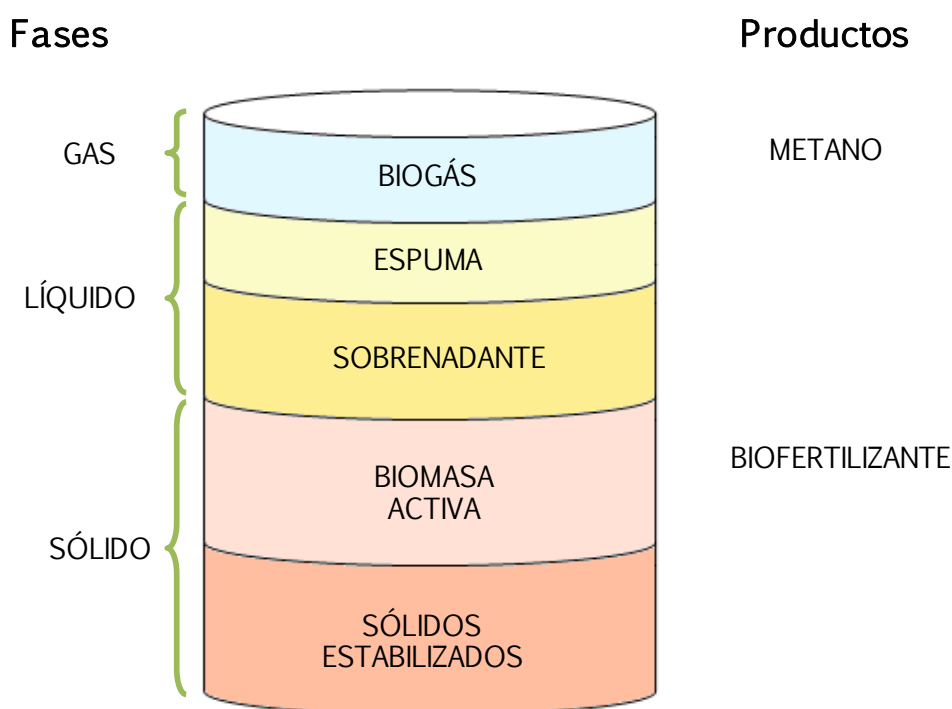


Figura 1.10 En los digestores se producen diferentes capas como resultado de la degradación de la materia orgánica. Estas capas son (*de arriba hacia abajo*): biogás, espuma, sobrenadante, biomasa activa y sólidos estabilizados

1.6 Tecnología de la biometanización

1.6.2. Puesta en marcha del proceso

Normalmente no existen inoculantes comerciales específicos para la puesta en marcha de un biorreactor. Como se mencionó anteriormente, la biometanización y los microorganismos que son activos durante el proceso de descomposición anaeróbica existen naturalmente en el medio ambiente. Por lo tanto, al momento de poner en funcionamiento un reactor es conveniente, por ejemplo, utilizar estiércol vacuno fresco como inoculante de AM. Para lograr un proceso estable, los microorganismos del inoculante necesitan tiempo para adaptarse al ambiente del biorreactor y al sustrato en degradación. Durante este período de adaptación, se establecerán aquellos organismos del inóculo que sean capaces de sobrevivir en el nuevo entorno. A su vez, los organismos nativos del sustrato también desempeñarán un rol en el proceso (Braun 2007; Gerardi 2003; Schnürer y Jarvis 2010).

El proceso de arranque puede tardar varias semanas o meses, y es crucial para el establecimiento de una comunidad microbiana adecuada que logre una metanogénesis estable y una alta degradación del sustrato. La duración del período de puesta en marcha será mayor cuanto más grande sea la diferencia entre el medio ambiente del que se obtiene el inoculante y el del digestor. Lo ideal es que la comunidad microbiana se establezca a partir del inóculo de un reactor que se encuentre utilizando un sustrato similar o el mismo a degradar en el nuevo digestor. En este caso, los barros provenientes del reactor en funcionamiento se adicionan en un 20-30 % (v/v) junto con pequeñas cantidades del sustrato al nuevo biorreactor. Si no hubiera un inóculo disponible en cantidad suficiente, el reactor debe ser llenado con agua y pequeñas cantidades del sustrato (Braun 2007; Schnürer y Jarvis 2010).

1.6.3. Parámetros operacionales

La biometanización es controlada por la interacción entre diferentes microorganismos. Por lo tanto, para lograr un proceso que funcione en forma estable y con alta producción de CH₄, es importante crear y mantener un ambiente tan beneficioso como sea posible para estos microorganismos.

1.6 Tecnología de la biometanización

Se deben cumplir ciertas condiciones para obtener una degradación adecuada de los compuestos orgánicos. En el biorreactor se producen cambios al mismo tiempo que evoluciona la degradación de la biomasa. A medida que las condiciones cambian, por ejemplo, pH y temperatura, los grupos bacterianos que están activos e inactivos también se modifican. Estos cambios en la actividad bacteriana son responsables por los cambios en la cantidad y tipo de compuestos orgánicos que son producidos. Los parámetros operacionales del digestor deben ser controlados para mejorar la actividad microbiana y así aumentar la eficiencia de la DA. A continuación se describirán brevemente algunos de estos parámetros.

1.6.3.1. pH

El valor de pH tiene un papel predominante en la DA, interfiriendo en casi todas las reacciones (Braun 2007). El proceso de generación de biogás generalmente funciona mejor a valores de pH neutros o ligeramente superiores (pH entre 7 y 8,5). Una actividad enzimática aceptable de las bacterias formadoras de ácido ocurre por encima de pH 5, pero una actividad eficiente de las AM no se produce por debajo de pH 6,2. La mayoría de las bacterias anaeróbicas y las AM, se desempeñan bien en el rango de pH de 6,8 a 7,2 (Gerardi 2003). Sin embargo, la formación de CH₄ puede continuar a tasas reducidas en valores de pH 6 e incluso inferiores.

En algunos casos de sustratos fácilmente degradables (ej. con alto contenido de azúcares) la hidrólisis se produce rápidamente y el pH puede caer por debajo de 6,5. A pH bajo, la capacidad tampón generalmente es insuficiente y las fermentaciones tienden a resultar en una considerable inestabilidad, provocando un retraso en la formación de CH₄. Una posible intervención en estas situaciones es el agregado de hidróxido de calcio (Ca(OH)₂), carbonato de sodio (Na₂CO₃), bicarbonato de sodio (NaHCO₃) o bicarbonato de potasio (KHCO₃) para estabilizar el valor de pH alrededor de 7 (Braun 2007; Gerardi 2003).

1.6.3.2. Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan la actividad microbiana dentro del digestor anaeróbico, y la producción de CH₄ (desarrollo de las AM) es fuertemente dependiente de ella. La mayoría de las AM son activas en el rango mesofílico (30-37 °C). Asimismo, algunas desarrollan en el rango termofílico (50-60 °C) y otras en el psicofílico (< 20 °C). Mientras que la producción microbiana de CH₄ puede ocurrir sobre esta amplia gama de temperaturas, lo deseable es que el biorreactor funcione a 35 °C ya que los procesos mesofílicos involucran una mayor diversidad de microorganismos, lo que asegura una eficiente y constante producción de CH₄ (Gerardi 2003).

Durante la producción de biogás, se liberan pequeñas cantidades de energía en forma de calor. La mayor parte de la energía liberada por la respiración celular se une directamente al producto final, el CH₄. Por lo tanto, este producto es rico en energía mientras que el proceso en sí no produce calor de manera significativa. Para lograr un mejor desarrollo de los microorganismos y en consecuencia, una mayor cantidad de biogás, se requiere una fuente de calor externa (Schnürer y Jarvis 2010).

1.6.3.3. Relación C/N

Los valores óptimos de C/N recomendados para los digestores anaeróbicos están entre 20-30. Si la biomasa a degradar no se encuentra dentro de este rango, es posible mezclarla con otro tipo de desecho (ej. estiércol) para lograrlo (Gerardi 2003).

1.6.3.4. Tiempo de retención

Se denomina **tiempo de retención hidráulica** (HRT) al tiempo requerido para lograr la degradación completa de la MO. El tiempo de retención varía desde un par de semanas a meses, dependiendo del residuo a tratar, el tipo de biorreactor y la temperatura (Gerardi 2003).

Debido a que las AM se reproducen lentamente, su tasa de crecimiento a menudo establece el límite del tiempo de retención del sustrato en el reactor. Un

1.6 Tecnología de la biometanización

tiempo de retención demasiado corto (menor a 12 días) aumenta el riesgo de que estos organismos sean eliminados del reactor, debido a que no poseen tiempo suficiente para aumentar su número al mismo ritmo en que el material ingresa y egresa del tanque de digestión (Schnürer y Jarvis 2010).

1.6.3.5. Grado de digestión

El grado de digestión se define como el porcentaje de MO degradada y convertida en biogás durante un período específico de tiempo. El mismo se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Grado de digestión (\%)} = \left[\frac{(ST_i \times SV_i - ST_f \times SV_f)}{(ST_i \times SV_i)} \right] \times 100$$

Donde los **sólidos totales** (ST) representan el contenido de materia seca del material luego de remover el contenido de agua a 105 °C. El contenido de MO se determina comúnmente a partir de los **sólidos volátiles** (SV), que se obtienen luego de que la materia seca se incinera a 550 °C. Los SV se calculan como la cantidad de ST menos la cantidad de cenizas y equivale a la parte del material que es biodegradable (Anexo III).

Generalmente, los procesos *batch* tienen un mayor grado de digestión que los procesos continuos. El grado de digestión también varía con las características del sustrato (Schnürer y Jarvis 2010).

Tabla 1.2 Resumen de los principales requerimientos de las etapas de la biometanización

Parámetro	Hidrólisis/Acidogénesis	Metanogénesis
pH	5,2-6,3	6,7-7,5
Temperatura	25-35 °C	32-42 °C
Relación C/N	10-45	20-30
Contenido de materia seca	< 40 %	< 30 %

1.6.4. Control del proceso

Los controles mínimos del proceso de DA incluyen la medición continua de la temperatura, el pH y la producción de biogás. Además debe medirse regularmente el contenido de ST, SV (grado de digestión) y CH₄. Finalmente, se debe verificar que el digerido cumpla con los requisitos necesarios en función de su uso final previsto (biofertilizante, compostaje, etc.) (Braun 2007).

1.7. Métodos de estudio de las comunidades microbianas

Las comunidades microbianas consisten en varias poblaciones de células que viven en asociación con otras poblaciones en la naturaleza. La ecología microbiana se centra en estudiar cómo las poblaciones microbianas se ensamblan para formar comunidades y cómo estas comunidades interactúan entre sí y con su entorno. La biometanización es un proceso biológico natural que requiere la cooperación entre diferentes microorganismos y grupos de microorganismos para funcionar adecuadamente. Este proceso también necesita un tratamiento y supervisión cuidadosos para funcionar adecuadamente. Así, los mejores resultados serán obtenidos únicamente cuando haya un entendimiento de los procesos biológicos y estos sean aplicados a la tecnología para la producción de biogás (Schnürer y Jarvis 2010).

La ecología microbiana requiere la capacidad de medir y evaluar una serie de parámetros sobre el hábitat, la comunidad de microorganismos presentes y el efecto de los organismos en el medio ambiente. Para ello existen diversas técnicas basadas en el cultivo de los microorganismos, en los ácidos nucleicos y en la medición de la actividad de la comunidad. La elección de la técnica, dentro de la amplia gama de métodos que están disponibles, depende del objetivo y de los microorganismos en estudio. Se describirán brevemente las herramientas utilizadas para el estudio de los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia.

1.7.1. Técnicas basadas en el cultivo de microorganismos

El número de especies microbianas existentes ha sido estimado entre 10^5 y 10^6 ; sin embargo, sólo se han aislado, descrito o caracterizado algunos miles. Esto se debe, en parte, a que sólo unos cuantos organismos de las muestras ambientales crecen en medios nutritivos en cajas de Petri. El empleo de técnicas de cultivo en la ecología microbiana a menudo ha sido descartado en favor de la utilización de técnicas independientes de cultivo, ya que se ha postulado que menos del 1 % de los organismos ambientales son cultivables utilizando los medios y condiciones tradicionales (Amann *et al.* 1995). Estudios más recientes, han demostrado que el uso de medios y condiciones que incorporan nutrientes y factores abióticos del medio ambiente en el que habitan los microorganismos mejora en gran medida el éxito del cultivo (Leadbetter 2003).

El cultivo de microorganismos sigue siendo la única manera de caracterizar completamente sus propiedades y predecir su impacto en un entorno. La técnica de cultivo de enriquecimiento es un método útil para el aislamiento de microorganismos de la naturaleza. Para que el enriquecimiento sea exitoso, se requiere en primer lugar que la toma de muestra se realice adecuadamente para que contenga al organismo de interés. Los cultivos de enriquecimiento se establecen mediante la colocación del inóculo en un medio que sea selectivo para el organismo deseado y que desfavorezca a los organismos no deseados, e incubando en condiciones específicas (temperatura, pH). Los cultivos de enriquecimiento eficaces son aquellos que reproducen, lo más cercanamente posible, los recursos y condiciones de un nicho ecológico particular.

En algunos cultivos de enriquecimiento no hay desarrollo de ningún microorganismo. Esto puede deberse a que el organismo capaz de crecer en las condiciones establecidas está ausente en el hábitat. Alternativamente, a pesar de que el organismo de interés esté presente en el hábitat muestreado, los recursos (nutrientes) y las condiciones del cultivo de laboratorio pueden ser insuficientes para su crecimiento. Por lo tanto, el enriquecimiento puede producir una conclusión positiva (que existe un organismo con ciertas capacidades en un entorno particular), pero nunca una conclusión negativa segura. Por otra parte, el

1.7 Métodos de estudio de las comunidades microbianas

aislamiento del organismo deseado no dice nada sobre la importancia ecológica o abundancia del organismo en su hábitat; un enriquecimiento positivo sólo demuestra que el organismo estaba presente en la muestra y, en teoría, que sólo requiere que una sola célula viable esté presente (Madigan *et al.* 2010).

1.7.2. Técnicas basadas en ácidos nucleicos

Las técnicas independientes de cultivo pueden proporcionar información sobre la estructura y función de las comunidades microbianas. Es posible detectar a los microorganismos en sus ambientes naturales mediante el estudio de sus genes. Generalmente, se utilizan los genes que codifican el ARN ribosomal (ARNr) o enzimas responsables de un proceso microbiano particular (ej. desnitrificación, reducción de sulfato, producción de CH₄). Los genes específicos se utilizan como medidas de la biodiversidad y de la capacidad metabólica. La detección de un gen de este tipo en una muestra ambiental implica que el organismo está presente. Las principales técnicas empleadas para este tipo de análisis son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis del fragmento de ADN por electroforesis en gel (electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante [DGGE], electroforesis en gel de gradiente de temperatura [TGGE] y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción [RFLP]) y secuenciación del ADN.

1.7.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El proceso comienza con la extracción del ADN total de la comunidad de la muestra en estudio. Para muestras provenientes de hábitats complejos (suelo, lodos, biorreactores) hay disponibles kits comerciales con los que se obtiene ADN con alto grado de pureza. El ADN obtenido es una mezcla de ADN genómico de todos los microorganismos que se encontraban en la muestra. A partir de esta mezcla, se realiza la PCR para amplificar el gen diana. Luego, los productos de PCR se clonan o se separan por electroforesis en gel. Las bandas de ADN del gel de electroforesis pueden ser extraídas y secuenciadas para permitir la identificación de las poblaciones (Hofman-Bang *et al.* 2003; Madigan *et al.* 2010).

1.7.2.2. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)

La DGGE es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos. Para ello, un gradiente lineal creciente de un agente químico desnaturizante (una mezcla de urea y formamida) se incorpora a lo largo de un gel de poliacrilamida. Durante la electroforesis, se mantiene una temperatura constante (generalmente 60 °C) y los fragmentos de ADN de cadena doble migran hasta encontrar una concentración de urea y formamida (concentración desnaturizante) a la cual las cadenas se separan localmente y el desplazamiento de las moléculas disminuye o se interrumpe. La concentración desnaturizante a la cual la doble cadena de ADN se separa depende de la secuencia de nucleótidos, es decir, del contenido de dobles o triples puentes de hidrogeno dependiendo de si son pares de bases adenina-timina (AT) o citosina-guanina (GC). Regiones ricas en GC se separan en concentraciones más altas que las regiones ricas en AT. Por lo tanto, moléculas de ADN que difieren en un solo nucleótido tendrán una concentración desnaturizante ligeramente diferente y en consecuencia, distinta posición en el gel. Las bandas de DGGE pueden ser extraídas del gel, re-amplificadas y secuenciadas.

Para evitar la separación completa del ADN en dos cadenas sencillas, una región rica en GC (secuencia de 30-50 pares de bases de G+C), denominada *GC-clamp*, se introduce en uno de los extremos del producto PCR. Esto se logra mediante el uso de un par de cebadores, en el que uno de ellos posee un *GC-clamp* en el extremo 5'. Un producto PCR con un *GC-clamp* se separa parcialmente en una posición particular del gel DGGE, y forma una estructura ramificada. Esta estructura reduce en gran medida la migración de los productos PCR.

La DGGE se ha utilizado ampliamente para estudiar la diversidad, abundancia relativa y los cambios de las poblaciones microbianas en distintos ambientes en respuesta a estímulos y/o estrés. Es posible realizar análisis estadísticos sobre los perfiles (con una imagen del gel) para determinar si se producen cambios significativos en la estructura de la comunidad.

1.7 Métodos de estudio de las comunidades microbianas

Existen algunas consideraciones importantes sobre esta técnica relacionadas con la interpretación de los datos obtenidos. En particular, es posible que diferentes especies generen una misma banda, por lo que los estimados de diversidad serán subestimaciones. Por ello, lo ideal es hacer estimaciones de diversidad relativa entre comunidades y considerar OTU (unidades taxonómicas operacionales) en lugar de especies. Una desventaja de la DGGE es que la reproducibilidad no es óptima; pueden existir variaciones de gel a gel (Eyers *et al.* 2004; Hofman-Bang *et al.* 2003; Muyzer *et al.* 2004).

1.8. Objetivos

En función de los antecedentes presentados, existe la necesidad de encontrar una alternativa para reciclar los residuos de la producción de cebolla del VBRC. Las opciones de reutilización empleadas hasta el momento, no lograron resolver el problema ambiental y social que provocan. Por lo tanto, se decidió evaluar la posibilidad utilizar los residuos de cebolla como sustrato para la biometanización.

Durante la revisión bibliográfica realizada a lo largo de este trabajo de tesis, no fue posible encontrar estudios relacionados con la producción de biogás a partir de residuos de estas características o similares. Ante la falta de información específica que pudiera guiar la experimentación, se decidió abordar simultáneamente los estudios de la microbiota nativa y de la factibilidad de la biometanización del residuo.

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de la capacidad degradativa de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas nativas para establecer el potencial de la biometanización del residuo de la producción de cebolla.

1.8 Objetivos

Para el desarrollo del objetivo general, se han formulado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar e identificar las bacterias aeróbicas nativas con aptitud para degradar las catáfilas internas de la cebolla
- Identificar las bacterias anaeróbicas esporuladas con aptitud para degradar las catáfilas protectoras de la cebolla
- Evaluar la factibilidad de la biodegradación anaeróbica del residuo de cebolla.
- Implementar estrategias para optimizar la degradación anaeróbica del residuo de cebolla.

**PARTE I: Estudio de la microbiota nativa
degradadora del residuo de cebolla**

Capítulo II

Aislamiento y caracterización de bacterias aeróbicas degradadoras de cebolla

Publicado en World Journal of Biotechnology and Microbiology (2015): 31 (3), 487-497. DOI 10.1007/s11274-015-1803-8 ©2015 Springer Science+Business Media Dordrecht

2.1. Introducción

La hidrólisis es la etapa limitante en la digestión anaeróbica de los residuos de biomasa, debido a que estos suelen tener elevadas cantidades de celulosa o lignina. Con la finalidad de mejorar la solubilización de la MO, se puede utilizar un pretratamiento biológico (Mata-Alvarez *et al.* 2000). Se ha comprobado que la inoculación del sustrato con cepas bacterianas aeróbicas o anaeróbicas facultativas, como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y *Paenibacillus macerans*, mejora la hidrólisis y consecuentemente, la producción de biogás (Angelidaki y Ahring 2000; Singh *et al.* 2008; Sonakya *et al.* 2001; Yadvika *et al.* 2004).

La mayoría de los sustratos orgánicos posee una población nativa de microbios así como también microorganismos provenientes del ambiente. Representantes de los tres principales grupos microbianos (*Bacteria*, *Actinomycetes*

2.1 Introducción

y *Fungi*) están normalmente presentes cuando comienza el proceso de biodegradación (Sylvia *et al.* 2005). La degradación completa o parcial de la MO es llevada a cabo por un consorcio de microorganismos, cuya composición puede variar de acuerdo al tipo de sustrato en degradación (Franke-Whittle *et al.* 2009). Una elevada diversidad microbiana es un prerrequisito para que el proceso de degradación sea satisfactorio (Beffa *et al.* 1996). Se ha demostrado que la bioaumentación con bacterias nativas puede ser efectiva en el tratamiento de aguas residuales (Mongkolthanaruk y Dharmsthiti 2002).

Para mejorar la tasa de degradación de la cebolla, es esencial adquirir conocimiento sobre la composición, crecimiento y capacidad de los microorganismos responsables de su degradación. Por tal motivo los objetivos que se plantearon para iniciar el estudio de la biodegradación del residuo de cebolla fueron: 1) aislar y caracterizar bacterias nativas del residuo de cebolla en distintos estados de degradación, 2) establecer patrones de crecimiento de los aislamientos sobre los nutrientes aportados por la cebolla en distintas condiciones de temperatura y 3) comprobar la capacidad de degradación sobre trozos de cebolla de aislamientos seleccionados.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Descripción de los sitios de muestreo y de los tratamientos

Se recolectó descarte de cebolla procedente de tres sitios de producción. Las localidades Mayor Buratovich (39°15'40"S, 62°36'55"O), Villalonga (39°54'55"S, 62°37'10"O) y Viedma (40°48'30"S, 62°59'40"O) se encuentran a una distancia de 80 a 200 km una de la otra. La composición de los residuos de cebolla varía entre las zonas de cultivo dependiendo de las formas de procesamiento en los galpones que empaque y de los diferentes patógenos que afectan a esta hortaliza. En la región cercana a las localidades de Mayor Buratovich (**MB**) y Villalonga (**VL**) el residuo está compuesto mayormente por bulbos, mientras que en Viedma (**VE**) consiste principalmente de catáfilas protectoras, hojas superiores y raíces.

2.2 Materiales y métodos

Los desechos de cebolla analizados presentaban cuatro estados de degradación: a) bulbos almacenados a 4 °C durante un mes (**MB1**); b) desechos de cebolla almacenados en un bin (1 m³) ubicado al aire libre durante un mes (**MB2**); c) bulbos y catáfilas remanentes de las pilas de cebollas realizadas luego de la cosecha en el campo (**VL**); d) descarte de cebolla proveniente de un galpón de empaque (**VE**). Hasta que las muestras de VL y VE fueron obtenidas, se emplearon dos métodos de conservación para el residuo de MB debido a que en esta zona el residuo fue quemado.

2.2.2. Recuento de bacterias heterótrofas aerobias, hongos filamentosos y levaduras y aislamiento de cepas

Se realizó el conteo de microorganismos cultivables por el método de recuento en placa por diseminación en superficie. Cada tratamiento (10 ml vol. húmedo) se colocó por duplicado en frascos de vidrio de 250 ml que contenían 90 ml de agua destilada estéril (ADE). Estas suspensiones se agitaron a 200 rev/min durante 30 min. Se prepararon diluciones decimales y se sembraron alícuotas (100 µl) por triplicado en placas de Petri (90 mm × 15 mm) con el medio de cultivo requerido. Las bacterias heterótrofas aeróbicas (BHA) se cuantificaron en agar nutritivo (AN; Merck, Alemania). Los hongos filamentosos y levaduras se enumeraron en agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (Merck, Alemania). Todas las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h y posteriormente se enumeraron los grupos microbianos. El número de BHA, hongos filamentosos y levaduras cultivables se expresó como log₁₀ UFC g⁻¹ desecho de cebolla. La diferenciación entre hongos filamentosos y levaduras se basó en características morfológicas (color, forma y textura de la colonia).

Se tomó material de ochenta y tres colonias bacterianas (aproximadamente veinte de cada tratamiento) y se procedió al aislamiento en placas con AN hasta la obtención de cultivos puros. Luego de la purificación, los cultivos se mantuvieron en AN inclinado y se almacenaron a 4 °C. Las cepas se codificaron de acuerdo a su lugar de origen de la siguiente forma: MB, VL y VE. Estos aislamientos fueron utilizados en los subsiguientes ensayos.

2.2 Materiales y métodos

2.2.3. Desarrollo en medio de cultivo elaborado con extracto de cebolla

La capacidad de desarrollar utilizando los nutrientes de la cebolla se evaluó mediante la inoculación de cultivos puros con densidad óptica a 620 nm (DO_{620}) ajustada a 0,5. Cada cepa se inoculó (0,1 ml) por duplicado en tubos de hemólisis con 3 ml de medio de cebolla (**MJC**) con la siguiente composición: K_2HPO_4 1 g l⁻¹; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g l⁻¹; jugo de cebolla 150 ml l⁻¹; pH del medio 7,4. Para obtener el jugo de cebolla, se pelaron y cortaron los bulbos y se trituraron con mini procesadora. El extracto se centrifugó a 4.000 rev/min hasta obtener un jugo translúcido. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min a 1 atm. Cada cultivo fue además inoculado por duplicado en caldo nutritivo (CN; Merck, Alemania) como medio control. Uno de los duplicados de cada medio se incubó a 4 °C y el otro a 28 °C durante 7 días en agitador orbital a 150 rev/min. Un tubo sin inocular de cada medio de cultivo se colocó bajo las mismas condiciones como control. Los cultivos fueron homogeneizados mediante agitación en vortex previo a la medición de la densidad celular. El desarrollo bacteriano se evaluó mediante DO_{620} con espectrofotómetro (Metrolab 1600DR, Wiener lab., Argentina).

2.2.4. Utilización de sustratos carbonados

Las cepas se cultivaron en CN a 28 °C hasta alcanzar una $DO_{620} = 0,5$. La utilización potencial de sustratos carbonados (**SC**) se evaluó en microplacas con 96 pocillos estériles (Orange Scientific, Bélgica). Cada pocillo se cargó con 225 µl de medio mínimo líquido (Anexo I), 0,1 % de SC y 0,005 % de cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) como indicador redox según Zabaloy y Gómez (2005). Se evaluaron treinta y un SC pertenecientes a siete categorías de acuerdo a su naturaleza química: catorce carbohidratos, cinco ácidos carboxílicos, cuatro aminoácidos, tres vitaminas, dos compuestos aromáticos, dos polímeros y un alcohol (Tabla 2.1). Se incorporó además un pozo conteniendo medio mínimo y TTC sin el agregado de SC como blanco. Las placas se prepararon 24 h antes de la siembra para verificar la esterilidad. Las microplacas se inocularon con 10 µl pocillo⁻¹ de cada cepa ($DO_{620} = 0,5$) y se incubaron en oscuridad a 28 °C. La densidad óptica (DO_{592}) se

2.2 Materiales y métodos

midió cada 24 h durante 5 días usando un lector de placas automático (Synergy HT, Biotek Instruments, VT, EEUU).

Tabla 2.1 Sustratos carbonados incluidos en las microplacas clasificados de acuerdo a su naturaleza química

Sustratos carbonados		
<i>Carbohidratos</i>	<i>Ácidos carboxílicos</i>	<i>Vitaminas hidrosolubles</i>
L-arabinosa	Ácido acético	Ácido ascórbico
D-celobiosa	Ácido cítrico	Inositol
D-fructosa	Ácido malónico	Tiamina
D-galactosa	Ácido pirúvico	
D-glucosa	Ácido succínico	<i>Compuestos aromáticos</i>
Lactosa		Catecol
Maltosa		Benzoato
D-manitol	<i>Aminoácidos</i>	
D-manosa	L-asparagina	<i>Polímeros</i>
D-rafinosa	L-cisteína	Dextrina
L-ramnosa	L-treonina	Inulina
Sorbosa	L-glutamato	
Sacarosa		<i>Alcoholes</i>
D-xilosa		Glicerol

2.2.5. Catáfila de cebolla como fuente de nutrientes en medio base mineral

La aptitud de los aislamientos para utilizar las hojas internas de la cebolla como única fuente de nutrientes se evaluó en medio líquido. Se prepararon frascos Erlenmeyer (125 ml) con 50 ml de solución salina (K_2HPO_4 1 g l⁻¹, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g l⁻¹) y 1 g de cebolla en trozos (0,5 x 0,3 mm); pH 7,4. Los frascos se inocularon con 1 ml de cepa con $DO_{620} = 0,5$. Además se incluyó un frasco sin inocular. Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 7 días con agitación manual tres veces al día. Alícuotas de 1 ml se retiraron cada 24 hs para medir DO_{620} con espectrofotómetro (Wiener lab. Metrolab 1600 DR, Argentina). Finalizado el experimento, los trozos de cebolla se analizaron con microscopio estereoscópico (Leica EZ4 HD, Leica Microsystems, Suiza).

2.2 Materiales y métodos

2.2.6. Análisis estadístico

Los recuentos microbianos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de un factor (ANOVA), considerando al tratamiento como la variable independiente. Los valores medios de los tratamientos se compararon mediante diferencia mínima significativa de Fisher, considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$ durante todo el estudio. Para el análisis de utilización de SC, los valores de DO obtenidos fueron corregidos restando a cada respuesta el valor obtenido por el blanco (Goberna *et al.* 2005). Los sustratos con valores de DO final corregida menores a 0,2 fueron omitidos del análisis (Lindstrom *et al.* 1998). Los datos de DO de cada sustrato a las 120 h se utilizaron para el análisis de agrupamiento. Las matrices de distancia se construyeron usando el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA) y se representaron en un dendrograma. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software NCSS (Hintze 2013), versión 9.0.13.

2.2.7. Identificación de los aislamientos

2.2.7.1. Morfología de los aislamientos

Se estudiaron las características morfológicas de los aislamientos (morfología y pigmentación de la colonia, reacción de Gram y morfología de la célula), de acuerdo a lo establecido en el Manual Bergey (Holt 1994).

2.2.7.2. Extracción de ADN

Los aislamientos fueron cultivados en CN a 28 °C por 72 h. Se centrifugaron alícuotas (2 ml) de los cultivos durante 10 min a 10.000 rev/min. El sedimento de células se empleó para la extracción del ADN total con el kit comercial Fecal DNA (MoBio Laboratories, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2 Materiales y métodos

2.2.7.3. PCR del 16S-23S ITS

Se examinó el grado de relación entre los aislamientos degradadores de cebolla mediante el análisis del patrón de bandas originado por la amplificación del segmento espaciador transcripto interno (ITS) de ADNr 16S/23S. Se emplearon los cebadores 38r y 72f correspondientes a secuencias conservadas de la región espaciadora 16S/23S del operón de ADNr (Gürtler y Stanisich 1996). Para la amplificación del ITS se realizó un protocolo de PCR modificado a partir del descrito por Zabaloy (2009). La mezcla de reacción para la PCR (23 µl) contenía 0,125 µl de ADN polimerasa GoTaq; 5 µl de buffer Green GoTaq 5 X (Promega, Madison, WI, EEUU); 2,5 µl de solución de dNTP (2 mM; Inbio-Highway, Argentina), 0,625 µl de cada uno de los cebadores (10 µM; Invitrogen, EEUU) y 14,125 µl de agua libre de nucleasas. Luego, se agregó una alícuota de 2 µl de ADN bacteriano, obteniendo un volumen final de 25 µl. Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador térmico Life Express Modelo TC-96/G/H(b) (Bioer Technology Co. Ltd., Tokio, Japón), con las condiciones descritas en la Tabla 2.2. Una alícuota de 6 µl del producto de reacción se sembró en un gel de agarosa D1 LE (Laboratorios CONDA, Madrid, España) al 2 % en tampón TAE y se separaron por electroforesis (60 V, 60 min). En las calles laterales del gel se sembró el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, EEUU). El gel se tiñó con GelRed (Biotium, Hayward, CA, EEUU) y se fotografió en un transiluminador UV TFX 20-M (Life Technologies Corp., Rockville, MD, EEUU). La imagen se analizó con el software Kodak Digital Science Image Analysis, versión 3.0 (Eastman Kodak Company, NY, EEUU).

Tabla 2.2 Condiciones de PCR para la amplificación del ITS

Cebadores	Secuencia	Ciclos PCR ^a
72f	5' TGCGGCTGGATCACCTCCTT 3'	<i>1 ciclo:</i> 2 min a 95°C (D) <i>35 ciclos:</i> 45 s a 94 °C (D), 45 s a 62°C (H) y
38r	5' CCGGGTTTCCCCATTCGG 3'	1 min 30 s a 72 °C (P) <i>1 ciclo:</i> 5 min a 72 °C (P)

^a D= desnaturalización, H= hibridación, P= polimerización

2.2 Materiales y métodos

2.2.7.4. Secuenciación del gen 16S rARN

La identificación taxonómica de los aislamientos se realizó a partir de la amplificación del ADNr 16S con los cebadores universales 518f y 800r y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados (Macrogen Inc., Seúl, Corea). Las secuencias se editaron con el software Chromas Lite v.2.1.1 (Technelysium Pty Ltd, Australia, http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) y se ensamblaron empleando CAP3 (Huang y Madan 1999). Las secuencias casi completas (~1.450 pb) del 16S rARN se identificaron mediante comparación con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

2.3. Resultados

2.3.1. Bacterias Heterótrofas Aerobias, Hongos y Levaduras

Los recuentos de BHA fueron superiores al de hongos filamentosos y levaduras en todos los tratamientos, alcanzando una densidad máxima de $7,4 \cdot 10^9$ UFC g^{-1} en VE (Fig. 2.1). El análisis estadístico indicó que el conteo de BHA en VE fue significativamente diferente del recuento en MB1 y MB2. Además, MB2 fue estadísticamente diferente de VL. Con respecto al número de hongos filamentosos, no se encontraron diferencias significativas entre los sitios de muestreo. Por el contrario, el número de levaduras fue estadísticamente diferente entre las localidades ($p < 0,05$).

2.3 Resultados

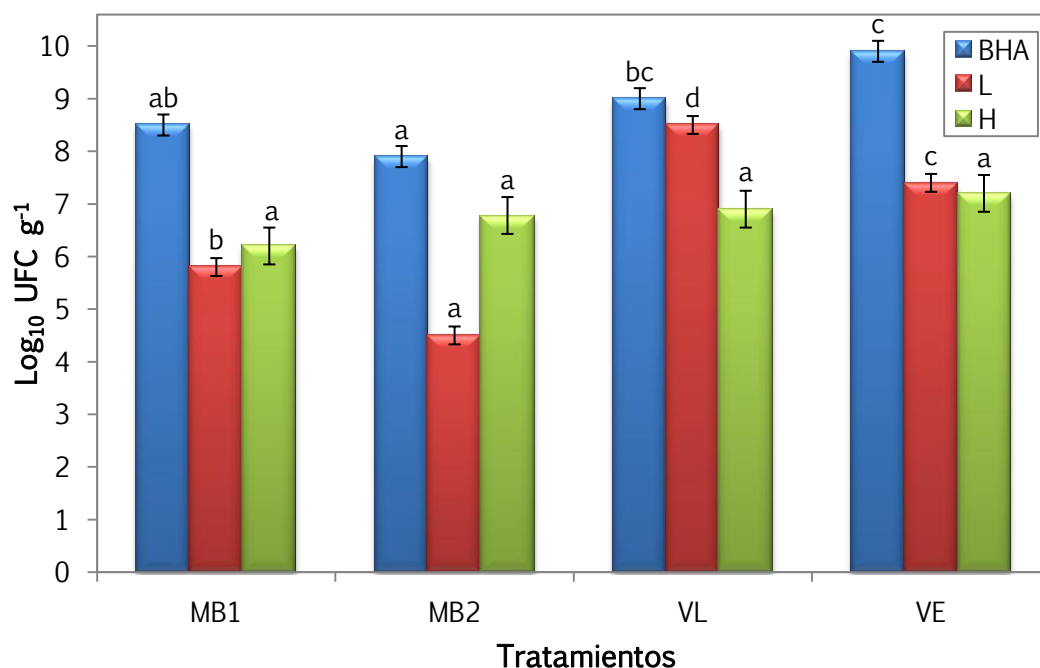


Figura 2.1 Recuento de bacterias heterótrofas aerobias (BHA), hongos filamentosos (H) y levaduras (L) en el descarte de cebolla de las distintas localidades. *MB* Mayor Buratovich, *VL* Villalonga, *VE* Viedma

2.3.2. Crecimiento en el medio de cebolla

De las ochenta y tres cepas cultivadas en CN previo al ensayo, treinta de ellas no alcanzaron la DO_{620} requerida (0,5) durante el período de incubación, por lo tanto no fueron incluidas en el experimento. Cincuenta y tres aislamientos obtenidos del residuo de cebolla fueron capaces de desarrollar en MJC a 28 °C y solamente cinco crecieron en este medio a 4 °C. Las cepas presentaron diferente crecimiento en respuesta al contenido de nutrientes de los medios de cultivo y a las temperaturas de incubación. Para una mejor discusión, se las organizó en cuatro grupos teniendo en cuenta la temperatura y el medio de cultivo donde obtuvieron mejor desarrollo (Fig. 2.2). La mayoría de los aislamientos desarrolló mejor en CN (40,4 %, grupo 1). Las bacterias incluidas en el grupo 2 alcanzaron casi la misma turbidez en ambos medios (34,6 %). Por otra parte, el 17,3 % de las cepas crecieron mejor en MJC que en CN (grupo 3). Finalmente, el 7,7 % de los cultivos fueron también capaces de desarrollar en MJC a 4 °C (grupo 4). La Tabla 2.3 muestra la distribución de las cepas en cada grupo en base a la localidad de procedencia.

2.3 Resultados

Una bacteria presentó un caso particular de crecimiento (Fig. 2.2, cepa VE-74). Este microorganismo no coincidió con ninguno de los grupos descritos anteriormente. El patrón de crecimiento de la cepa VE-74 cambió con la temperatura, tuvo mayor turbidez en MJC que en CN a 28 °C pero lo opuesto ocurrió a 4 °C.

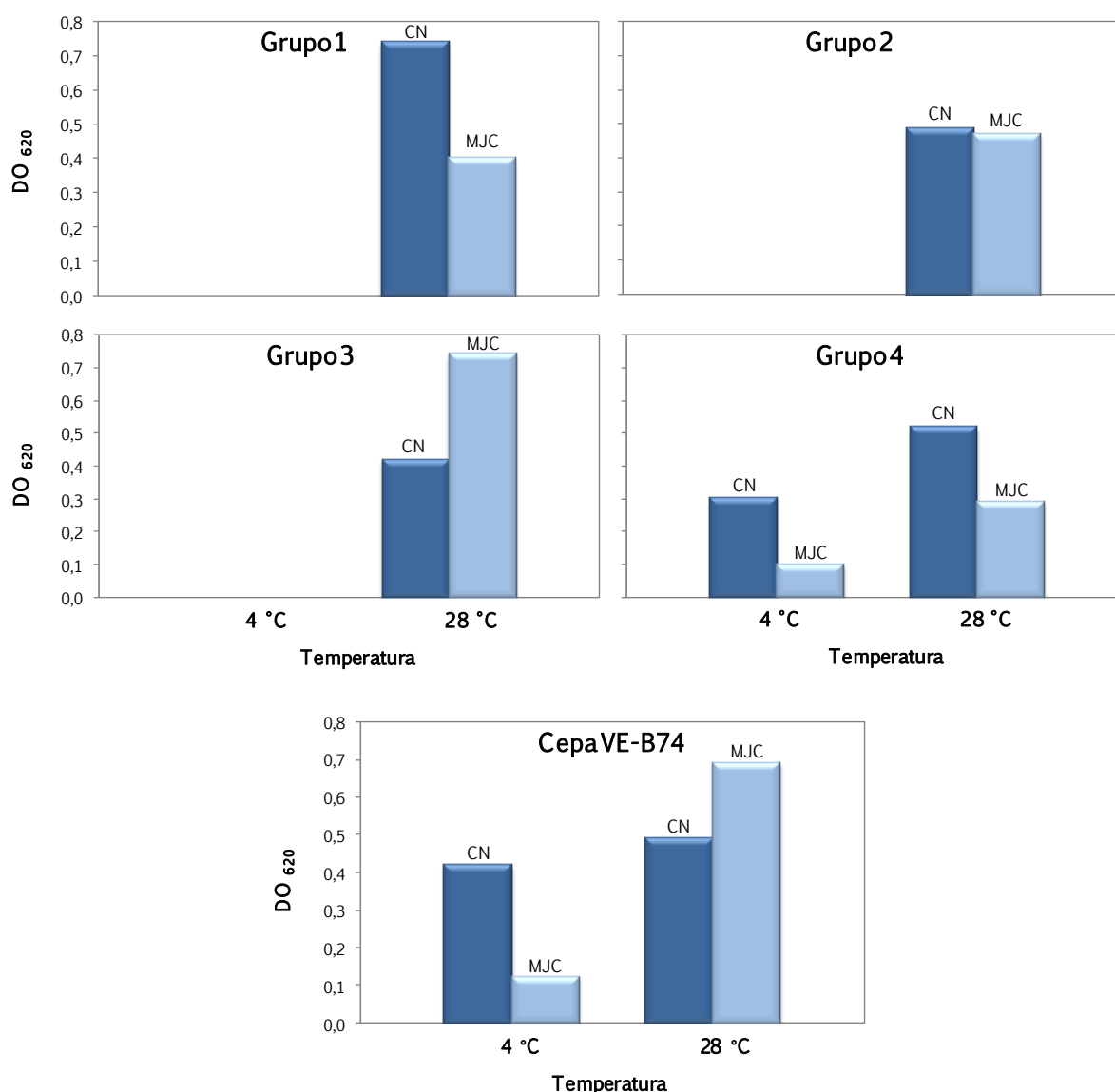


Figura 2.2 Crecimiento bacteriano en caldo nutritivo (CN) y medio de cebolla (MJC) a 4 y 28 °C luego de 7 días de incubación. En los gráficos se representa la cepa más cercana al valor medio de cada grupo. *Grupo 1* representa las cepas que desarrollaron mejor en CN; *Grupo 2* corresponde a las bacterias que lograron la misma turbidez en ambos medios; *Grupo 3* esquematiza las cepas que crecieron mejor en MJC; *Grupo 4* incluye a las bacterias que fueron capaces de desarrollar en ambos medios a 4 y 28 °C. La cepa VE-74 tuvo una respuesta de crecimiento única

2.3 Resultados

Tabla 2.3 Número de cepas por grupo de crecimiento y localidad de procedencia

Grupo	Localidad			Total Grupo
	MB	VL	VE	
1	10	6	5	21
2	11	6	1	18
3	7	2	0	9
4	1	0	3	4
Total Localidad	29	14	9	52

2.3.3. Patrones de utilización de sustratos carbonados

El ensayo de utilización de sustratos se realizó con la finalidad de caracterizar la capacidad de las cepas para metabolizar treinta y un SC y para seleccionar aquellas que pudieran utilizar los carbohidratos no estructurales presentes en el bulbo de cebolla como evaluación de su potencial para la degradación de la cebolla.

Ninguna cepa exhibió crecimiento sobre lactosa, rafinosa, sorbosa, tiamina, catecol y ácido ascórbico, mientras que tres o menos cepas utilizaron ramnosa, inulina y cisteína como única fuente de carbono y energía. Además, veinticuatro aislamientos fueron incapaces de consumir alguno de los SC durante el período del ensayo. Como consecuencia, las cepas y SC mencionados no fueron incluidos en el análisis.

Entre los seis sustratos más utilizados, la mitad fueron carbohidratos: glucosa (72,4 %), manitol (58,6 %) y maltosa (48,3 %). Dextrina y asparagina fueron consumidas por el 58,6 % de los aislamientos. Teniendo en cuenta los ácidos carboxílicos, el piruvato fue el más utilizado (48,3 %), no obstante el citrato estimuló la actividad promedio más elevada. Los sustratos más pobremente consumidos fueron arabinosa, xilosa, ácido malónico y benzoato.

2.3 Resultados

La relación entre las veintinueve cepas estudiadas basada en la utilización de veinte SC se representó en un dendrograma. El análisis de cluster dividió a veintidós de los veintinueve aislamientos en cuatro grupos a una distancia Euclídea de 0,19 (Fig. 2.3). El cluster I quedó compuesto por diez cepas caracterizadas por escaso crecimiento sobre los SC (Tabla 2.4). La mayoría ($\geq 80\%$) de las bacterias pertenecientes al cluster II desarrollaron sobre siete SC: dos hexosas (glucosa, manitol), tres ácidos carboxílicos (citrato, piruvato, succinato), un aminoácido (asparagina) y benzoato, exclusivamente consumido por este grupo. Las dos cepas del cluster III consumieron ácidos carboxílicos (acetato, succinato, piruvato) y aminoácidos (asparagina, glutamato). Finalmente, el cluster IV consumió un polímero (dextrina), un alcohol (glicerol) y fue el único grupo que desarrolló sobre todos los carbohidratos. Las cepas agrupadas a una mayor distancia Euclídea ($> 0,2$; cepas *outlier*) presentaron un amplio rango de utilización de SC.

Las cepas incluidas en el cluster IV (MB2-5, MB1-7, MB1-42, MB2-60 y MB2-62) y tres cepas *outlier* (MB1-45, MB1-46, y VL-80) fueron capaces de usar los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en el bulbo de cebolla. Entre estos aislamientos, VL-80 logró la DO más elevada en estos tres carbohidratos. Curiosamente, VL-80 fue la única cepa capaz de crecer sobre todos los SC incluidos en el análisis. Las cepas MB1-42, MB2-5 y MB2-62 consumieron mayormente carbohidratos, como celobiosa, fructosa, glucosa, maltosa, manitol y sacarosa. El aislamiento que presentó un patrón de crecimiento único en MJC, VE-74, fue capaz de utilizar solo cuatro hidratos de carbono (glucosa, manitol, galactosa y arabinosa). En base a las características de desarrollo sobre SC y a las respuestas de crecimiento en MJC, estas nueve cepas fueron seleccionadas para estudiar su capacidad de utilizar la hoja interna de cebolla como única fuente de nutrientes.

2.3 Resultados

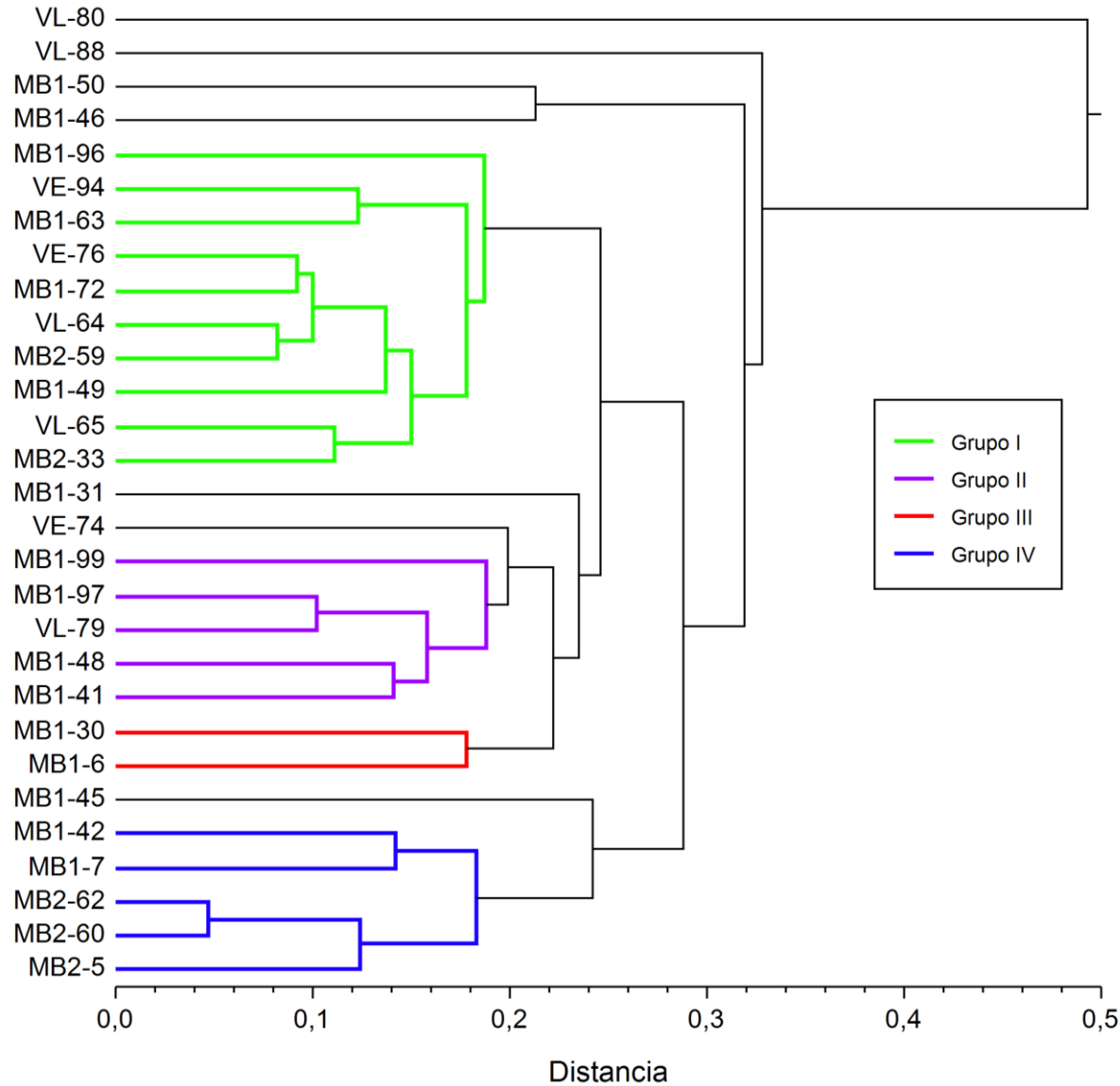


Figura 2.3 Dendrograma mostrando la relación fenotípica, basado en la utilización de 20 fuentes carbonadas entre 29 cepas. El análisis de cluster se realizó con el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA) y la distancia Euclídea. El coeficiente de relación cofenética (r) fue 0,867

2.3 Resultados

Tabla 2.4 Utilización de sustratos carbonados (SC) por clusters y cepas *outlier*^a

Sustrato carbonado	% de cepas utilizando SC en el cluster:				Utilización de SC por las cepas <i>outlier</i> ^c						
	I (n ^b =10)	II (n =5)	III (n =2)	IV (n =5)	MB1-45	VE-74	MB1-31	MB1-50	MB1-46	VL-88	VL-80
<i>Carbohidratos</i>											
L-arabinosa	0	0	0	40	1	1	0	0	0	0	1
D-celobiosa	50	0	0	100	1	0	1	0	0	0	1
D-fructosa	0	20	0	100	1	0	0	0	1	0	1
D-galactosa	20	0	0	60	1	1	1	0	1	0	1
D-glucosa	50	80	50	100	1	1	1	1	1	0	1
maltosa	40	0	50	100	1	0	0	1	1	0	1
D-manitol	40	80	0	80	1	1	0	1	1	0	1
D-manosa	30	20	0	60	1	0	1	1	1	0	1
sacarosa	20	0	0	100	1	0	1	1	1	0	1
D-xilosa	10	0	0	40	1	0	1	0	0	1	1
<i>Ácidos carboxílicos</i>											
acetato	20	60	100	0	1	0	1	1	0	1	1
citrato	10	100	50	0	0	1	1	1	1	1	1
succinato	10	80	100	0	1	0	1	1	1	1	1
ác. malónico	0	40	50	0	1	0	1	0	0	0	1
piruvato	20	80	100	0	1	0	1	1	1	1	1
<i>Aminoácidos</i>											
L-asparagina	40	100	100	0	1	1	1	1	1	0	1
L-glutamato	10	60	100	0	1	1	0	1	1	1	1
<i>Compuesto aromático</i>											
benzoato	0	80	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Polímero</i>											
dextrina	50	20	50	100	1	0	1	1	1	0	1
<i>Alcohol</i>											
glicerol	10	40	0	60	1	1	1	1	1	0	1

^a Clusters y cepas *outlier* de acuerdo al dendrograma (ver Fig. 2.3)

^b número de cepas incluidas en el cluster (ver Fig. 2.3)

^c 1 = utilización de SC (DO = 0,2 – 0,9); 0 = no utilización (DO <0.2)

2.3 Resultados

2.3.4. Desarrollo con trozos de cebolla como fuente de nutrientes

Con este ensayo se buscó comprobar si las cepas seleccionadas eran capaces de macerar el tejido de cebolla debido a que el digestor anaeróbico se cargará con trozos de bulbos.

Todas las cepas estudiadas desarrollaron con los trozos de cebolla como fuente de nutrientes, observándose diferentes características de degradación. En la figura 2.4 se observa que la cepa VE-74 tuvo escasa turbidez durante todo el ensayo, mientras que MB2-5, MB1-42 y MB1-46 presentaron un rápido desarrollo ($DO_{620}= 0,3$ en 24 h). A su vez, MB2-5 y MB1-42 alcanzaron la mayor DO durante el experimento. La cepa VL-80 desarrolló sobre la cebolla formando agregados y las cepas MB2-60 y MB2-62 produjeron biofilm (Fig. 2.5). Debido a las características de crecimiento de estos tres aislamientos, sus valores de DO no fueron considerados para evitar subestimaciones. Las cepas MB2-60 y MB2-62 fueron las únicas que lograron macerar el tejido de cebolla casi completamente (Fig. 2.5).

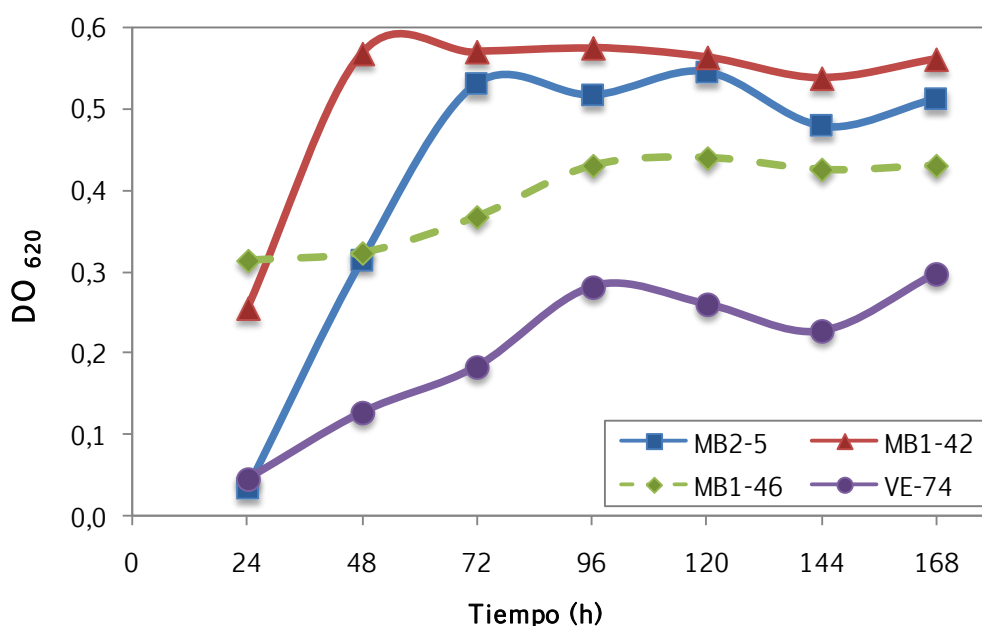


Figura 2.4 Curvas de crecimiento de las cepas MB2-5, MB1-42, MB1-46 y VE-74 utilizando trozos de cebolla como única fuente de nutrientes

2.3 Resultados

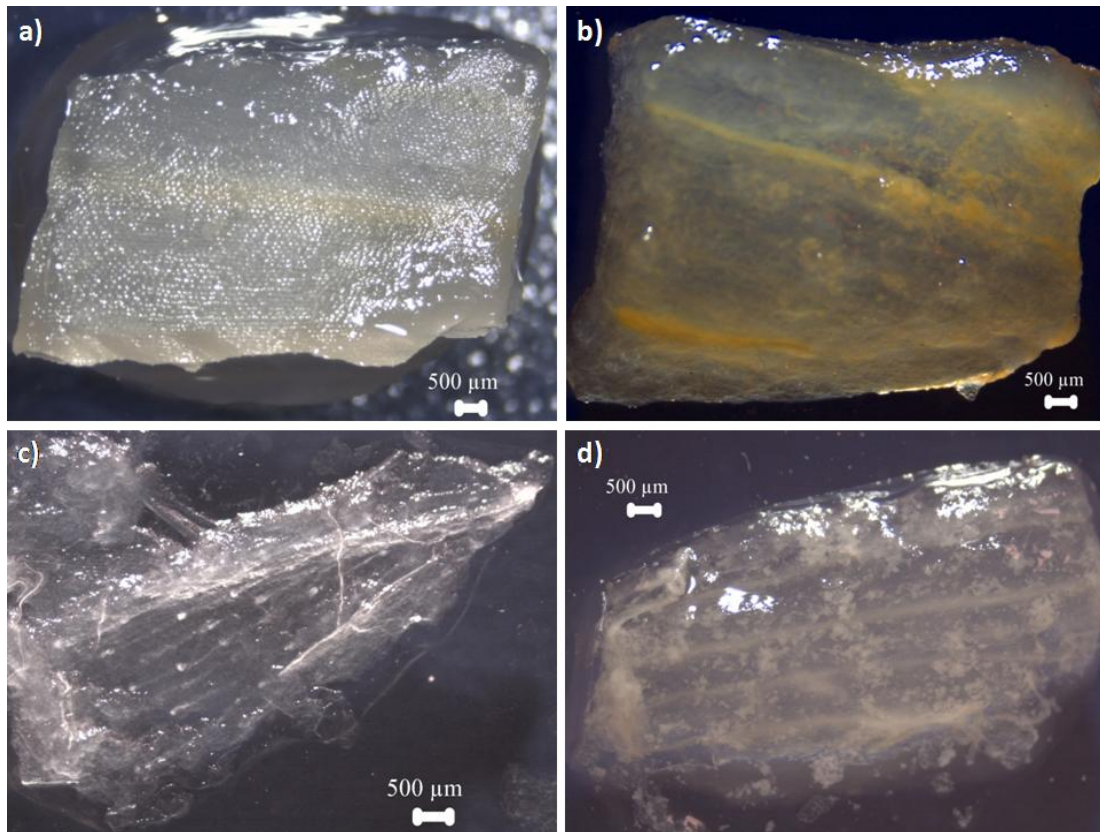


Figura 2.5 Imágenes de trozos de cebolla con diferentes niveles de maceración del tejido tomadas con microscopio estereoscópico luego del ensayo de degradación: a control, b VE-74, c MB2-62 y d VL-80

2.3.5. Identificación de las cepas

Teniendo en cuenta sus distintas performances en la degradación de la cebolla, se seleccionaron cinco cepas (MB2-5, MB1-42, MB2-62, VE-74 y VL-80) para una mayor caracterización. Las células de la cepa MB2-5 eran bacilos Gram negativos y las colonias eran amarillas en AN. Las cepas MB1-42 y MB2-62 eran bacilos Gram positivos formando colonias blanquecinas en las cajas de Petri con AN. La morfología de VE-74 era bacilar con tinción Gram negativa y colonias translúcidas. Finalmente, las células de VL-80 eran cocos Gram positivos agrupados en tétradas y formaban colonias con pigmentación amarilla.

La electroforesis en gel de agarosa de los productos PCR del ITS reveló un perfil de bandas diferente para cada cepa (Fig. 2.6). Se obtuvo una banda para los aislamientos MB2-5 (650 pb) y VE-74 (603 pb), y dos o más bandas para las cepas MB1-42 (390, 507 pb), MB2-62 (336, 499 pb) y VL-80 (499, 608, 948 pb).

2.3 Resultados

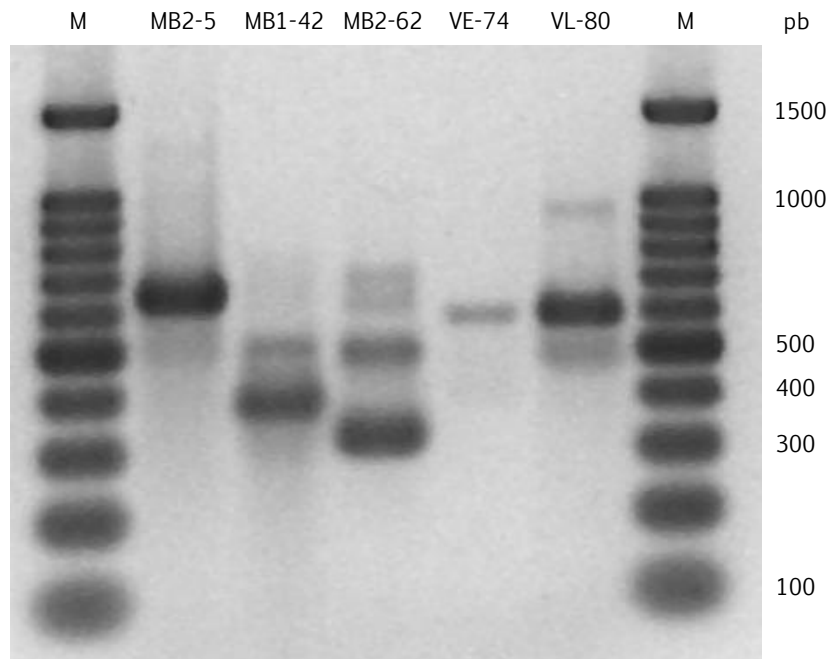


Figura 2.6 Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados con los cebadores 38r y 72f. Todas las cepas amplificaron un patrón de bandas único. Agarosa 2 % (p/v) en buffer TAE 1x, teñido con GelRed. *M* marcador de peso molecular de 100 pb.

Las secuencias de nucleótidos para las cepas MB1-42, MB2-5, MB2-62, VE-74 y VL-80 figuran en GenBank con los números de acceso KJ843149 a KJ843153 respectivamente. Las secuencias del ADNr 16S obtenidas mostraron que la cepa MB2-5 tenía un 99 % de semejanza con *Pseudoxanthomonas suwonensis* cepa 11-1 (Nº Acceso NC 014924). Las cepas MB1-42 y MB2-62 tuvieron 100 % de similitud con *Bacillus megaterium* cepa DSM 319 (Nº Acceso CP 001982) y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* cepa 168 (Nº Acceso NC 000964), respectivamente. La cepa VL-80 exhibió un alto nivel (99 %) de similitud de la secuencia nucleotídica con *Micrococcus luteus* cepa NCTC 2665 (Nº Acceso NC 012803). Finalmente, VE-74 estuvo altamente relacionada (99 %) con *Pseudomonas poae* cepa RE*1-1-14 (Nº Acceso NC 020209).

2.4. Discusión

La selección de bacterias nativas puede ser un enfoque adecuado para hallar un inóculo apropiado para mejorar la hidrólisis del residuo de cebolla. Con la finalidad de caracterizar las cepas bacterianas aisladas del descarte de cebolla y de identificar a los mejores candidatos, analizamos el crecimiento de los aislamientos en un medio preparado con jugo de cebolla y evaluamos la utilización de SC. Finalmente, se probó la capacidad de nueve cepas seleccionadas para desarrollar utilizando trozos de cebolla. Las cepas más destacadas fueron identificadas mediante secuenciación del gen 16S ARNr. Dos cepas, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* MB2-62 y *Pseudomonas poae* VE-74, presentaron características que las convierten en candidatas prometedoras para futuros estudios de bioaumentación en DA.

2.4.1. BHA, hongos filamentosos y levaduras cultivables

A pesar de la alta concentración de compuestos organosulfurados, y las propiedades antibacterianas y antifúngicas de las cebollas, los recuentos microbianos fueron similares a los hallados por Ryckerboer *et al.* (2003a) y por Chroni *et al.* (2009) en la degradación inicial de una mezcla de desechos de comida y poda. Esas mezclas contenían mayor variedad de nutrientes y no representaban un ambiente restrictivo para los microorganismos como es la cebolla. Esto sugiere la existencia de una microbiota que se encuentra adaptada a las peculiaridades del residuo de cebolla. De acuerdo a lo esperado, el recuento de BHA en todos los tratamientos fue superior al de hongos filamentosos y levaduras. El número de BHA y levaduras que proliferaron durante el proceso de degradación difirió entre las localidades y es razonable suponer que esas poblaciones microbianas no solo provienen del material de partida (bulbos de cebolla) sino también del suelo donde la cebolla fue cultivada (Jay 2000a). Los altos recuentos microbianos encontrados sugieren que el residuo de cebolla sustenta una abundante comunidad microbiana. Según Ishii y Takii (2003), los microorganismos

2.4 Discusión

que proliferen en los procesos de degradación de la MO estarán adaptados al ambiente donde ocurre el proceso y serán seleccionados por las características químicas del sustrato que está siendo degradado.

En MB1 la carga microbiana fue similar a los tratamientos restantes a pesar de haber sido almacenada durante un mes en el refrigerador. Esto sugiere que almacenar las cebollas a 4 °C no causa un efecto negativo en la subsiguiente degradación. Ha sido ampliamente reportado que los agentes responsables del deterioro de frutas y verduras son las bacterias y levaduras, incluso bajo temperaturas de refrigeración (Ancasi *et al.* 2006; Brocklehurst y Lund 1981; Jay 2000b). Warade y Kadam (2004) recomiendan el almacenamiento de las cebollas a 0 °C para preservarlas, ya que temperaturas superiores (4 °C) no impiden la proliferación microbiana.

2.4.2. Desarrollo en medio de cultivo preparado con jugo de cebolla

Se asume que nueve bacterias, incluidas en el grupo 3 (Fig. 2.2), están mejor adaptadas al ambiente de la cebolla que el resto de los aislamientos debido a que tuvieron una mejor performance en MJC que en el medio control. El comportamiento de los microorganismos incluidos en el grupo 4 demuestra su capacidad para crecer sobre cebolla a bajas temperaturas.

En general, los microorganismos provenientes de distintos sitios de muestreo presentaron patrones de crecimiento diferentes. Esto sugiere una diferencia en la diversidad fisiológica microbiana entre los residuos de cebolla recolectados en las distintas localidades. Además, el patrón de crecimiento único de la cepa VE-74 sugiere que probablemente hay una aún mayor diversidad metabólica en las comunidades bacterianas asociadas al residuo de cebolla que no fueron aisladas en este estudio. A eso se agrega que la composición de los residuos también influyó en la diversidad microbiana. Por ejemplo, el residuo de MB estaba mayormente compuesto por bulbos con enfermedades bacterianas, mientras que el descarte de VE estaba compuesto de catáfilas protectoras, raíces y hojas superiores. Todo lo mencionado causó diferentes presiones de selección en los

2.4 Discusión

microorganismos, resultando en estrategias de crecimiento metabólicamente versátiles.

El hecho de que las cebollas contengan alicinas y compuestos azufrados (Horiuchi *et al.* 2000) con actividad antibacteriana podría ser la razón por la cual la mayoría de los cultivos desarrollaron mejor en CN que en MJC. Sin embargo, hubo aislamientos que crecieron mejor en MJC (cepas del grupo 3 y VE-74), estos están claramente adaptados al jugo de cebolla y se presume que serían capaces de sobrevivir a las características químicas del residuo de cebolla.

En la bibliografía se encontró un solo estudio en el que se emplea medio de cultivo preparado con cebolla para el aislamiento selectivo de bacterias patógenas y bacterias asociadas a cebolla (Zaid *et al.* 2012). Aunque estos autores utilizaron extracto de cebolla como la principal fuente de nutrientes para su medio de cultivo, lo sometieron a esterilización por autoclave durante 35 min a 120 °C en dos ocasiones. Es conocido que la esterilización en autoclave modifica la concentración de azúcares solubles (Singleton 2004), los cuales son precisamente uno de los principales constituyentes de los bulbos. Como consecuencia, los nutrientes del extracto de cebolla probablemente fueron diferentes a los del bulbo. Por lo tanto, el medio preparado en este trabajo tendría mayor similitud con las propiedades de la cebolla ya que se utilizó jugo de cebolla puro y una esterilización de corta duración en autoclave. En consecuencia, el medio desarrollado sería más apropiado para el aislamiento de microorganismos nativos de la cebolla. El MJC permitió el desarrollo de cincuenta y tres cultivos de bacterias asociadas al residuo de cebolla y como resultado se pudieron identificar cuatro grupos de crecimiento diferentes. Entre las cepas aisladas hubo representantes de los phylum *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*.

2.4.3. Perfiles de utilización de sustratos carbonados

En las comunidades bacterianas ambientales, la glucosa sustenta gran parte del crecimiento bacteriano. Este monosacárido fue utilizado por la mayoría de las cepas, sin embargo la fructosa estimuló una mayor actividad en aquellas cepas que pudieron usar ambas hexosas. Casi todas las cepas lograron degradar al menos un

2.4 Discusión

carbohidrato, pero la utilización de sustratos con estructura molecular más compleja (ej. benzoato) fue llevada a cabo por pocas cepas. En general, los aislamientos que lograron alta DO en MJC también tuvieron alto consumo de carbohidratos en el test de SC.

El análisis de conglomerados demostró que había notables diferencias en el consumo de SC entre las cepas aisladas del residuo de cebolla. Es conocido que la degradación de sustratos depende en gran medida de la especie o incluso de las habilidades específicas de la cepa (Verniere *et al.* 1993). Los cluster II y III quedaron constituidos por cepas distinguidas por el consumo de ácidos carboxílicos. Las bacterias incluidas en los grupos I y IV se caracterizaron por crecer sobre carbohidratos. Las cepas identificadas del cluster IV, *P. suwonensis*, *B. megaterium* y *B. subtilis* subsp. *subtilis*, pertenecen a phyla lejanamente relacionados (*Proteobacteria* y *Firmicutes*). Sin embargo, estos microorganismos comparten la capacidad de desarrollar sobre varios carbohidratos (Goodfellow 2012). Esto podría indicar que perfiles similares de consumo de sustratos no necesariamente involucran una relación filogenética cercana. Las comunidades microbianas ambientales se caracterizan por una redundancia de funciones, varias capacidades suelen estar distribuidas sobre poblaciones taxonómicamente diferentes (Nannipieri *et al.* 2003). Un elevado grado de redundancia es el factor más importante que controla la tasa de descomposición de la MO (Andrén *et al.* 1995). Como resultado, el dendrograma presentado en este estudio probablemente esté reflejando grupos funcionales.

La cepa outlier VE-74, identificada como *P. poae*, consumió preferentemente carbohidratos y aminoácidos. Esta cepa presentó las características descritas para la especie con la excepción de que fue incapaz de utilizar la sacarosa (Behrendt *et al.* 2003). La mayor diferencia en el patrón de utilización de SC se observó en la cepa VL-80. Este aislamiento, identificado como *M. luteus*, se agrupó a la mayor distancia en el dendrograma. La amplia capacidad para utilizar SC de VL-80 se debe probablemente al hecho de que pertenece a un grupo (*Actinobacteria*) caracterizado por microorganismos que exhiben diversas propiedades fisiológicas y metabólicas (Ventura *et al.* 2007). Las características morfológicas de la cepa VL-80

2.4 Discusión

fueron compatibles con las descritas para la especie *M. luteus* (Schleifer 2009). Por el contrario, VL-80 se diferenció de *M. luteus* cepa NCTC 2665 en la utilización de varios SC como maltosa, xilosa, acetato y citrato (Wieser *et al.* 2002). No obstante, los SC consumidos por VL-80 se correspondieron con las características fisiológicas descritas para la especie *M. luteus* y para cepas estrechamente relacionadas (Schleifer 2009; Wieser *et al.* 2002).

A lo largo de los diferentes análisis realizados, se podría asumir que la muestra MB1 tuvo la mayor diversidad funcional. Las cepas aisladas de esta muestra se distribuyeron en todos los grupos del análisis de cluster y la mayoría de las cepas que no fueron incluidas en los cluster también pertenecían a MB1. La gran diversidad funcional de MB1 pudo haber sido estimulada por la presión de selección causada por el almacenamiento de la muestra a 4 °C durante un mes. Es sabido que este tipo de conservación causa una disminución en los grupos más abundantes, permitiendo el desarrollo de otros microorganismos (Goberna *et al.* 2005).

En resumen, la heterogeneidad observada en la utilización de SC puede ser una consecuencia de las condiciones ambientales cambiantes y de la disponibilidad de nutrientes en los diferentes estados de degradación del residuo de cebolla. Las cepas capaces de utilizar diversos SC pueden tener mayores posibilidades de supervivencia y de aprovechamiento del sustrato.

2.4.4. Selección de cepas degradadoras del residuo de cebolla

La presencia de múltiples bandas de ITS concuerda con el hecho de que algunas de las cepas poseen múltiples operones de ARNr (Gürtler y Stanisich 1996; Klappenbach *et al.* 2000). Las secuencias del gen 16S ARNr obtenidas de los cultivos degradadores de cebolla exhibieron una amplia diversidad bacteriana, con cepas pertenecientes a tres phylum diferentes: *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Todas las cepas secuenciadas pertenecían a géneros que están comúnmente asociados a la degradación de diferentes residuos de biomasa. Representantes de *Bacillus* y *Pseudomonas* son frecuentemente detectados en la etapa hidrolítica de la DA (Bolarinwa y Ugoji 2010; Cardinali-Rezende *et al.* 2011;

2.4 Discusión

Chachkhiani *et al.* 2004). Particularmente, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *M. luteus* y *P. suwonensis* han sido hallados en compost y los tres primeros también han sido detectados en residuos orgánicos domiciliarios y agrícolas (Ryckeboer *et al.* 2003b; Weon *et al.* 2006). Por el contrario, *P. poae* RE*1-1-14 únicamente ha sido reportada como endófita de la remolacha azucarera (Müller *et al.* 2013). Solo *B. megaterium* y *B. subtilis* han sido previamente descriptos asociadas a la cebolla (Obi y Umezurike 1981; Zaid *et al.* 2012).

En este estudio, la cepa MB2-62 identificada como *B. subtilis* subsp. *subtilis* tuvo la mejor performance en la degradación de los trozos de cebolla. Este aislamiento fue incluido en el grupo 3, que comprendía a las bacterias potencialmente adaptadas al residuo de cebolla. A su vez VE-74, identificada como *P. poae*, presentó un patrón de crecimiento particular que sugiere que esta cepa está adaptada para crecer utilizando los nutrientes de cebolla en un amplio rango de temperaturas (4–28 °C). Por consiguiente, estas dos cepas podrían ser empleadas como inóculos en la biodegradación del residuo de cebolla con la finalidad de mejorar la etapa hidrolítica. Se ha comprobado que un producto comercial formulado con cepas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* optimiza la metanogénesis y reduce olores en la DA (Duran *et al.* 2006). Además, las cepas MB2-62 y VE-74 potencialmente podrían utilizarse como agentes biocontroladores de fitopatógenos de cebolla, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotium cepivorum*, ya que ha sido reportada una actividad antagonista contra estos hongos por parte de diferentes cepas de *B. subtilis* y por *P. poae* RE*1-1-14 (Asaka y Shoda 1996; Müller *et al.* 2013; Obi y Umezurike 1981; Phae *et al.* 1990; Utkhede y Rahe 1983).

2.5. Conclusiones

Las técnicas diseñadas, utilizando jugo y trozos de cebolla como nutrientes, fueron adecuadas para evaluar el crecimiento y la capacidad degradativa de las cepas nativas.

2.5 Conclusiones

El residuo de cebolla posee una densa y diversa microbiota, que puede adaptarse a distintas situaciones ambientales, en particular a las bajas temperaturas.

La microbiota asociada a la cebolla puede sustentarse y crecer a partir de los nutrientes de la misma, capacidad que le permite degradar el residuo.

Capítulo III

DetECCIÓN Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS CELULOLÍTIICAS ANAEROBIAS

3.1. Introducción

La pared de la célula vegetal consiste en una matriz compleja de polisacáridos; sus principales constituyentes son celulosa, hemicelulosa y lignina. Estos polímeros otorgan a la célula estructura y firmeza, haciéndola resistente al ataque mecánico, químico y microbiano. A pesar de su naturaleza recalcitrante, cuando el material vegetal está en descomposición, los polisacáridos de la pared celular proporcionan una fuente excepcional de C y energía, y una multitud de microorganismos diferentes han evolucionado para degradar los polisacáridos de la pared celular de las plantas. Fundamentalmente, diferentes tipos de enzimas son necesarias para su degradación y ningún microorganismo es capaz de degradar completamente todos los polímeros presentes en la célula vegetal sin la ayuda de otros (Bayer *et al.* 2013; Zverlov *et al.* 2015).

La celulosa es un homopolímero estable que se organiza en cadenas largas, paralelas y homogéneas de monómeros de glucosa unidos con enlaces β -1,4. Las cadenas lineales de glucosa se agrupan mediante enlaces de hidrógeno en estructuras cristalinas llamadas microfibrillas. El empaquetamiento de las cadenas

3.1 Introducción

de glucosa en las microfibrillas genera una superficie hidrofóbica. La celulosa es así un material resistente a la hidrólisis enzimática (Bayer *et al.* 2013; Zverlov *et al.* 2015).

Todos los microorganismos capaces de degradar celulosa cristalina secretan un conjunto de celulasas con diferentes especificidades y modo de acción, que actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa a azúcares solubles que pueden ser asimilados. Las celulasas son miembros de la amplia familia de glucósido hidrolasas, e incluyen el gran número de endo y exoglucanasas que hidrolizan los enlaces β -1,4-glucosídicos dentro de las cadenas que componen el polímero de celulosa (Bayer *et al.* 2013; Béguin 1990). En la naturaleza existen tres patrones dominantes para los sistemas de enzimas microbianas implicadas en la descomposición enzimática de las paredes celulares de plantas. Estas tres configuraciones de sistemas celulasa¹ son: enzimas individuales libres (ej. *Clostridium stercorarium*), enzimas multifuncionales (ej. *Caldicellulosiruptor bescii*) y complejos multienzimáticos (celulosomas) (ej. *Clostridium thermocellum*). El celulosoma es el sistema celulasa más eficaz conocido hasta el momento y se lo ha encontrado sólo en bacterias anaerobias (Koeck *et al.* 2014; Yang *et al.* 2011). Una extensa descripción de las características fisiológicas y del celulosoma de los clostridios ha sido realizada por Desvaux (2005) y Zverlov y Schwarz (2008).

Los microorganismos celulolíticos ocupan una amplia gama de hábitats, siendo ubicuos en la naturaleza. Algunos son de vida libre y otros están estrechamente relacionados con animales, residiendo en el tracto digestivo de los rumiantes y otros herbívoros o en los intestinos de las termitas y gusanos degradadores de madera. Los microorganismos celulolíticos incluyen protozoos, hongos y bacterias (Bayer *et al.* 2013). Se pueden formar dos grupos fisiológicos generales de bacterias celulolíticas: las aeróbicas y las anaeróbicas. La diferencia entre ellas es la ganancia de energía a partir de los azúcares obtenidos de la celulosa. A partir de la misma cantidad de glucosa, las bacterias anaeróbicas pueden producir por fermentación aproximadamente solo 1/10 del ATP que forman las bacterias aeróbicas mediante respiración. Por lo tanto, las enzimas que

¹ El conjunto de celulasas que son sintetizadas por una determinada bacteria

3.1 Introducción

producen glucosa a partir de celulosa en condiciones anaerobias, tienen que ser por lo menos diez veces más activas para compensar la energía utilizada para su producción (Zverlov *et al.* 2015).

En la naturaleza, los materiales celulósicos son degradados mediante la cooperación de diferentes bacterias celulolíticas que interactúan con muchas especies no-celulolíticas. Las combinaciones de microbios y enzimas varían en los diferentes ecosistemas en función del sustrato inicial y de los factores ambientales (Lynd *et al.* 2002). Los efectos sinérgicos en la hidrólisis de la celulosa se han podido observar en el laboratorio entre enzimas con especificidad de sustrato similar producidas por una misma bacteria o entre exoenzimas producidas por diferentes bacterias (Kato *et al.* 2005; Zverlov *et al.* 2010). Distintos estudios han reportado que un cultivo mixto de una bacteria celulolítica junto con otra no-celulolítica promueve la degradación de la celulosa (Fondevila y Dehority 1996; Haruta *et al.* 2002; Kato *et al.* 2004; Kudo *et al.* 1987).

La celulosa es el principal componente de la pared celular, por lo tanto, es el polímero orgánico más abundante en la Tierra y representa un gran potencial para la producción de biogás. Las hojas protectoras de la cebolla están compuestas principalmente por celulosa y polisacáridos pécticos. La cebolla posee gran cantidad de fibra dietaria insoluble, la cual aumenta desde las hojas interiores hacia las exteriores. La fibra dietaria insoluble de la catáfila constituye en promedio 44 % de la fibra dietaria total del bulbo de cebolla (Jaime *et al.* 2002).

La velocidad de degradación de la celulosa es extremadamente lenta y necesita la presencia de un consorcio de enzimas diferentes y especializadas que actúen cooperativamente para romper la superficie (Bayer *et al.* 2013; Zverlov *et al.* 2015). La mayoría de las bacterias capaces de degradar eficazmente la celulosa natural, conocidas hasta el momento, pertenecen al phylum *Firmicutes*, en particular a la clase *Clostridia*. En caracterizaciones realizadas de las comunidades productoras de biogás en biorreactores rurales, se encontró que la mayoría de las bacterias identificadas pertenecían a la clase *Clostridia* (Cirne *et al.* 2007; Krause *et al.* 2008; Wirth *et al.* 2012). La alta abundancia de miembros celulolíticos en la clase *Clostridia* indica el importante rol de estas

3.1 Introducción

bacterias para la degradación de sustratos complejos en la remineralización natural de la biomasa (Zverlov *et al.* 2015).

El agregado de una comunidad microbiana mixta con superior capacidad de degradar la catáfila de cebolla, podría acelerar los procesos hidrolíticos, lo que resultaría en una producción de biogás más rápida y eficiente mediante mayor utilización del sustrato en menor tiempo. Las bacterias hidrolíticas añadidas a los biorreactores estarán adaptadas a la composición del sustrato y producirán los tipos y cantidades de enzimas necesarias para degradar los diversos polisacáridos de la cebolla. Los azúcares liberados por su actividad serán el sustrato de las otras bacterias integrantes de la cadena de reacciones fermentativas para la producción de biogás.

Los objetivos planteados en este capítulo fueron: 1) analizar la presencia de cultivos con actividad celulolítica en anaerobiosis en el residuo de cebolla, 2) estudiar la capacidad de los cultivos celulolíticos anaeróbicos en la degradación de la catáfila protectora de cebolla y 3) aislar e identificar las bacterias esporuladas pertenecientes a los cultivos con mejor capacidad degradadora.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Muestras utilizadas como fuente de microorganismos

Se procedió a la obtención de cultivos con capacidad celulolítica en anaerobiosis a partir de muestras de cebollas en diferente estado de degradación (MB1, MB2, VL y VE² descritas en el capítulo. II, inciso 2.2.1). Además se tomaron muestras de los biorreactores que presentaron degradación completa de la cebolla, descritos en el capítulo IV.

² Denominación de las muestras según la localidad de procedencia: MB, Mayor Buratovich, VL, Villalonga, VE, Viedma.

3.2.2. Obtención de cultivos celulolíticos anaerobios

Se diseñó un método para detectar la actividad celulolítica, para ello se combinó el medio de cultivo descrito por Sudha Rani y Seenayya (1999) con la técnica propuesta por Volokita *et al.* (2000).

De cada muestra se tomaron dos submuestras de 10 ml y se colocaron en frascos con 90 ml de ADE. Estas suspensiones se agitaron durante 30 min a 200 rev/min a temperatura ambiente. Se realizaron diluciones decimales y por cada submuestra se sembraron seis placas de Petri con el medio de cultivo para el aislamiento de bacterias celulolíticas anaeróbicas (MCA, Anexo I). Para la detección de la actividad celulolítica se colocó, como fuente de carbono, un disco de papel *tissue* estéril en la superficie de las placas recientemente inoculadas. Posteriormente, se incubaron en anaerobiosis en Jarra GasPak con sistema generador de atmósfera anaerobia (Anaerocult A®, Merck, Alemania), durante 14 días a 28 °C (Fig. 3.1, a). Luego de la incubación se comprobó la aparición de halos de degradación en el papel *tissue*. Se consideró como halo de degradación a las zonas transparentes observadas en el papel con un diámetro mayor a 5 mm.

3.2.3. Verificación de la capacidad celulolítica en papel

Los halos de degradación obtenidos en las placas sembradas en el inciso anterior, fueron transferidos a tubos con 9 ml de caldo MCA (Anexo I) y una tira de papel *tissue*, de 1 x 3,5 cm, como fuente de carbono para comprobar la capacidad celulolítica. Los tubos se incubaron sin agitación y en anaerobiosis en Jarra GasPak (Anaerocult A®, Merck, Alemania), durante 30 días a 28 °C (Fig. 3.1, b). Los cultivos que degradaron totalmente el papel se inocularon (1 ml) nuevamente en tubos con 9 ml de MCA, repitiendo el modo de incubación (Fig. 3.1, c). Posteriormente, con el fin de enriquecer y seleccionar a los microorganismos con capacidad celulolítica, todos los cultivos degradadores se inocularon (5 ml) en tubos tapa a rosca de 50 ml (Falcon®, Corning Inc.) con 35 ml de caldo MCA y una tira de papel *tissue* de 1 x 7 cm (Fig. 3.1, e). En todas las incubaciones se colocó un tubo sin inocular a modo de control.

3.2 Materiales y métodos

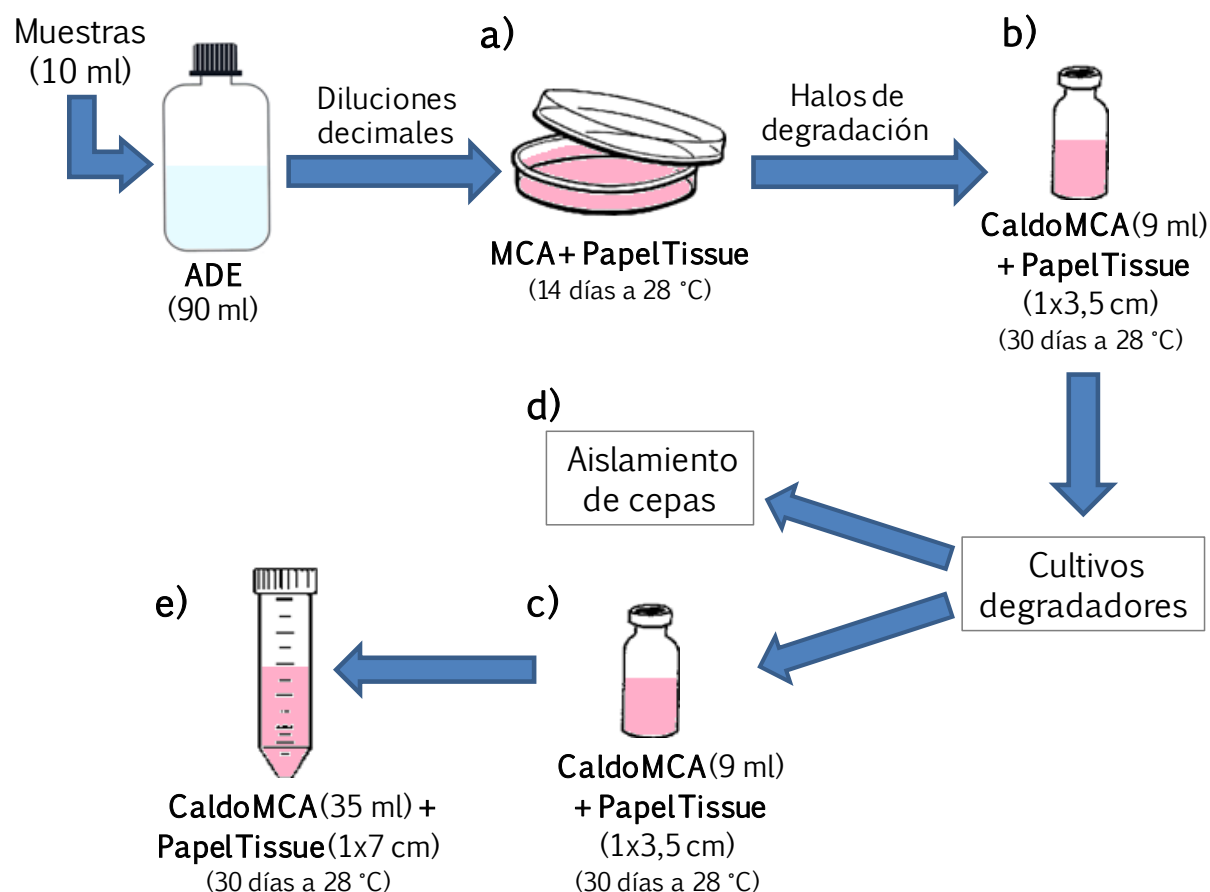


Figura 3.1 Esquema del procedimiento desarrollado para la obtención de cultivos degradadores de celulosa

3.2.4. Degradación de sustrato natural: catáfila de cebolla

Los cultivos que degradaron la tira de papel de 1 x 7 cm, se inocularon (5 ml) en tubos tapa a rosca de 50 ml (Falcon®, Corning Inc.) con 35 ml de caldo MCA, conteniendo 0,3 g de catáfila en reemplazo del papel *tissue*. Un tubo sin inocular se dejó como control. Se incubó en anaerobiosis del modo descrito en el inciso 3.2.3 durante 60 días a 28 °C.

3.2.5. Diferencia en el modo de degradación de la catáfila

En frascos para cultivo celular de 50 ml (Falcon®, Corning Inc.) (Fig. 3.2), se colocaron 35 ml de caldo MCA y 0,3 g de catáfila. Luego se inocularon 5 ml de los distintos cultivos degradadores y se dejó un frasco sin inocular a modo de control. Se incubó en estufa a 28 °C durante 60 días en condiciones aeróbicas

3.2 Materiales y métodos

estáticas. Periódicamente se tomaron imágenes para registrar la evolución de la degradación.



Figura 3.2 Vista del frasco de cultivo celular utilizado en el ensayo

3.2.6. Aislamiento de bacterias celulolíticas anaerobias esporuladas

Luego de la primera incubación en los tubos de 9 ml, descrita en el inciso 3.2.3, se procedió al aislamiento de las cepas integrantes de los distintos cultivos degradadores (Fig. 3.1, d). Para ello se tomó 1 ml de cada cultivo y se lo colocó en un tubo de ensayo vacío estéril. Los tubos se pasteurizaron en baño termostático a 80 °C durante 10 min. Luego se inocularon 200 µl de cada cultivo en placas de Petri con medio RCA (Anexo I) (Medio de cultivo ATCC N°2107). Se incubó durante 14 días a 28 °C en bolsas de anaerobiosis, con sistema generador de gas Anaerocult® C mini (Merck, Alemania) selladas con Anaeroclip® (Merck, Alemania). Posteriormente, de cada placa se aislaron colonias con morfologías diferentes. Los cultivos fueron subcultivados hasta obtenerlos puros. Los aislamientos obtenidos se conservaron en tubos con RCA a 4 °C.

3.2.7. Análisis filogenéticos de los aislamientos

La identificación taxonómica se realizó a partir de la amplificación del ADNr 16S con los cebadores universales 785f y 907r y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados (Macrogen Inc., Seúl, Corea). Las secuencias se editaron con el software Chromas Lite v.2.1.1 (Technelysium Pty Ltd, Australia, http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) y se ensamblaron empleando CAP3 (Huang y Madan 1999). Las secuencias casi completas (~1.450 pb) del gen

3.2 Materiales y métodos

16S rARN se identificaron mediante comparación con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST (N) (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Se utilizó el programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013) para alinear las secuencias consenso de las cepas con las de los organismos de mayor similitud de acuerdo a la secuencia del gen analizado. Para el alineamiento múltiple se utilizó la herramienta CLUSTALW y posteriormente se construyó un árbol filogenético con el método del vecino más cercano (*neighbor-joining method*). Para validar la topología del árbol filogenético se realizó el análisis *bootstrap* con 1000 réplicas.

3.3. Resultados

3.3.1. Detección de cultivos celulolíticos anaerobios

Se recolectaron quince muestras de distintas fuentes donde la cebolla se estaba degradando con la finalidad de enriquecer cultivos hidrolíticos nativos del sustrato en estudio. Se recuperaron los cultivos de treinta y nueve halos de hidrólisis de las cajas de Petri para los estudios subsiguientes.

En la mayoría de las placas que presentaron desarrollo se visualizaron halos y en ciertos casos, todo el papel presentó signos de degradación. De las muestras tomadas de cebollas en distinto estado de degradación, la mayor proporción (92 %) de cajas con desarrollo se detectó en MB1. En la muestra VL hubo desarrollo en el 42 % de las placas de Petri, mientras que en MB2 y VE solo hubo crecimiento en el 25 y 17 % de las cajas respectivamente. Todas las muestras tomadas de los biorreactores presentaron desarrollo en al menos una de sus cajas.

3.3.2. Verificación de la capacidad celulolítica en papel

Los sucesivos cultivos se realizaron para comprobar que los cultivos eran estables y que su capacidad hidrolítica no se veía disminuida en el tiempo. Luego de la primera incubación en medio líquido (Fig. 3.1, b), se recuperaron dieciséis cultivos capaces de degradar celulosa (Fig. 3.3). Visualmente se diferenciaron dos tipos de degradación del papel *tissue*: se definió como *degradación total* cuando

3.3 Resultados

no quedaban restos de papel y como *degradación parcial* cuando se observaban trozos de papel en el frasco. Trece cultivos presentaron degradación total y tres parcial. Siete de los cultivos pertenecían al tratamiento MB1, cuatro a MB2, uno a VL y cuatro a BU (18 °C). En la segunda incubación (Fig. 3.1, c), se recuperaron doce tubos con degradación total y uno con degradación parcial. En la tercera incubación (Fig. 3.1, e) sólo nueve cultivos fueron capaces de degradar completamente el papel.



Figura 3.3 Degradación del papel *tissue* por los cultivos. *De izquierda a derecha*, los tres primeros cultivos presentan degradación total del papel *tissue*, el último no fue capaz de degradarlo (la flecha azul indica el papel *tissue* sin degradar)

3.3.3. Aislamiento de bacterias celulolíticas anaerobias esporuladas

Se realizaron aislamientos a partir de los cultivos degradadores de celulosa (Fig. 3.3, d) para obtener las distintas bacterias hidrolíticas. Debido a que las bacterias anaeróbicas no se separaban fácilmente, fue necesario realizar varios aislamientos por estrías para lograr separarlas. Se diferenciaron hasta cuatro morfologías de colonias diferentes en cada cultivo mixto (posibles consorcios celulolíticos). Finalmente, se obtuvieron en total cuarenta y cuatro cepas.

3.3 Resultados

3.3.4. Análisis de la capacidad celulolítica en catáfila

Con la finalidad de evaluar la capacidad de los cultivos hidrolíticos para degradar la celulosa natural de la cebolla, se los cultivó en MCA con un trozo de catáfila en reemplazo del papel *tissue*. Los nueve cultivos capaces de utilizar el papel *tissue* como fuente de carbono (inciso 3.3.2) también lograron degradar la catáfila. Sin embargo se observó que presentaban diferentes maneras de degradación. Cuatro cultivos lograron degradarla completamente, mientras que el resto presentó una degradación parcial (Fig. 3.4). En estos últimos, se apreció visualmente que la catáfila estaba transparente o más clara que el fragmento original, pero aún conservaba su estructura (Fig. 3.5).

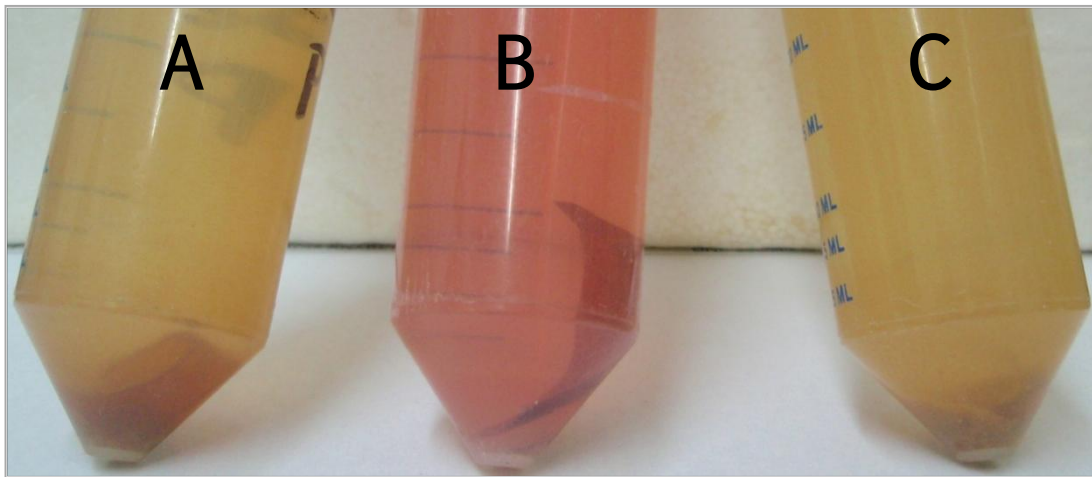


Figura 3.4 Degradación de la catáfila por los cultivos hidrolíticos luego de 60 días de incubación a 28 °C. **(A)** Cultivo con degradación parcial, **(B)** control y **(C)** cultivo con degradación total

3.3 Resultados



Figura 3.5 Cultivo con degradación parcial, se observa en la porción inferior de la catáfila, una zona más clara como consecuencia de la degradación

3.3.5. Diferencia en el modo de degradación de la catáfila

En el ensayo previo se observó que los cultivos presentaban diferentes modos de degradación de la catáfila, por lo tanto se decidió inocularlos en frascos para cultivo celular con la finalidad de lograr una mejor apreciación de la degradación.

Si bien la incubación se realizó en condiciones aeróbicas estáticas, al día siguiente de la inoculación se verificó la desaparición del color rosado del medio de cultivo debido a la reducción de la resazurina, evidenciando la anaerobiosis. A los 10 días de incubación se podía apreciar degradación de la catáfila en todos los cultivos (Fig. 3.6). Nuevamente se visualizaron diferentes formas de degradación las cuales se clasificaron en tres categorías:

- 1) *Degradación en capas*: se desprenden finas láminas transparentes de la catáfila (Fig. 3.7).
- 2) *Degradación con acumulación de cristales*: se forman acúmulos con apariencia cristaloides en la pared inferior del frasco (Fig. 3.8).

3.3 Resultados

3) *Degradación en nube*: se forma turbiedad de coloración marrón-rojiza en la proximidad de la catáfila. Estos acúmulos son mucho más pequeños y sin estructura cristaloides como los de la degradación en cristales (Fig. 3.9).



Figura 3.6 Desarrollo del cultivo hidrolítico en catáfila como única fuente de carbono. *Izquierda*: cultivo luego de la inoculación. *Derecha*: luego de 10 días de incubación a 28 °C la catáfila presenta degradación

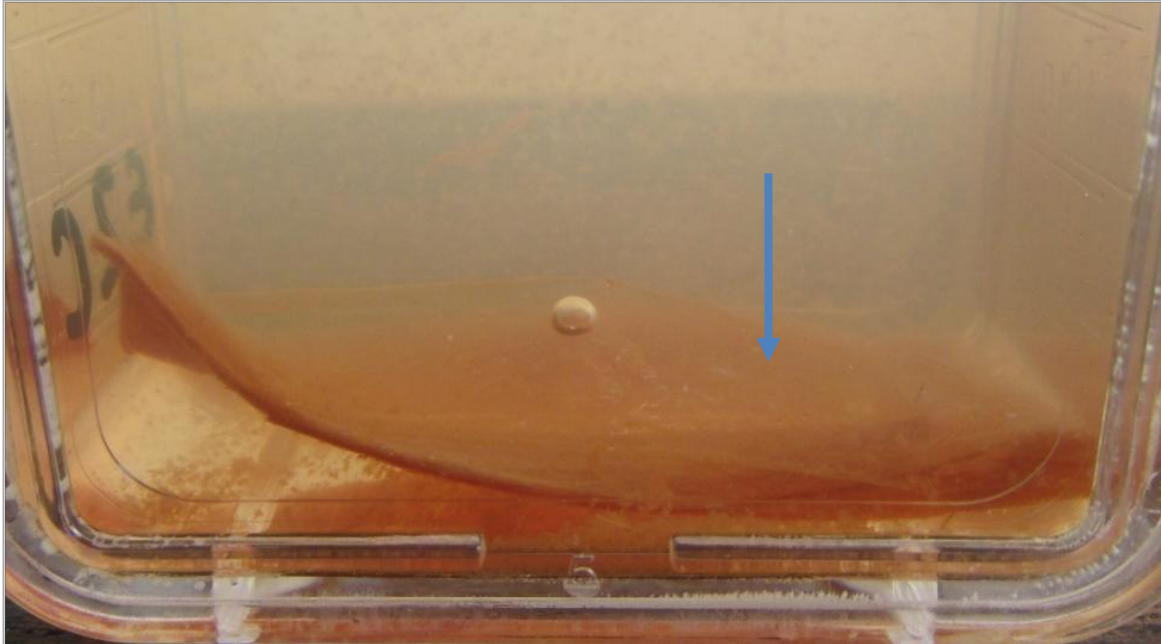


Figura 3.7 Cultivo con degradación de catáfila en capas. Se indica con una flecha la lámina transparente que se desprende de la catáfila

3.3 Resultados



Figura 3.8 Cultivo con degradación con acumulación de cristales. Se observa depósito de cristales en la pared inferior del frasco



Figura 3.9 Cultivo con degradación en nube. Como consecuencia de la degradación se forma una masa con coloración marrón-rojiza alrededor de la catáfila

Luego de 60 días de incubación, cuatro cultivos presentaron mayor degradación de la catáfila que el resto (Fig. 3.10). La turbiedad del medio indica el desarrollo de los microorganismos. Se puede apreciar la desintegración de los trozos originales de catáfila debido a la actividad hidrolítica de los cultivos.

3.3 Resultados

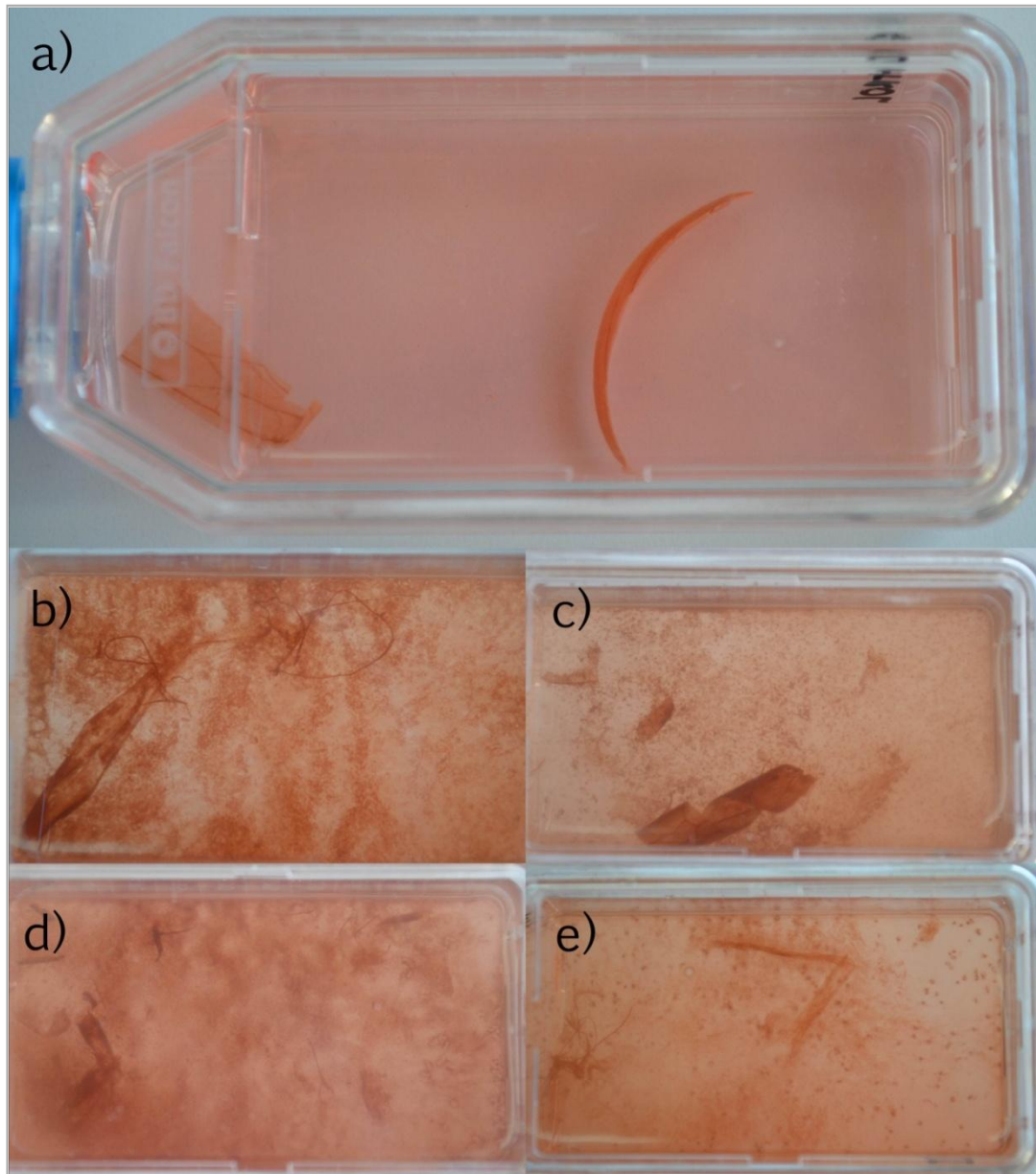


Figura 3.10 Degradación de la catáfila luego de 60 días de incubación a 28 °C. Se muestran los cultivos con mejor performance en la degradación, **a)** control, **b)** cultivo B, **c)** cultivo E, **d)** cultivo D y **e)** cultivo V

3.3.6. Identificación de las cepas integrantes de los cultivos degradadores

Se identificaron taxonómicamente ocho cepas pertenecientes a los cuatro cultivos más eficientes en la degradación anaeróbica de la catáfila (Tabla 3.1). Las secuencias de nucleótidos de las cepas MB2-A2, MB2-A6, VL-A8, MB2-A35, VL-A36, MB2-A37, MB2-A41 y BU-A43 figuran en GenBank con los números de acceso KT935664 a KT935671 respectivamente. Las secuencias del ADNr 16S obtenidas

3.3 Resultados

mostraron que las cepas MB2-A2 y MB2-A41 tenían un 99 % de semejanza con *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* cepa FZB42 (Nº Acceso NC 075005). Las cepas MB2-A6, MB2-A35, VL-A36 y BU-A43 tuvieron 99 % de similitud con *Desulfotomaculum guttoideum* cepa DSM 4024 (Nº Acceso NR 026409). La cepa VL-A8 exhibió un 99 % de similitud con la secuencia nucleotídica de *Clostridium celerecrescens* cepa 18A (Nº Acceso NR 026100). Finalmente, el organismo con mayor similitud (96 %) a MB2-A37 fue *Clostridium* sp. cepa Z6 (Nº Acceso AY949859).

Tabla 3.1 Composición de los cultivos con mejor capacidad de degradación de la catáfila en anaerobiosis

Cultivo	Procedencia	Cepas integrantes
B	VL	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i> cepa VL-A36, <i>Clostridium celerecrescens</i> cepa VL-A8
D	MB2	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i> cepa MB2-A6, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MB2-A2
E	MB2	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i> cepa MB2-A35, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MB2-A41, <i>Clostridium</i> sp. cepa MB2-A37
V	BU (18 °C)	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i> cepa BU-A43

La comparación entre las secuencias de las distintas cepas identificadas como *Desulfotomaculum guttoideum* muestra que son aislamientos diferentes debido a que difieren entre cuatro y once bases de la secuencia nucleotídica (Anexo II). En cambio MB2-A2 y MB2-A41, identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens*, serían un mismo clon ya que coinciden en todos sus pares de bases (Anexo II). Las cepas se distribuyeron dentro del phylum *Firmicutes* en tres familias diferentes: *Bacillaceae*, *Lachnospiraceae* y *Clostridiaceae* (Fig. 3.11).

3.3 Resultados

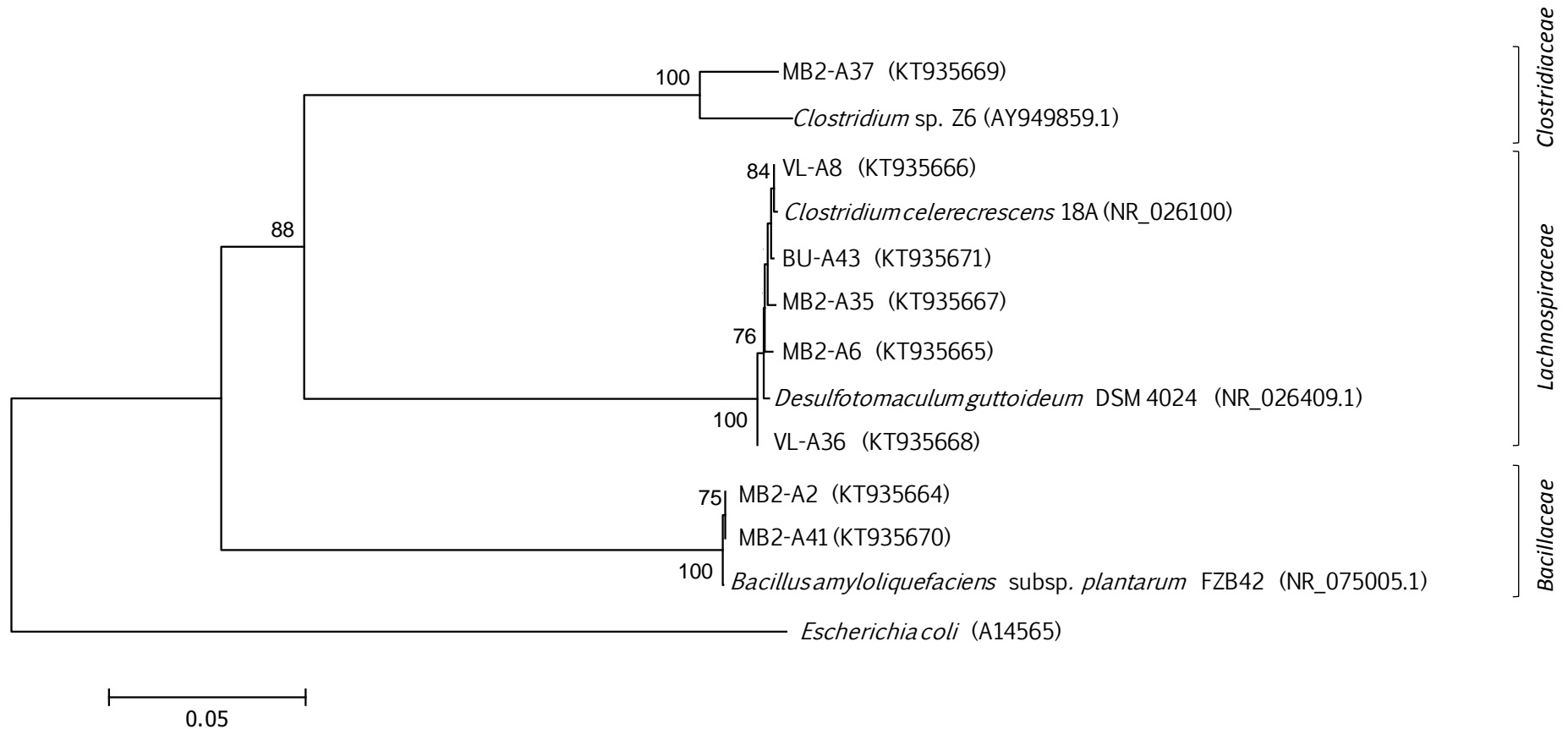


Figura 3.11 Árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias del 16S rDNA que muestra la relación entre las cepas aisladas y las bacterias con mayor similitud según el análisis BLAST. Se utilizó *Escherichia coli* como *outgroup*. Las secuencias de referencia fueron obtenidas de GenBank (N° Acceso entre paréntesis). El árbol se construyó utilizando el método del vecino más cercano (ligamiento simple) siguiendo el análisis de distancia de las secuencias alineadas. La escala representa 0,05 sustituciones por nucleótido. Los valores del análisis *bootstrap* mayores al 70 % se muestran en los nodos

3.4. Discusión

Los cultivos mixtos naturales fueron aislados de diferentes ambientes en donde el residuo de cebolla se estaba degradando. El método descrito para la detección de cultivos celulolíticos anaerobios permitió obtener inicialmente treinta y nueve halos de degradación para finalmente seleccionar nueve cultivos celulolíticos estables. El método propuesto es sencillo de realizar y permite reducir el número de cultivos a analizar. La estrategia empleada en este estudio es apropiada cuando el objetivo es obtener cultivos mixtos con óptima actividad hidrolítica.

Durante las sucesivas incubaciones en caldo MCA con papel *tissue* como única fuente de C, disminuyó en cada una de ellas la cantidad de cultivos degradadores, persistiendo solo los que tenían la habilidad de degradar totalmente el papel *tissue*. Se podría sugerir que se produjo un enriquecimiento de los cultivos degradadores más robustos o que poseen alta estabilidad en su función.

La composición y distribución de polisacáridos de la celulosa varía considerablemente y tiene implicancias significativas en la utilización y velocidad de hidrólisis de los sustratos (Lynd *et al.* 2002). Debido a ello se decidió evaluar los cultivos sobre la celulosa natural de la cebolla. Al reemplazar el papel *tissue* por catáfila como única fuente de C, todos los cultivos celulolíticos mantuvieron la capacidad hidrolítica. Este resultado era esperable debido a que los cultivos naturales estudiados fueron obtenidos a partir del mismo residuo que se deseaba degradar. El tiempo requerido para la degradación de la catáfila (60 días de cultivo) fue superior al del papel *tissue* (30 días de cultivo) probablemente debido a la presencia de hemicelulosa y lignina en el tejido de cebolla (Jaime *et al.* 2002). En la mayoría de los estudios realizados con cultivos mixtos, se utilizan distintas celulosas comerciales (Carver *et al.* 2012; Chen y Weimer 2001; Morvan *et al.* 1996) o sustratos celulósicos naturales que reciben algún tipo de pretratamiento antes de incorporarlos al medio de cultivo, lo que facilita su degradación (Fondevila y Dehority 1994; Fondevila y Dehority 1996; Miron y Ben-Ghedalia 1993; Ponce-Noyola y de la Torre 1993). En nuestro caso, la catáfila no recibió

3.4 Discusión

pretratamiento excepto una corta esterilización en autoclave, es decir que los cultivos degradaron la celulosa con la arquitectura natural de la misma.

En el ensayo realizado en los frascos de cultivo celular, además de modificar el recipiente de cultivo, no se emplearon sistemas generadores de anaerobiosis para la incubación. El cambio de color de la resazurina en el medio de cultivo indicó que las condiciones dentro del frasco cambiaron de aeróbicas a anaeróbicas en el término de un día debido a la actividad de los microorganismos. Esto sugiere que las bacterias que conforman los cultivos mixtos serían aerotolerantes y que existiría un sinergismo entre las especies anaerobias facultativas y anaerobias para la degradación del material. Este tipo de interacción ha sido reportada en cultivos mixtos creados artificialmente, donde las bacterias no-celulolíticas contribuyen con la degradación de la celulosa proporcionando un ambiente anaeróbico, consumiendo metabolitos que deterioran la actividad celulolítica y neutralizando el pH (Haruta *et al.* 2002; Kato *et al.* 2004; Miyazaki *et al.* 2008). En los ambientes anaeróbicos naturales en donde la celulosa es degradada, los microorganismos celulolíticos y no celulolíticos dependen unos de otros para el flujo de nutrientes, la remoción de metabolitos tóxicos, el equilibrio del pH y el establecimiento del potencial de óxido reducción adecuado (Fondevila y Dehority 1994; Lynd *et al.* 2002; Murray 1986).

Los frascos de cultivo celular permitieron la apreciación de diferentes formas de degradación logrando establecer tres categorías. Si bien la clasificación es subjetiva, los distintos tipos observados sugieren que existe biodiversidad en los tipos de enzimas hidrolíticas presentes. Es sabido que las celulasas tienen distinto modo de acción, por ejemplo, las endoglucanasas tienen la capacidad de cortar los enlaces glucosídicos β -1,4 en la parte interna de la cadena de celulosa y las exoglucanasas en la porción externa (Bayer *et al.* 1998). Los acúmulos observados en los frascos podrían corresponder a los componentes de la catáfila resistentes a la actividad hidrolítica de las bacterias, es decir lignina.

Cuatro cultivos se destacaron por lograr una mayor degradación de la catáfila. Si bien los microorganismos que conforman estos cultivos tuvieron una actividad más eficiente, no lograron degradar completamente la catáfila (Fig. 3.10).

3.4 Discusión

Entre las posibles causas, la degradación incompleta se puede deber a la acumulación de los productos de la hidrólisis en el medio de cultivo, lo que genera una inhibición en la actividad de las bacterias hidrolíticas provocando la interrupción del proceso hasta tanto esas sustancias sean removidas (Mitchell *et al.* 1995). Es de esperar que la degradación dentro del biorreactor sea más eficiente debido a la presencia de todos los microorganismos integrantes de la cadena trófica productora de biogás que consumirán los productos de la hidrólisis. Las comunidades microbianas degradadoras de celulosa estudiadas *in vitro* hasta el momento fueron construidas a partir de cepas que no formaban naturalmente el consorcio (Fondevila y Dehority 1996; Haruta *et al.* 2002). Por el contrario, en este estudio se obtuvieron cultivos celulolíticos naturales enriquecidos a partir de la misma fuente que se intenta degradar y que poseen la capacidad de degradar el residuo *in vitro*.

El análisis de las secuencias del gen 16S rRNA reveló que todas las cepas celulolíticas pertenecían al phylum *Firmicutes*, lo que era de esperarse dado la pasteurización realizada previo al aislamiento para favorecer la obtención de bacterias formadoras de esporas. Las cepas identificadas se relacionaron con microorganismos que han sido detectados en ambientes donde se lleva a cabo la degradación de celulosa y/o la producción de CH₄.

Las cepas MB2-A2 y MB2-A41 se afiliaron dentro de la clase *Bacilli*, orden *Bacillales*, familia *Bacillaceae* (Schleifer 2009). *Bacillus amyloliquefaciens* es una bacteria aeróbica, Gram positiva, mesófila, capaz de degradar celulosa con sus enzimas extracelulares (Priest *et al.* 1987). Se ha reportado que *B. amyloliquefaciens* tiene la capacidad de hidrolizar cáscara de arroz, un residuo compuesto por lignina, celulosa y hemicelulosa (Lee *et al.* 2008) y además tiene actividad quitinolítica (Sabry 1992). Particularmente la cepa FZB42, la más cercana filogenéticamente a MB2-A2 y MB2-A41, se distingue por su habilidad para estimular el desarrollo de las plantas y suprimir organismos patogénicos vegetales (Koumoutsi *et al.* 2004).

El resto de las cepas se agrupó dentro de la clase *Clostridia*, orden *Clostridiales*. Estas cepas se distribuyeron en dos familias, *Clostridiaceae* y

3.4 Discusión

Lachnospiraceae. Estas familias incluyen organismos anaeróbicos, sacarolíticos, capaces de degradar hidratos de carbono simples (ej. glucosa) y complejos (ej. celulosa). Los integrantes de estas familias típicamente son productores de ácido y generalmente fermentan la glucosa a acetato, butirato, CO₂ e H₂ (Schleifer 2009). *Clostridium* sp. Z6, el microorganismo filogenéticamente más cercano a la cepa MB2-A37, fue aislado de aguas residuales de una fábrica de papel (N° acceso AY949859). Por otra parte, la predominancia de bacterias similares (93 % de similitud) a *Clostridium* sp. Z6 fue reportada en reactores alimentados con residuos vegetales de cocina, en los que tendría un rol importante en la producción de H₂ (Chu *et al.* 2010; Lee *et al.* 2014; Lee *et al.* 2010). Otros autores detectaron que microorganismos altamente relacionados (≤ 95 %) con *Clostridium* sp. Z6 y *C. celerecrescens* estaban involucrados en la degradación de celulosa en una celda de combustible microbiana (Ishii *et al.* 2008). *Clostridium celerecrescens* fue aislado por primera vez a partir de un cultivo metanogénico inoculado con estiércol vacuno (Palop *et al.* 1989). También se lo encontró como una de las especies dominantes en un reactor alimentado con glucosa y peptona (Li *et al.* 2010). Al fermentar la celulosa produce etanol, H₂, CO₂ y los ácidos acético, fórmico, butírico y láctico entre otros. Además es capaz de hidrolizar ciertas proteínas como la gelatina. Su temperatura óptima de desarrollo es entre 30-37 °C (Chamkha *et al.* 2001; Ren *et al.* 2007).

Desulfotomaculum guttoideum es una bacteria mesófila, fermentativa, sacarolítica y tiene la capacidad de reducir sulfito y tiosulfato (Stackebrandt *et al.* 1997). Es una especie que ha sido estudiada solo en dos trabajos y que está mal clasificada taxonómicamente (Gogotova y Vainshtein 1983; Stackebrandt *et al.* 1997). En base a los niveles de similitud en la secuencia del 16S ADN, Stackebrandt *et al.* (1997) encontraron que *D. guttoideum* no está relacionada con las otras especies del género *Desulfotomaculum*, sino que se agrupa con un cluster de *Clostridium* conformado por las especies *C. sphenoides*, *C. celerecrescens*, *C. aerotolerans* y *C. xylanolyticum*. Recientemente se ha propuesto su reclasificación dentro de la familia *Lachnospiraceae* en el nuevo género *Lachnoclostridium* (Yutin y Galperin 2013).

3.4 Discusión

En los cuatro cultivos que presentaron una hidrólisis eficiente de la catáfila, compuestos entre uno y tres microorganismos, se detectó a *D. guttoideum* a pesar de que provenían de distintas muestras y localidades. Sin embargo las diferentes secuencias del 16S ADNr sugieren que estos aislamientos son cepas diferentes (Fig. 3.11). La presencia de *D. guttoideum* en los cuatro cultivos estaría indicando que este microorganismo es una especie clave en la degradación anaeróbica de cebolla. Las cepas aeróbicas identificadas en el capítulo II habían sido encontradas asociadas a la cebolla en trabajos anteriores. Por el contrario, para las cepas anaeróbicas identificadas en este estudio no se encontró bibliografía en la que hayan sido descritas previamente asociadas a la degradación anaeróbica de la catáfila de cebolla.

3.5. Conclusiones

El método de cultivo diseñado fue eficiente para la obtención de cultivos celulolíticos anaeróbicos capaces de degradar la catáfila.

Se logró comprobar que los cultivos naturales produjeron anaerobiosis en los frascos de cultivo, sin necesidad del uso de sistemas generadores de anaerobiosis.

Se identificaron cuatro especies bacterianas diferentes en los cultivos degradadores, particularmente, *D. guttoideum* es una especie clave en la degradación anaeróbica de la catáfila de cebolla.

El proceso biológico estudiado en este capítulo forma parte de la fase hidrolítica de los reactores que degradarán el descarte de cebolla. Las bacterias nativas del residuo son capaces de realizar la degradación de la catáfila, actuando en su mayoría, en consorcios degradadores.

PARTE II: Estudios experimentales de la capacidad degradativa del residuo de cebolla bajo las condiciones de biometanización

Capítulo IV

Factibilidad de la degradación anaeróbica del residuo de cebolla y optimización de la etapa hidrolítica-acetogénica

4.1. Introducción

Existen muy pocos ambientes en los que solo prospera una población de microorganismos o donde las poblaciones de microorganismos no se afectan entre sí, ya sea positiva o negativamente. Como se mencionó en el capítulo I, los biorreactores anaeróbicos son ecosistemas caracterizados por sus complejas cadenas alimentarias y por la estrecha relación simbiótica entre los diferentes eslabones de la cadena, en los que los organismos consumen los productos del eslabón precedente (Stams *et al.* 2003).

Muchas sustancias pueden inhibir la biometanización, y las arqueas metanogénicas (AM) suelen ser las más sensibles y las primeras en ser afectadas. Las sustancias inhibidoras pueden entrar en el proceso a través del sustrato o formarse durante la degradación de una sustancia inicialmente no inhibitoria (Schnürer y Jarvis 2010). En el digestor, los compuestos que inhiben la producción de CH₄ pueden ejercer su acción por inhibición directa de los microbios de la cadena de degradación anaerobia o mediante la estimulación de microorganismos

4.1 Introducción

presentes que competirán por los sustratos con las AM o con las bacterias responsables de los pasos precedentes. Esto conduce a la reducción de la producción de CH_4 y al aumento de la formación de compuestos desfavorables como el H_2S y compuestos nitrogenados (nitrito, óxido nitroso) (Stams *et al.* 2003). En cada biorreactor la concentración a la cual una sustancia causa inhibición es diferente en función del sustrato e inóculo utilizado, de las condiciones ambientales (temperatura, pH) y del tiempo de retención (Chen *et al.* 2008).

Idealmente, en el reactor anaeróbico los productos de la acetogénesis constituyen los sustratos para la metanogénesis. En ambientes anaeróbicos con un exceso de SO_4^{2-} , las bacterias sulfato reductoras (BSR) compiten con las bacterias fermentativas, las bacterias acetogénicas y las AM por los sustratos (H_2 y acetato) más importantes para la producción de CH_4 (Muyzer y Stams 2008; Westermann y Ahring 1987). Las BSR (por ejemplo, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* y *Desulfobulbus*) son anaerobias estrictas que utilizan SO_4^{2-} como aceptor terminal de electrones, oxidando hidrógeno molecular y compuestos orgánicos. En presencia de SO_4^{2-} , las BSR son más competitivas termodinámicamente que el resto de los microorganismos, por lo tanto consumen los sustratos comunes, produciendo H_2S que inhibe varios grupos microbianos y causa corrosión y mal olor (Dar *et al.* 2008; O'Flaherty *et al.* 2006). Cuando el SO_4^{2-} disponible es insuficiente para la oxidación completa de los compuestos orgánicos, las BSR competirán entre sí por este compuesto (Muyzer y Stams 2008). Información detallada sobre la fisiología de las BSR puede encontrarse en los trabajos de Barton y Fauque (2009), Muyzer y Stams (2008) y Rabus *et al.* (2013).

Las bacterias nitrato reductoras (BNR) (por ejemplo, *Denitrovibrio*, *Pseudomonas*) también compiten por el sustrato con las AM acetotróficas en presencia de sus aceptores de electrones (Insam *et al.* 2010). Sin embargo, gran parte de la disminución en la producción de CH_4 es causada por la toxicidad de los productos intermedios de la desnitrificación (nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso) y no por la competencia (Banihani *et al.* 2009; Clarens *et al.* 1998; Klüber y Conrad 1998; Percheron *et al.* 1999). Rodríguez-Martínez *et al.* (2005) encontraron que el proceso de desnitrificación inhibe la reducción de SO_4^{2-} en

4.1 Introducción

reactores con concentraciones altas de nitrato. Además se demostró que el nitrito inhibe parcialmente la actividad de las BSR (O'Reilly y Colleran 2005; Percheron *et al.* 1999). Sin embargo, las AM y BSR reanudan su actividad luego de que el nitrito es consumido (Banihani *et al.* 2009; O'Reilly y Colleran 2005).

La composición del sustrato de origen determina la proporción de los gases que conforman el biogás. Por lo tanto, el principal problema de la presencia de compuestos de azufre en la biomasa está relacionado con la producción de H₂S por las BSR (Asankulova 2008; Hirasawa *et al.* 2008). Cuando se desea emplear sustratos no-tradicionales en la DA y con características desventajosas como la del residuo de cebolla (con pH 4, compuestos azufrados y actividad antibacteriana), es importante realizar experimentos a escala de laboratorio con el fin de predecir el potencial y/o las limitaciones que tendrán para ser degradados anaeróbicamente. En los capítulos anteriores se detectó que el residuo de cebolla tiene microorganismos nativos con la capacidad de degradarlo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La biodegradación anaeróbica procede eficientemente si todos los grupos involucrados están presentes y balanceados y se dan las condiciones apropiadas de pH y temperatura. Para maximizar los beneficios medioambientales de la biometanización es esencial optimizar la eficiencia de la degradación del sustrato.

Ante la falta de conocimiento sobre la utilización del residuo de cebolla como sustrato para la biometanización, se realizaron una serie de estudios para evaluar su aptitud para la DA. Los objetivos de este capítulo fueron: 1) evaluar la factibilidad de la degradación anaeróbica de la cebolla, 2) estudiar la dinámica de las bacterias sulfato y nitrato reductoras durante la degradación anaeróbica y 3) analizar la influencia de la temperatura, del aporte de urea y de inóculo con comunidades microbianas activas, como estrategia de optimización.

4.2. Materiales y métodos

El estudio consistió básicamente en dos partes. En primer lugar, se estudió la aptitud del residuo de cebolla para la DA y el comportamiento de las BSR y BNR durante la degradación. En segundo lugar, se realizaron experimentos para evaluar variables (inóculo y temperatura) con la finalidad de detectar las condiciones más adecuadas para la biodegradación anaeróbica del residuo de cebolla.

4.2.1. Dinámica de las BSR y BNR en la biodegradación anaeróbica del residuo de cebolla

En biorreactores de 6 l se prepararon cuatro tratamientos por duplicado (Tabla 4.1), siendo el volumen de trabajo del reactor 4 l. Se utilizó cebolla de descarte, la cual se cortó en cuartos antes ser incorporada. Se usó cama de vaca (mezcla de estiércol vacuno y paja) como tratamiento control. Los reactores se mantuvieron a 20 °C durante todo el ensayo. Se hicieron muestreos mensuales durante seis meses, en los cuales las muestras se tomaron luego de la agitación del biorreactor. Se midió el pH (pH-Indikatorpapier Neutralit®, Merck, Alemania) y se cuantificaron las BSR y BNR. Finalmente, se tomaron muestras para análisis moleculares las cuales se conservaron a -20 °C hasta la extracción de ácidos nucleicos.

Tabla 4.1 Composición (% del volumen de trabajo del reactor) de los tratamientos evaluados en el ensayo

Tratamiento	Cebolla (%)	Catáfilas externas (%)	Cama de vaca (%)	Urea	Agua (%)
BC	50	-	-	-	50
BCC	25	25	-	-	50
BU	50	-	-	si ^a	50
BCV	-	-	50	-	50

^a 10 % del peso de cebolla

4.2 Materiales y métodos

Se estableció un método para estimar las BSR para el cual se modificó el medio Postgate B (Hines *et al.* 2007) reemplazando el sodio lactato por sodio acetato (Anexo I). La modificación se debió a que el acetato es el ácido más importante para la producción de CH₄ por las AM y las BSR también lo utilizan como sustrato. El caldo se distribuyó en microplacas (100 µl pozo⁻¹) para realizar la técnica de número más probable (NMP, n=8) propuesta por Rowe *et al.* (1977). Del mismo modo, se utilizó caldo nitrato (Staley y Griffin 1981) (Anexo I) como medio de cultivo para enumerar las BNR.

Por cada muestra se inocularon (100 µl pozo⁻¹) doce diluciones. Las microplacas se colocaron en bolsas para anaerobiosis (Anaerocult A mini®, Merck, Alemania) con sistema generador de gas Anaerocult® C mini (Merck, Alemania), se sellaron con Anaeroclip® (Merck, Alemania) y se incubaron durante trece días a 28 °C. La detección de BNR se llevó a cabo utilizando el reactivo de nitrito de Griess-Ilosvay (Merck, Alemania) y la presencia de BSR se detectó por la aparición de un precipitado negro (FeS). El número de BSR y BNR se expresó como log₁₀ NMP.

4.2.2. Estudio de variables para la optimización de la biodegradación anaeróbica de cebolla

4.2.2.1. Aporte de inóculo bacteriano en condiciones mesofílicas

Se planteó un ensayo con muestreo destructivo, totalizando seis muestreos espaciados entre sí por 15 días. Se realizaron tres tratamientos con doce repeticiones cada uno (Tabla 4.2). En este ensayo se utilizaron mini-reactores que consistían en un pote plástico de 1 kg con tapa a rosca. Se empleó cebolla apta para el consumo (sin daños físicos y en buen estado sanitario). La misma fue cortada con chipeadora en trozos de aproximadamente 1 x 3 cm. Se seleccionaron como inóculo los efluentes de los tratamientos BC y BU del ensayo anterior.

4.2 Materiales y métodos

Tabla 4.2 Composición (% del volumen de trabajo del reactor) de los tratamientos

Tratamiento	Cebolla (%)	Inóculo BC (%)	Inóculo BU (%)	Urea	Agua (%)
MR-C	50	-	-	-	50
MR-I	50	5	-	-	45
MR-IU	50	-	5	si ^a	45

^a 10 % del peso de cebolla

Se elevó a 7 el pH de los mini-reactores utilizando NaOH y KOH (Gerardi 2003). Los pots se sellaron con papel film y se incubaron en estufa a 35 °C. La anaerobiosis se comprobó mediante cambio de color en el indicador (Microbiologie Anaerotest®, Merck, Alemania) colocado previamente en el interior de los mini-reactores. En cada muestreo se retiraron dos réplicas de cada tratamiento en las que se midió el pH y se realizó la técnica de NMP en microplaca para cuantificar las BSR como se describió en el inciso 4.2.1. Se tomaron muestras para análisis moleculares las cuales se conservaron a -20 °C hasta la extracción de ácidos nucleicos.

4.2.2.2. Evaluación de la degradación anaeróbica de cebolla a baja temperatura

En los mini-reactores descritos anteriormente, se prepararon dos tratamientos por sextuplicado (Tabla 4.3). Nuevamente, se empleó cebolla triturada con chipeadora. El inóculo provino del efluente del tratamiento MR-IU del ensayo anterior (el único que presentó completa degradación del residuo). Tres réplicas de cada tratamiento fueron incubadas a 18 °C y tres a 35 °C durante 60 días (Fig. 4.1).

4.2 Materiales y métodos

Tabla 4.3 Composición (% del volumen de trabajo del reactor) de los tratamientos

Tratamiento	Cebolla (%)	Inóculo (%)	Urea ^a	Agua (%)
A	50	5	si	45
B	50	-	si	50

^a 10 % del peso de cebolla

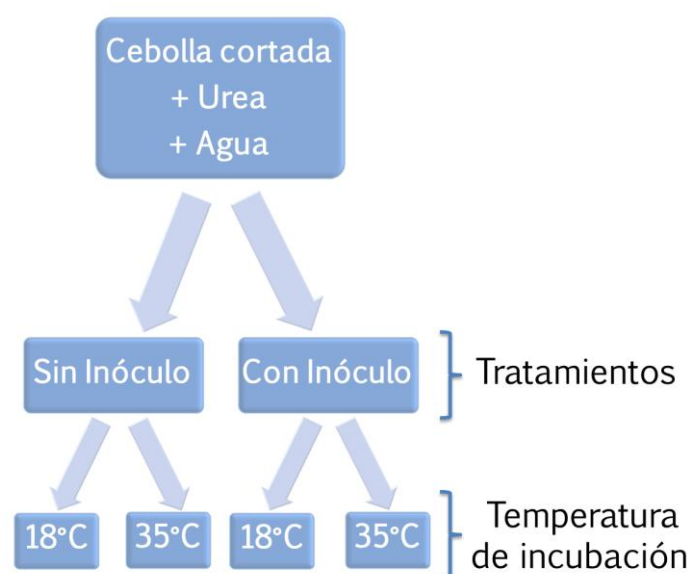


Figura 4.1 Diseño experimental

De cada mini-reactor se tomó una muestra inicial y final en las que se cuantificaron los sólidos totales (ST) y volátiles (SV) de acuerdo al método estándar (APHA 1992) (Anexo III) y se midió el pH (pH-Indikatorpapier Neutralit®, Merck, Alemania). A su vez se tomaron muestras destinadas a análisis moleculares que se mantuvieron a -20 °C hasta la extracción de ácidos nucleicos.

4.2.3. Análisis estadístico

Los recuentos de BSR y BNR fueron sometidos a un análisis de varianza de un factor (ANOVA), considerando al tratamiento como la variable independiente. Los valores medios de los tratamientos se compararon mediante la diferencia mínima

4.2 Materiales y métodos

significativa de Fisher, considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$ durante todo el estudio.

4.2.4. Análisis moleculares

4.2.4.1. Amplificación por PCR de los genes de función

Se realizó la extracción del ADN de la comunidad total con el kit comercial Fecal DNA (MoBio Laboratories, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron cebadores específicos (Tabla 4.4) para la amplificación selectiva de los genes: *dsrAB* que codifica para la subunidad α y β de la sulfito reductasa desasimilatoria (reducción de sulfato); *narG* que codifica para la enzima nitrato reductasa (reducción de nitrato); FTHFS que codifica para la enzima 10-formiltetrahidrofolato sintetasa (acetogénesis) y *mcrA* que codifica para la subunidad α de la metil-coenzima M reductasa (metanogénesis).

La mezcla de reacción para la PCR (23 μ l) contenía 0,125 μ l de ADN polimerasa (Inbio-Highway, Argentina); 2,5 μ l de buffer 10 X (Inbio-Highway, Argentina); 2 μ l de $MgCl_2$ (25 mM; Inbio-Highway, Argentina); 2,5 μ l albúmina de suero bovino (0,1 μ g/ μ l), 2,5 μ l de solución de dNTP (2 mM; Inbio-Highway, Argentina), 0,625 μ l de cada uno de los cebadores (10 μ M; Invitrogen, EEUU) y 12,125 μ l de agua libre de nucleasas. Luego, se agregó una alícuota de 2 μ l de ADN bacteriano, obteniendo un volumen final de 25 μ l. Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador térmico Life Express Modelo TC-96/G/H(b) (Bioer Technology Co. Ltd., Tokio, Japón). Para los genes *dsrAB* y *narG* se debieron ajustar las condiciones de PCR para lograr la amplificación deseada y para la amplificación de los genes *mcrA* y FTHFS se utilizaron los protocolos descritos por Juottonen *et al.* (2006) y Xu *et al.* (2009) respectivamente (Tabla 4.5). Una alícuota de 6 μ l del producto de reacción se sembró en un gel de agarosa D1 LE (Laboratorios CONDA, Madrid, España) al 2 % en tampón TAE y se separaron por electroforesis (60 V, 60 min). En las calles laterales del gel se sembró el marcador molecular DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche, Mannheim, Alemania) o FastRuler™ High Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EEUU)

4.2 Materiales y métodos

Tabla 4.4 Secuencias de los cebadores empleados en el método PCR para la amplificación de genes de función

Gen	Cebadores	Secuencia ^a	Longitud del amplicon	Referencia
<i>dsrAB</i>	DSR1 f	5' ACSCACTGGAAGCACG 3'	~1,9 kb	Wagner <i>et al.</i> 1998
	DSR4 r	5' GTGTAGCAGTTACCGCA 3'		
<i>narG</i>	1960 f	5' TAYGTSGGSCARGARAA 3'	650 pb	Philippot <i>et al.</i> 2002
	2650 r	5' TTYTCRTACCABGTBGC 3'		
FTHFS	fhs f	5' GTWTGGGCWAARGGYGGMGAAGG 3'	250 pb	Xu <i>et al.</i> 2009
	fhs r	5' GTATTGDGTYTTRGCCATACA 3'		
<i>mcrA</i>	ML f	5' GGTGGTGTMGATTACACARTAYGCWACAGC 3'	~470 pb	Juottonen <i>et al.</i> 2006
	ML r	5' TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT 3'		

^a Bases degeneradas: Y= C/T, W= A/T, M= A/C, R= A/G, S= G/C, D= A/G/T, B= C/G/T

4.2 Materiales y métodos

Tabla 4.5 Condiciones de PCR para la amplificación de los genes *dsrAB*, *narG*, FTHFS y *mcrA*

Gen	Desnaturalización inicial	N° ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Polimerización	Polimerización final
<i>dsrAB</i>	5 min a 94 °C	12	15 seg a 94 °C	1 min a 65°C (-1°C por ciclo)	2 min a 72 °C	10 min a 72 °C
		35	15 seg a 94 °C	1 min a 54°C	2 min a 72 °C	
<i>narG</i>	5 min a 95 °C	10	45 seg a 94 °C	1 min a 64 °C (-1 °C por ciclo)	2 min a 72 °C	10 min a 72 °C
		30	45 seg a 94 °C	1 min a 55 °C	2 min a 72 °C	
FTHFS	4 min a 94 °C	9	45 seg a 94 °C	45 seg a 63 °C (-1°C por ciclo)	1 min a 72 °C	5 min a 72 °C
		30	45 seg a 94 °C	45 seg a 55 °C	1 min a 72 °C	
<i>mcrA</i>	5 min a 95 °C	40	45 seg a 95 °C	45 seg a 55 °C	1:30 min a 72°C	10 min a 72 °C

4.2 Materiales y métodos

según correspondiera. El gel se tiñó con GelRed (Biotium, Hayward, CA, EEUU) y se fotografió en un transiluminador UV TFX 20-M (Life Technologies Corp., Rockville, MD, EEUU). La imagen se analizó con el software Kodak Digital Science Image Analysis, versión 3.0 (Eastman Kodak Company, NY, EEUU).

4.2.4.2. DGGE de *Eubacteria*

Para el análisis de la comunidad de *Eubacteria* se realizó PCR-DGGE con los cebadores 984F-GC/1378R que amplifican un fragmento de la región V6 - V8 del 16S ARNr (Heuer *et al.* 1997). El cebador 984F está unido en el extremo 5´ a una secuencia de 40 pares de bases de guanina-citosina (Tabla 4.6) para evitar que las cadenas de ADN de los fragmentos amplificadas por PCR se separen por completo (Muyzer *et al.* 1993).

Cada muestra de ADN se amplificó por duplicado en dos reacciones independientes de PCR. La mezcla de reacción para la PCR (23 µl) contenía 0,125 µl de ADN polimerasa GoTaq; 5 µl de buffer Green GoTaq 5 X (Promega, Madison, WI, EEUU); 1,25 µl de DMSO; 2,5 µl de solución de dNTP (2 mM; Inbio-Highway, Argentina); 0,75 µl de cada uno de los cebadores (10 µM; Invitrogen, EEUU) y 12,625 µl de agua libre de nucleasas. Luego, se agregó una alícuota de 2 µl de ADN bacteriano, obteniendo un volumen final de 25 µl. Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador térmico Life Express Modelo TC-96/G/H(b) (Bioer Technology Co. Ltd., Tokio, Japón) con las condiciones descritas en la Tabla 4.6. Alícuotas de los productos de reacción se sembraron en un gel de agarosa D1 LE (Laboratorios CONDA, Madrid, España) al 2 % en tampón TAE y se separaron por electroforesis (70 V, 30 min) para verificar el tamaño de los fragmentos amplificadas.

4.2 Materiales y métodos

Tabla 4.6 Cebadores y condiciones de PCR para la amplificación de la región V6 - V8 del 16S ARNr

Cebadores ^a	Secuencia	Ciclos PCR ^b
984F-GC	5' gc-AAC GCG AAG AAC CTT AC 3'	1 ciclo: 3 min a 95 °C (D) 8 ciclos: 1 min a 95 °C (D), 45 s a 62 °C (H) (-1 °C por ciclo) y 1 min a 72 °C (P)
1378R	5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3'	34 ciclos: 1 min a 95 °C (D), 45 s a 55 °C (H) y 1 min a 72 °C (P)
GC-clamp	5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G 3'	1 ciclo: 15 min a 72 °C (P)

^a F= cebador directo, R= cebador inverso, GC-clamp= secuencia rica en G+C unida al extremo 5'

^b D= desnaturalización, H= hibridación, P= polimerización

La DGGE se realizó en un sistema Scie-Plas modelo TV400-DGGE (SciePlas, Cambridge, Reino Unido). Los amplicones de la PCR se cargaron (40 µl calle⁻¹) en gel de poliacrilamida al 8 % (p/v) (mezcla 37:1 de acrilamida-N, N'-metilenbisacrilamida en tampón TAE 1x), con un gradiente lineal de agente desnaturante de 45-70 % (donde 100 % = urea 7 M y 40 % de formamida deionizada) (Green *et al.* 2010). Para la normalización de los geles se utilizó como marcador el amplicón generado por PCR-DGGE con el ADN de *Pseudomonas mendocina* y de *Clostridium acetobutylicum*. Finalizada la carga del gel con las muestras y patrones, se realizó la electroforesis durante 6 h a 200 V en tampón TAE 1x (pH 7,4) a 60 °C. El gel de DGGE se tiñó con Gel Red (Biotium Inc., Hayward CA) durante 40 min. Posteriormente se visualizó en transiluminador de luz UV, se fotografió y se digitalizó utilizando el programa Kodak Digital Science Image Analysis v.3.0 (Eastman Kodak Company, New York, EEUU). El análisis del patrón de bandas normalizadas del gel se realizó con el programa GelCompar II (AppliedMaths, Kortrijk, Bélgica). Se utilizaron las curvas densitométricas para calcular la correlación de Pearson como el coeficiente de similitud y se aplicó el

4.2 Materiales y métodos

método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA) para construir el dendrograma.

4.2.5. Efecto de la sanidad del residuo sobre la presencia de BSR

Se analizaron muestras de cebollas sanas y de cebollas afectadas con bacteriosis (Fig. 4.2). En condiciones de esterilidad, se retiraron las catáfilas protectoras (marrones) y la primera capa de catáfila interna (blancas). Se tomó una muestra (2 g) de la parte interna de cada cebolla y se la colocó en un frasco con 18 ml de ADE. Los frascos se agitaron a 200 rev/min durante 30 min. Se realizaron diluciones decimales y se determinó el NMP de BSR en cebolla sana y cebolla con bacteriosis de la misma forma a la explicada en la sección 4.2.1.

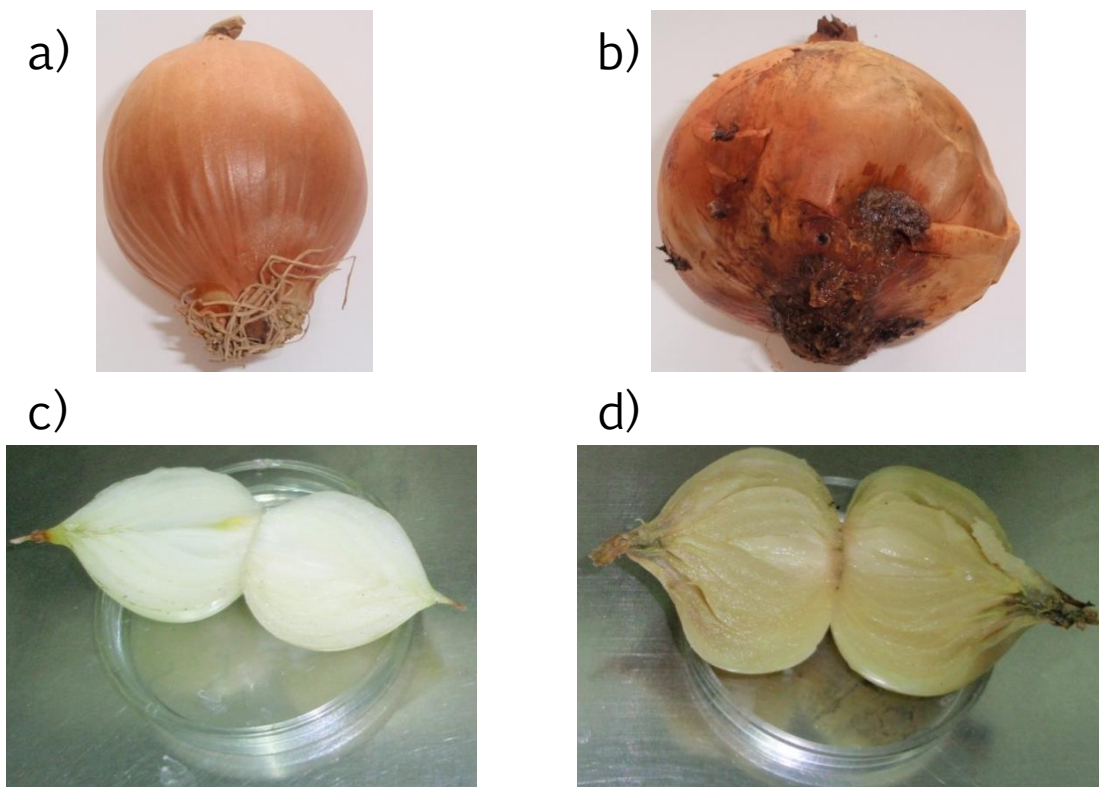


Figura 4.2 Se analizaron cebollas en dos estados sanitarios diferentes. **a)** Vista externa de cebolla sana, **b)** vista externa de cebolla con bacteriosis, **c)** vista interna de cebolla sana y **d)** vista interna de cebolla con bacteriosis

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Dinámica de las BSR y BNR

Los tratamientos BC y BCC mantuvieron un valor de $\text{pH} = 4$ durante todo el ensayo, mientras que BU y BCV presentaron $\text{pH} = 7$ a lo largo de la experiencia. Luego de seis meses de ensayo, se observó total licuefacción del residuo sólo en BU (Fig. 4.3). En los tratamientos restantes se produjo una degradación parcial de la cebolla.

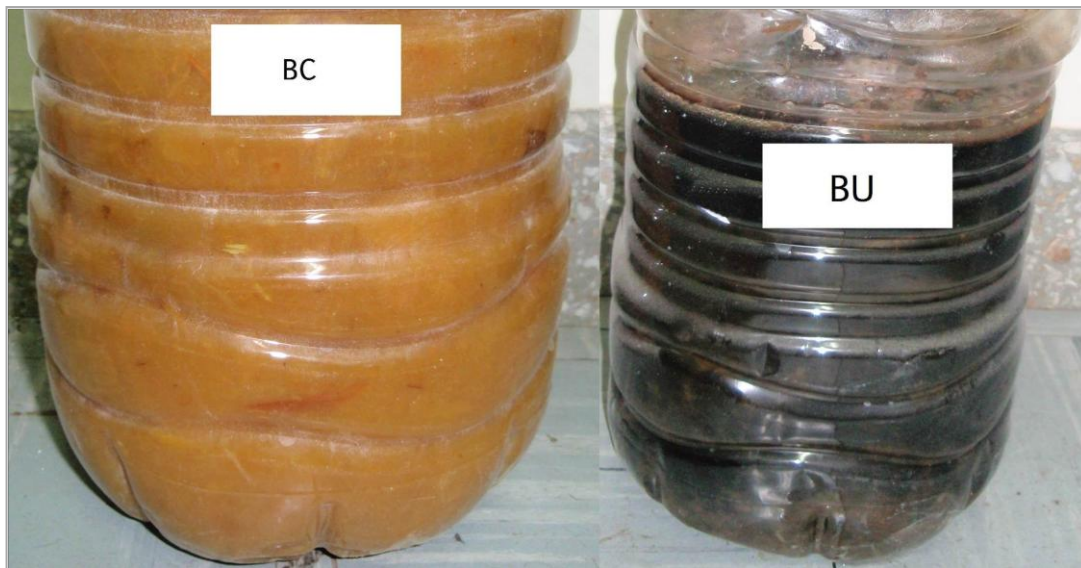


Figura 4.3 Tratamientos BC y BU al final del ensayo

En todos los tratamientos el número de BNR fue siempre superior al de las BSR (Tabla 4.7). En BCV se observó la mayor diferencia entre estos grupos funcionales, el número de BNR superó en al menos tres órdenes de magnitud a las BSR en todos los muestreos. Inicialmente, el número de BNR fue alto y luego los recuentos disminuyeron hasta valores encontrados en otros reactores anaeróbicos (Akunna *et al.* 1992). Esto coincide con lo descrito en la bibliografía, en la que se menciona que en primer lugar se inicia el proceso de desnitrificación consumiendo el nitrato y luego comienzan los sucesivos procesos hasta la producción de metano (Hendriksen y Ahring 1996).

4.3 Resultados y discusión

En el tratamiento BU, el desarrollo de las BSR fue estadísticamente diferente ($p < 0,001$) al de los otros tratamientos ya que su número fue siempre superior (3 a 5 unidades Log_{10} NMP) al registrado en el resto de las mezclas. Además, estas bacterias estuvieron presentes en todos los muestreos en BU, mientras que en los restantes tratamientos no se las detectó a partir del tercer muestreo. Es probable que en BC y BCC el pH haya afectado a las BSR, ya que se sabe que estas bacterias son inhibidas en valores de pH inferiores a 6 (Mizuno *et al.* 1998). Comparando el tratamiento BU con el BCV, ya que ambos mantuvieron $\text{pH} = 7$, se observa que el número de BSR fue menor en BCV y no se las detectó pasado el tercer muestreo. Esto estaría indicando que el residuo de cebolla es más propicio para el desarrollo de las BSR que el estiércol. A pesar de esto, el número de BSR no fue mayor al encontrado en digestores anaeróbicos inoculados con lodos residuales (Li *et al.* 1996; Mizuno *et al.* 1998) o suero de leche (Chartrain y Zeikus 1986) que funcionaban de manera estable. Por lo tanto, a pesar del contenido de compuestos azufrados del residuo de cebolla, se podría asumir que la población de BSR en los digestores anaeróbicos no interferirá negativamente en la biometanización.

Tabla 4.7 Recuento de BSR y BNR en los distintos tratamientos, expresado en Log_{10} NMP. Los valores corresponden a la media de las repeticiones

N° Muestreo	BC		BCC		BU		BCV	
	BSR	BNR	BSR	BNR	BSR	BNR	BSR	BNR
1	4,2	9,6	4	7	7,7	12,2	2,7	9,6
2	2,5	3,9	1,9	7	5,3	8,4	3,1	9,3
3	0	3,4	0	2,4	4,8	8,1	2,9	6,7
4	0	3,1	0	2	5,7	9	0	6,2
5	0	5,8	0	3,9	4,6	6,2	0	6,5
6	0	4,5	0	3,1	3,7	6,4	0	6,6

4.3 Resultados y discusión

El tratamiento BU presentó características que lo diferenciaron de los otros dos tratamientos que contenían residuo de cebolla. En primer lugar, las BSR se detectaron durante todo el ensayo mientras que en los otros tratamientos no se detectaron a partir de los tres meses. En segundo lugar, el residuo se degradó totalmente (licuefacción en seis meses) y finalmente, el pH se mantuvo en 7 a lo largo del ensayo. En función de la composición de los tratamientos, se puede asumir que la adición de urea produjo efectos positivos sobre la biodegradación anaeróbica de cebolla.

4.3.2. Métodos de optimización de la biodegradación anaeróbica de cebolla

Con el fin de lograr optimizar la biodegradación anaeróbica de la cebolla, se analizó la influencia de la temperatura y del aporte de inóculo, proveniente de los biorreactores del ensayo anterior, para incorporar comunidades microbianas degradadoras activas.

4.3.2.1. Aporte de inóculo bacteriano en condiciones mesofílicas

En base a la información obtenida en el ensayo previo, se decidió aumentar la temperatura de incubación a 35 °C e incorporar el sustrato en fragmentos más pequeños (Fig. 4.4). Además, los reactores se enriquecieron con el efluente de los biorreactores BC y BU del ensayo anterior, como fuente de comunidades microbianas activas en la degradación de cebolla.



Figura 4.4 Tratamientos al inicio del ensayo. *De izquierda a derecha, MR-C, MR-I y MR-IU*

4.3 Resultados y discusión

Al día siguiente del inicio del ensayo se comprobó la anaerobiosis en el interior de los mini-reactores por el cambio de color en el indicador. Las BSR estuvieron por debajo del nivel de detección a lo largo del ensayo en todos los tratamientos. A pesar de que inicialmente el pH fue ajustado en 7, osciló entre 4 y 5 en todos los tratamientos durante la experiencia. Como se mencionó anteriormente, probablemente estos niveles de pH contribuyeron para inhibir el desarrollo de las BSR. Valores bajos de pH suelen darse en los reactores si las velocidades de la hidrólisis y la acidogénesis exceden sustancialmente a la de la metanogénesis, en consecuencia la DA se bloquea en una fase ácida (Lü *et al.* 2012). Como resultado, difícilmente las AM inicien su actividad en estas condiciones lo que conduce a una mayor acumulación de los productos de la fermentación.

Para comenzar una DA rápida y confiable en un nuevo biorreactor, se recomienda inocular con el efluente de un reactor que esté operando con un sustrato similar o igual al que se quiere degradar en el nuevo reactor (Schnürer y Jarvis 2010). A los 60 días del inicio del estudio, en el tratamiento MR-IU se observó la casi completa licuefacción de los residuos (Fig. 4.5). Esto estaría indicando que las modificaciones realizadas en este ensayo, es decir, el aumento de la temperatura de incubación, el menor tamaño del sustrato y la incorporación de inóculo, lograron que la degradación anaeróbica de la cebolla se acelerara en aproximadamente 120 días con respecto al ensayo anterior.

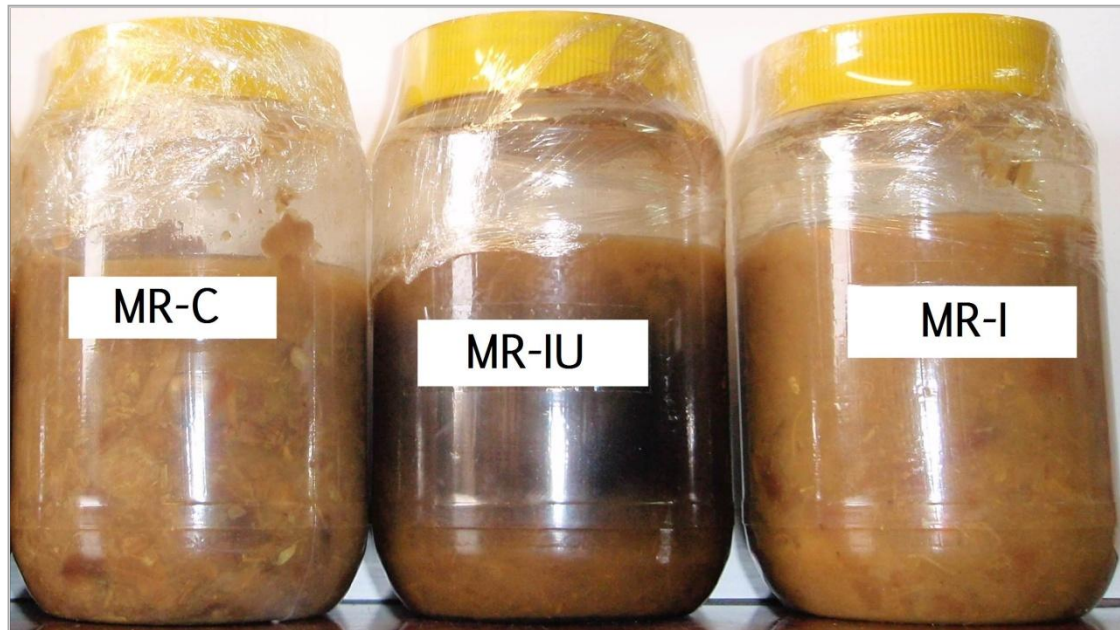


Figura 4.5 Tratamientos MR-C, MR-I y MR-IU a los 42 días del ensayo. Se aprecia la licuefacción solo en el tratamiento MR-IU

4.3.2.2. Degradación anaeróbica de cebolla a baja temperatura

El interés de evaluar la biodegradación en condiciones de bajas temperaturas se debe a que se prevé instalar biorreactores a campo, sometidos a las condiciones ambientales de la región. En la terminología de procesos se considera que un biorreactor está en condiciones psicrófilas a una temperatura entre 5 y 20 °C (Gerardi 2003). Por lo tanto, se planteó un experimento con el objetivo de detectar diferencias en los tiempos de degradación entre las comunidades microbianas de dos tratamientos a 18 y 35 °C.

Las poblaciones microbianas responden diferencialmente a la temperatura de digestión, lo que tiene efectos importantes en los biorreactores, ya que afecta el resultado de la competencia por los sustratos (Levén *et al.* 2007; Pender *et al.* 2004; Sekiguchi *et al.* 1998). En la incubación a 35 °C, el tratamiento A fue el que presentó la mayor reducción de ST y SV, en contraposición con el tratamiento B que sólo tuvo una reducción del 10 % de ST y 3,5 % de SV (Tabla 4.8). Esta degradación se produjo en un período de 60 días. En la incubación a 18 °C no hubo gran diferencia en la reducción de ST y SV entre los tratamientos (Tabla 4.8).

4.3 Resultados y discusión

En base a lo observado en nuestro ensayo se puede inferir que en condiciones mesofílicas, la incorporación de urea y el enriquecimiento del reactor con un inóculo aclimatizado al sustrato, favorece la degradación del residuo de cebolla.

Tabla 4.8 Porcentaje de reducción de sólidos totales (ST) y volátiles (SV) y pH de cada tratamiento

Tratamiento	% reducción ST	% reducción SV	pH	Temperatura
A	50	22	7	35 °C
B	10	3,5	6	
A	10	4,9	7	18 °C
B	9,5	4	6	

4.3.3. Resultados de los análisis moleculares

Se seleccionaron los tratamientos que fueron utilizados como inóculo y en el que se logró mayor degradación de la cebolla al final del tercer ensayo (tratamientos BC, BU, MR-IU y A-35 °C). En la Tabla 4.9 se muestran los resultados de la amplificación mediante PCR de los genes de función. El fragmento del tamaño esperado para el gen *dsrAB* amplificó en todas las muestras excepto en BC. En el reactor MR-IU no fue posible detectar mediante NMP a las BSR, la obtención del amplicón en esta muestra refuerza la conclusión de que este grupo funcional se encontraba inhibido en el reactor. Estos resultados contrapuestos se deben a que a pesar de que las técnicas de cultivo han tenido éxito, tienen limitaciones (Vester y Ingvorsen 1998). Por lo tanto, es importante complementar estos estudios mediante el empleo de técnicas moleculares. Una opción para la detección de BSR es el uso de los genes funcionales que codifican enzimas claves para la reducción del sulfato, como el gen *dsrAB* que codifica para la subunidad α y β de la sulfito reductasa desasimilatoria (Wagner *et al.* 2005).

4.3 Resultados y discusión

La amplificación del gen *narG* en los tratamientos con incorporación de urea, en contraposición a la no detección del mismo en el tratamiento sin urea (BC), estaría indicando que el agregado de una fuente nitrogenada estimula la actividad de las BNR. Se detectó la presencia del gen FTHFS en todos los tratamientos, por lo que se asume que la producción de acetato para la metanogénesis es factible en todos ellos. Por el contrario, no se detectó mediante PCR el fragmento del gen *mcrA* en ninguna de las muestras. Esto era previsible dado que no se incorporó en los reactores una fuente de AM. Por lo tanto, utilizando únicamente residuo de cebolla no sería factible la producción de biogás.

Tabla 4.9 Fragmentos amplificados (pb) mediante PCR de los genes de función.

Gen	Tratamientos ^a			
	BC	BU	MR-IU	A-35 °C
<i>drsAB</i>	-	1983	1900	1918
<i>narG</i>	-	653	658	660
FTHFS	253	250	255	253
<i>mcrA</i>	-	-	-	-

-, sin amplificación de producto PCR del tamaño esperado

Se analizaron las muestras de los biorreactores mediante DGGE para determinar si existieron diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana durante los sucesivos ensayos. El análisis de DGGE, basado en las curvas densitométricas de los perfiles de la comunidad de *Eubacteria* de los cuatro biorreactores, mostró una similitud mayor al 90 % entre los biorreactores con incorporación de urea (Fig. 4.6). El reactor BC formó un grupo independiente del resto, mostrando un evidente efecto en la comunidad eucariota debido al tratamiento. En los biorreactores en los que hubo degradación completa del residuo de cebolla (BU, MR-IU y A-35 °C) se observan bandas con alto contenido de G+C. Se puede apreciar visualmente que se reduce el número de bandas en la porción superior del gel a lo largo de los sucesivos ensayos (A-35 °C < MR-IU < BU). A su vez, las bandas con alto G+C que permanecen en estas muestras presentan mayor

4.3 Resultados y discusión

intensidad. Estos resultados concuerdan con Ricca *et al.* (2010), quienes detectaron cambios en la estructura de la comunidad de los reactores que resultaron en una disminución de la diversidad con respecto al inóculo. Asimismo, otros autores detectaron que los microorganismos que eran dominantes en el digestor original se establecían nuevamente en los reactores inoculados (Hirasawa *et al.* 2008; Wagner *et al.* 2011).

4.3 Resultados y discusión

Correlación de Pearson [0.0%-100.0%]

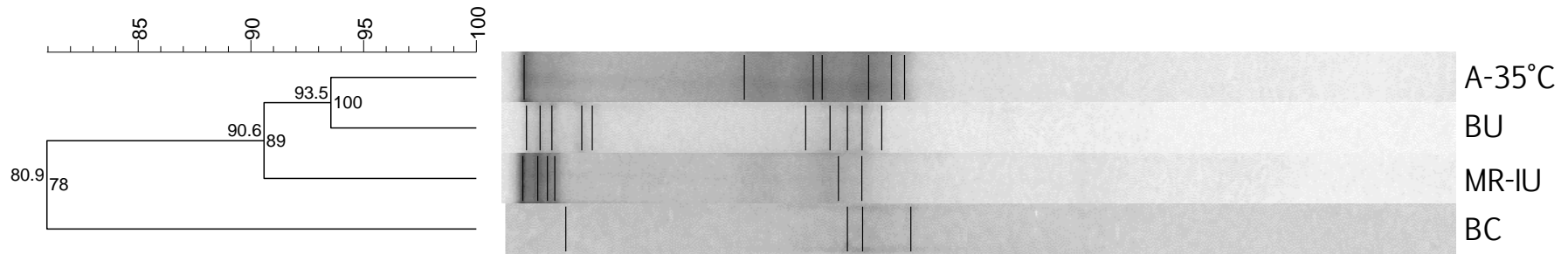


Figura 4.6 Dendrograma basado en las curvas densitométricas de los perfiles de la comunidad de *Eubacteria* de los biorreactores. El análisis se realizó con la correlación de Pearson y se utilizó el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA). En cada nodo, el número del lado izquierdo indica el valor de similitud y el número a la derecha la correlación cofenética

4.3.4. Efecto de la sanidad del residuo sobre la presencia de BSR

En el primer ensayo realizado en los biorreactores (inciso 4.3.1) se detectó mediante la técnica de NMP el número de BSR. Por el contrario, en el siguiente ensayo (inciso 4.3.2.1) las BSR no lograron ser detectadas por esta técnica. Sin embargo, la amplificación del gen *dsrAB* fue positiva en ambos ensayos. Debido a estos resultados, se decidió determinar el NMP de BSR en cebolla sana y en cebolla con bacteriosis debido a que una diferencia entre ambos ensayos fue el estado sanitario de la cebolla empleada como sustrato de la DA.

Las BSR no desarrollaron en la cebolla sana. En la cebolla con bacteriosis el número de BSR fue de 2,2 Log₁₀ NMP g⁻¹.

La producción de cebolla en el VBRC es afectada frecuentemente por enfermedades de origen bacteriano, lo que causa un incremento en el descarte de bulbos. Las bacteriosis, comúnmente denominadas podredumbre, están ocasionadas por complejos bacterianos que incluyen varias especies. Entre ellas se ha identificado a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya chrysanthemi*, *Enterobacter cloacae*, *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* y *Burkholderia cepacia* (Conn *et al.* 2012). Es probable que el ataque de estos patógenos permita el desarrollo de otros microorganismos, entre ellos las BSR, que de otra manera encuentran a la cebolla como un ambiente restrictivo.

4.4. Conclusiones

La incorporación de urea favorece el crecimiento de las poblaciones de BSR y BNR. Además, la presencia de BSR está asociada al estado sanitario de la cebolla, los patógenos bacterianos favorecen su desarrollo en los bulbos.

En condiciones mesofílicas (35 °C) la incorporación de urea e inóculo aclimatizado al sustrato favorece la biodegradación anaeróbica del residuo de cebolla. A bajas temperaturas (18 °C) se logra una reducción de ST insuficiente para una eficiente producción de biogás.

4.4. Conclusiones

La comunidad de *Eubacteria* se ve afectada por los tratamientos aplicados. Las comunidades dominantes se establecen en los digestores inoculados y la diversidad de la comunidad disminuye en los sucesivos ensayos.

En el residuo de cebolla se encuentran presentes los grupos funcionales necesarios para la etapa hidrolítica-acetogénica de la DA. Para lograr la producción de CH₄ es imprescindible que se combine el residuo de cebolla con una fuente de AM, como los estiércoles.

La incorporación de urea e inóculo activo permitieron optimizar las condiciones para la etapa hidrolítica-acetogénica de la degradación anaeróbica del residuo de cebolla.

Capítulo V

Efecto de cargas sucesivas sobre la codigestión del residuo de cebolla con barros activados

5.1. Introducción

La codigestión es la digestión simultánea de una mezcla homogénea de dos o más sustratos. Generalmente, un sustrato principal (por ejemplo estiércol o lodos de aguas residuales) se mezcla y se digiere junto con sustratos adicionales (ej. residuos vegetales) (Callaghan *et al.* 1999; Fliegerová *et al.* 2012; Griffin *et al.* 1998; Lehtomäki *et al.* 2007; Xu *et al.* 2013). El término codigestión se aplica de forma independiente a la proporción de los respectivos sustratos utilizados. La digestión conjunta de distintos residuos produce más CH₄ que los sustratos individualmente, mejora la relación de nutrientes (C: N: P) y mantiene una composición de minerales (Na, K, Mg, Mn, etc.) más equilibrada. Como consecuencia, la codigestión ayuda a mantener un rendimiento estable y fiable de la biometanización, obteniendo un fertilizante de buena calidad. Además, la mezcla de diferentes sustratos permite cierta flexibilidad para compensar las fluctuaciones estacionales en volumen de desechos, evitando variaciones en el volumen de carga del reactor y así mantener el proceso de DA a tasa constante (Braun y Wellinger 2003).

5.1 Introducción

La codigestión de diferentes residuos agrícolas con estiércol ha mostrado un aumento del 16-65 % en la proporción de CH_4 (Lehtomäki *et al.* 2008). Diferentes cultivos y residuos agrícolas se pueden utilizar para la producción de biogás, como el maíz, trigo, frutas, paja, forraje, etc. (Callaghan *et al.* 1999; Fliegerová *et al.* 2012; Xu *et al.* 2013). La composición del estiércol varía entre diferentes especies animales, y por lo tanto su aptitud como sustrato para la producción de biogás también variará. En general, el estiércol vacuno produce menos CH_4 que el estiércol de cerdos (Møller *et al.* 2004). Esto se debe a que una gran cantidad de la MO disponible en el alimento de los bovinos ya ha sido digerido y convertido en CH_4 en el rumen (Lehtomäki *et al.* 2007). El estiércol vacuno suele tener un efecto estabilizador en procesos inestables de producción de biogás, ya que la adición de estiércol resulta en la inoculación de muchos microorganismos así como varios nutrientes. Por su parte, el estiércol de cerdo contiene más proteínas que el estiércol vacuno, lo que puede conducir a problemas de inhibición por amoníaco si no son digeridos junto a otros sustratos que contengan mayor cantidad de carbohidratos (Chynoweth *et al.* 1999; Møller *et al.* 2004).

La DA es un proceso sensible a la temperatura y gran parte de los digestores operan en el rango mesofílico debido a que la mayoría de los microorganismos anaeróbicos son activos en estas condiciones (Gerardi 2003). Cuando la temperatura del reactor es menor, los consorcios de bacterias mesofílicas pasan por un largo proceso de selección y adaptación durante el cual su actividad disminuye drásticamente (McKeown *et al.* 2009). A pesar de esto, existen ejemplos de DA a bajas temperaturas con distintos sustratos y con rendimientos aceptables (Alvarez y Lidén 2009; Bohn *et al.* 2007b; McKeown *et al.* 2012).

Como se describió anteriormente, la cebolla presenta características peculiares desventajosas para la biometanización. En los capítulos precedentes se detectó que para mejorar la degradación anaeróbica del residuo de cebolla es necesario incorporar urea y se postuló que es necesario añadir una fuente de AM para lograr la producción de CH_4 . Por lo tanto, en este capítulo se plantearon los

5.1 Introducción

siguientes objetivos: 1) comprobar la producción de biogás a partir del residuo de cebolla sometido a codigestión con barros activados, 2) evaluar el efecto de sucesivas cargas de residuo de cebolla sobre la biometanización a 18 y 35 °C y 3) monitorear la estructura de la comunidad de *Eubacteria* involucrada en la biometanización.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Materias primas

Se emplearon bulbos de cebolla de descarte, los cuales fueron cortados con procesadora en trozos de 0,5 x 2 mm. Los barros activados fueron tomados de dos biorreactores rurales, el reactor **BV** estaba preparado a partir de estiércol vacuno y el reactor **BP** a partir de estiércol porcino. Ambos biorreactores se encontraban funcionando de manera estable a 20 °C.

5.2.2. Biorreactores

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando dieciséis digestores de 2 l de capacidad. Se adaptaron como biorreactores los sifones plásticos descartables en los que se comercializa agua gasificada (Fig. 5.1). La ventaja en el empleo de este reactor radica en que la válvula presente en el pico del sifón permite la liberación de gas sin retroceso del mismo. Al pico del sifón se conectó un conducto plástico para acoplarlo, al momento de descomprimir el gas del reactor, a una columna de agua o a un mechero de Bunsen según correspondiese.



Figura 5.1 Sifón plástico utilizado como biorreactor

5.2.3. Procedimiento experimental

Se evaluó el efecto de la codigestión del residuo de cebolla con barros activados en tres cargas sucesivas en biorreactores operados en *batch*, con un volumen de trabajo de 1,8 l. Se armaron dos tratamientos con ocho repeticiones (Fig. 5.2). En los reactores se incorporó cebolla y urea (10 % peso de cebolla) teniendo en cuenta las proporciones establecidas en los ensayos anteriores (Capítulo IV). En la carga inicial se adicionaron barros activados (BV y BP) como inóculo de AM. Cuatro repeticiones de cada tratamiento fueron incubadas al azar en estufa a 18 °C y las restantes a 35 °C. Los reactores se agitaron diariamente para mezclar su contenido y favorecer la liberación del gas.

Una vez finalizado el proceso de digestión de la carga inicial, se realizó la segunda carga de los biorreactores. En primer lugar, se procedió a realizar el vaciado del volumen superior del reactor, dejándose un 28 % como barro activado.

5.2 Materiales y Métodos

Seguidamente se agregó cebolla, urea y agua en las mismas proporciones que en la carga inicial. Este mismo procedimiento se repitió para realizar la tercera carga.

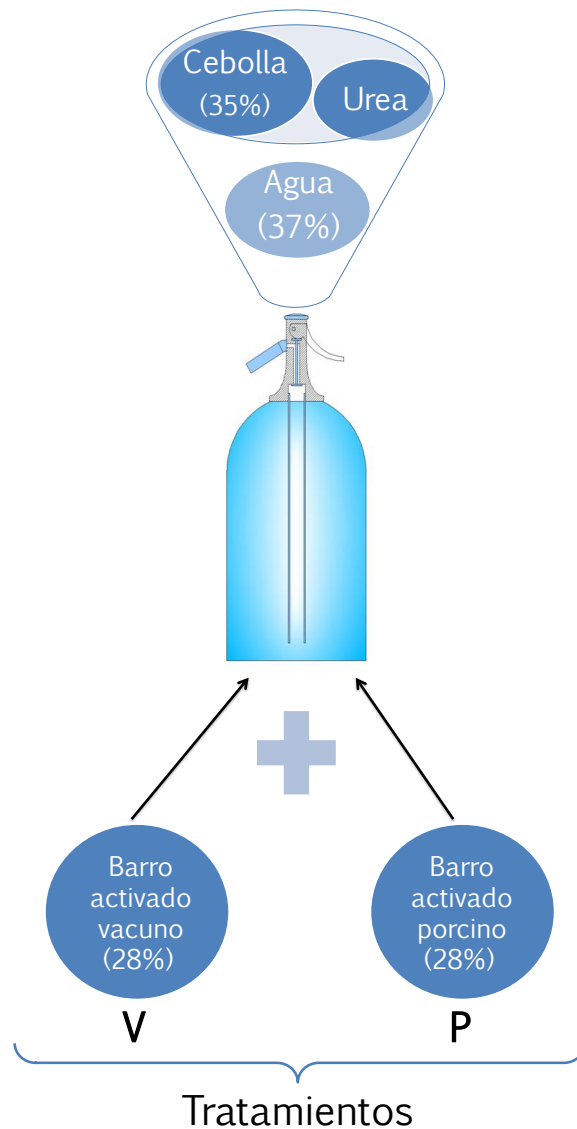


Figura 5.2 Esquema de los tratamientos diseñados para el ensayo de codigestión. Se expresa la proporción de los sustratos en función del volumen de trabajo del reactor

5.2.4. Análisis químicos

De cada biorreactor se tomó una muestra inicial y final en las que se midió el pH, con pH-Indikatorpapier Neutralit® (Merck, Alemania), y se determinaron los sólidos totales (ST) y volátiles (SV) de acuerdo al método estándar (APHA 1992) (Anexo III). Se calculó la remoción de ST y SV según la ecuación 5.1 y 5.2

5.2 Materiales y Métodos

respectivamente (Wan *et al.* 2013). Para estimar el grado de digestión en cada biorreactor se empleó la fórmula 5.3:

$$\text{(Ec. 5.1) Reducción de ST (\%)} = \left[\frac{(ST_i - ST_f)}{ST_i} \right] \times 100$$

$$\text{(Ec. 5.2) Reducción de SV (\%)} = \left[\frac{(SV_i - SV_f)}{SV_i} \right] \times 100$$

$$\text{(Ec. 5.3) Grado de digestión (\%)} = \left[\frac{(ST_i \times SV_i - ST_f \times SV_f)}{(ST_i \times SV_i)} \right] \times 100$$

Donde ST_i (%) y SV_i (%) son la concentración de sólidos totales y sólidos volátiles al inicio de la DA respectivamente. ST_f (%) y SV_f (%) son la concentración de sólidos totales y sólidos volátiles al final de la DA, respectivamente.

Cada vez que los reactores se encontraban turgentes, debido a la presión del gas generado, se procedió a descomprimirlos accionando el pico del sifón. Se midió el volumen de biogás producido mediante desplazamiento de una columna de agua y se comprobó si el gas era inflamable. Se contabilizó la descarga del reactor como inflamable si se producía una llama azul en el mechero de Bunsen (Fig. 5.3). Se calculó la relación entre las descargas inflamables y totales como referencia de la producción total de CH_4 . Este parámetro solo es orientativo ya que el biogás con un contenido de CH_4 mayor al 45 % es inflamable (Deublein y Steinhauser 2008).



Figura 5.3 Sifón conectado a mechero de Bunsen para comprobar la producción de gas inflamable

Se reportan los valores medios de las réplicas. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), considerando al tratamiento como la variable independiente. Los valores medios de los tratamientos se compararon mediante la diferencia mínima significativa de Fisher, considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$ durante todo el estudio.

5.2.5. Análisis Moleculares

5.2.5.1. Extracción de ADN y amplificación por PCR del gen *mcrA*

En las tres cargas se tomó, de cada biorreactor, una muestra inicial y final para análisis moleculares. Las muestras se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de ácidos nucleicos. La extracción del ADN de la comunidad total se realizó con el kit Fecal DNA (MoBio Laboratories, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.2 Materiales y Métodos

Para detectar la presencia de las AM se utilizó el par de cebadores MLf-MLr (Tabla 4.4) que amplifican el gen *mcrA* que codifica para la subunidad α de la metil-coenzima M reductasa, responsable del paso final de la síntesis de CH₄ (Juottonen *et al.* 2006). La mezcla de reacción y las condiciones de PCR fueron las descritas en el capítulo IV, sección 4.2.4.1, Tabla 4.5.

5.2.5.2. PCR-DGGE de *Eubacteria*

Para el análisis de la comunidad de *Eubacteria* se realizó PCR-DGGE con los cebadores 984F-GC/1378R, descritos en el capítulo IV, Tabla 4.6. Las condiciones de PCR fueron las mismas a las descritas en la sección 4.2.3.2. Se realizó un gel de DGGE por cada temperatura de incubación. La DGGE se realizó de igual modo al descrito en el punto 4.2.3.2 excepto que el gradiente desnaturizante para las muestras de los biorreactores incubados a 35 °C fue de 45-60 % (donde 100 % = urea 7 M y 40 % de formamida deionizada). Los geles se analizaron del modo descrito anteriormente en el capítulo IV, brevemente, se utilizaron las curvas densitométricas para calcular la correlación de Pearson como el coeficiente de similitud y se aplicó el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA) para construir el dendrograma mediante el programa GelCompar II (AppliedMaths, Kortrijk, Bélgica).

5.3. Resultados

5.3.1. Codigestión a 35 °C

5.3.1.1. Carga inicial

Las codigestiones con BV fueron las que produjeron mayor volumen de biogás (Fig. 5.4), sin embargo la relación entre las descargas inflamables (DI) con respecto a las totales (DT) fue menor que en P (Tabla 5.1). El tratamiento P presentó producción de gas inflamable más rápidamente y mayor reducción de SV (Tabla 5.1). Todos los biorreactores presentaron a lo largo del ensayo un pH entre

5.3 Resultados

7,5 y 8. En función del cese de producción de biogás y al estado de degradación del residuo (Fig. 5.5), a los 77 días del inicio se dio por finalizado el ensayo.

5.3.1.2. Segunda carga

Al igual a lo sucedido en la carga inicial, las codigestiones con BV fueron las que generaron mayor volumen de biogás (Fig. 5.4). Este tratamiento presentó una relación DI/DT mayor a la obtenida en la carga inicial y lo opuesto ocurrió en P (Tabla 5.1). Sin embargo, los biorreactores con BP nuevamente produjeron gas inflamable más rápidamente y presentaron mayor reducción de SV que V (Tabla 5.1). Todos los reactores presentaron pH 8 a lo largo del ensayo. En base a las características mencionadas en el punto anterior, a los 56 días del inicio se dio por finalizado el ensayo.

5.3.1.3. Tercera carga

En todos los reactores la producción de gas inflamable fue al día siguiente del armado (Tabla 5.1). No obstante, se evidenció una gran disminución en la cantidad de biogás producido en los dos tratamientos, siendo esta diferencia altamente significativa con respecto a las cargas precedentes ($p < 0,05$) (Fig. 5.4). Por otra parte, no hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en la reducción de ST y SV con respecto a las cargas anteriores en ambos tratamientos. El pH final de los reactores fue inferior a los valores finales de las cargas anteriores (Tabla 5.1). A los 30 días del comienzo del ensayo se lo dio por finalizado debido a que los reactores dejaron de producir biogás.

5.3 Resultados

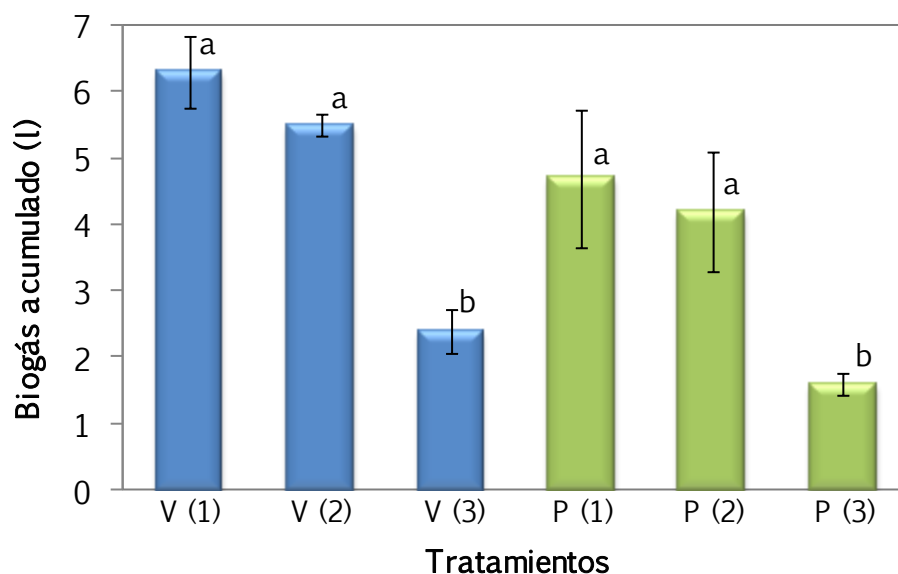


Figura 5.4 Volumen total de biogás producido en cada carga de los biorreactores a 35 °C. Los valores corresponden a la media de las repeticiones. En azul se representan las codigestiones con barro activado vacuno (*V*) y en verde con barro activado porcino (*P*). Los números entre paréntesis corresponden a los distintos ensayos: (1) carga inicial, (2) segunda carga, (3) tercera carga



Figura 5.5 Tratamiento V al inicio (*derecha*) y final (*izquierda*) de la primera carga. Se observa la degradación del residuo de cebolla luego de 77 días de ensayo

5.3 Resultados

Tabla 5.1 Resultados de la digestión anaeróbica de cebolla con barro activado vacuno (V) y con barro activado porcino (P) a 35 °C. Se muestran los valores medios de cuatro repeticiones y los errores estándar

Tratamientos	Carga	HRT (días)	pH		Reducción ST (%)	Reducción SV (%)	Grado de digestión (%)	Días en producir gas inflamable	Relación DI/DT
			inicial	final					
V	1	77	7,8±0,14	8±0	38,9	15,1	48,1	10±1	0,55
	2	56	8±0	8±0	36,4	16,3	46,7	8,75±0,75	0,74
	3	30	7,5±0	7,1±0,13	37	19,1	49,1	1±0,0	0,79
P	1	77	7,5±0	8±0	34,3	24,5	50,4	2,75±0,48	0,88
	2	56	8±0	8±0	33,3	25,6	50,5	6,75±0,48	0,79
	3	30	8±0	6,8±0,25	21,4	22	38,6	1±0,0	0,80

HRT Tiempo de retención hidráulica; *ST* sólidos totales; *SV* sólidos volátiles; *DI* descargas inflamables; *DT* descargas totales

5.3 Resultados

5.3.1.4. PCR del gen *mcrA* y DGGE de *Eubacteria*

Todas las muestras amplificaron el fragmento del tamaño esperado (~470 pb) para el gen *mcrA*, indicando la presencia de las AM en todos los reactores (Tabla 5.2).

Las variaciones en la estructura de la comunidad microbiana de los digestores se determinó mediante DGGE de los fragmentos amplificados por PCR del gen 16S ADNr. Las poblaciones detectadas en el inóculo BV no permanecen en los biorreactores V, ya que solo se observan las dos bandas presentes en BV en el perfil de la muestra inicial de la primera carga (Fig. 5.6). Como consecuencia de la diferencia en el perfil, BV formó un grupo independiente, asemejándose al resto de las muestras sólo en 52,5 %. Por el contrario, algunas de las bandas presentes en BP prevalecen en los reactores inoculados con este barro. En los perfiles de todos los muestreos de ambos tratamientos, se observan dos poblaciones claramente polarizadas. En ambas, se pueden apreciar bandas dominantes que se observan a lo largo de las cargas.

Tabla 5.2 Fragmentos amplificados (pb) del gen *mcrA* en los biorreactores incubados a 35 °C

Tratamientos	Muestra	<i>mcrA</i>
V	1i	484
	1f	478
	2i	490
	2f	484
	3i	484
	3f	486
P	1i	486
	3f	478
	2i	478
	2f	478
	3i	478
	3f	478

V codigestión de cebolla con BV; P codigestión de cebolla con BP; 1 carga inicial; 2 segunda carga; 3 tercera carga; i muestreo inicial; f muestreo final

5.3 Resultados

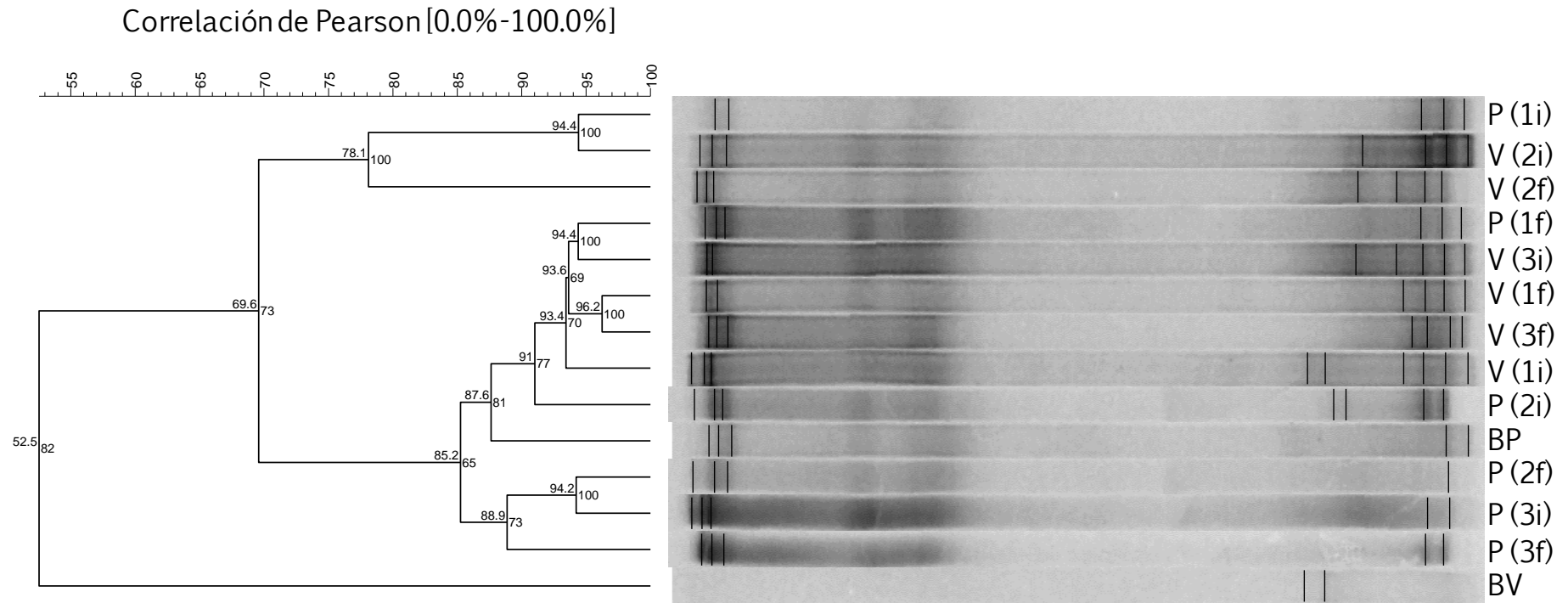


Figura 5.6 Dendrograma basado en las curvas densitométricas de los perfiles de la comunidad de *Eubacteria* de los biorreactores incubados a 35 °C y de los barros inoculados. El análisis se realizó con la correlación de Pearson y se utilizó el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA). En cada nodo, el número del lado izquierdo indica el valor de similitud y el número a la derecha la correlación cofenética. *BV* barro activado con estiércol vacuno; *BP* barro activado con estiércol porcino; *V* codigestión de cebolla con *BV*; *P* codigestión de cebolla con *BP*; *1* carga inicial; *2* segunda carga; *3* tercera carga; *i* muestreo inicial; *f* muestreo final

5.3 Resultados

5.3.2. Codigestión a 18 °C

5.3.2.1. Carga inicial

No hubo diferencias en el volumen de biogás producido entre ambos tratamientos ($p < 0,01$) (Fig. 5.7). Sin embargo, la rapidez en la generación de gas inflamable y la relación entre descargas inflamables y totales fue muy superior en P (Tabla 5.3). Concordantemente, P presentó mayor reducción de SV que las codigestiones con BV (Tabla 5.3) (Fig. 5.8). Todos los biorreactores presentaron un pH entre 7,3 y 8 (Tabla 5.3). El ensayo duró 77 días.

5.3.2.2. Segunda carga

En el tratamiento V se observó una disminución altamente significativa ($p < 0,01$) en el volumen total de biogás (Fig. 5.6), mientras que en P no se encontraron diferencias con respecto a la carga inicial. Además, los biorreactores con codigestión con BV no produjeron gas inflamable. La reducción de SV fue nuevamente mayor en el tratamiento P (Tabla 5.2). Todos los biorreactores presentaron un pH inicial entre 7,3-7,5 y pH final de 8 (Tabla 5.2). A los 56 días del inicio se dio por finalizado el ensayo.

5.3.2.3. Tercera carga

No hubo producción de gas inflamable en ninguno de los biorreactores y el volumen total de biogás fue muy inferior si se lo compara con el de la carga inicial ($p < 0,01$) (Fig. 5.7). En el tratamiento V, la reducción de SV y el grado de digestión fueron muy bajos, lo que se corroboró visualmente al apreciar que no había prácticamente degradación del residuo de cebolla en ninguno de los biorreactores (Fig. 5.9). Los pH finales oscilaron entre 5 y 6 (Tabla 5.3). El ensayo duró 30 días.

5.3 Resultados

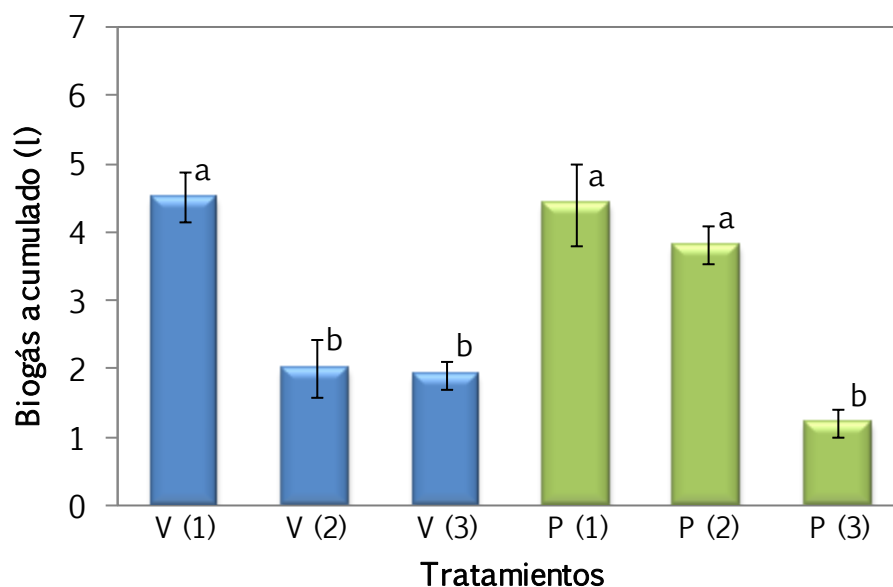


Figura 5.7 Volumen total de biogás producido en cada carga de los biorreactores a 18 °C. Los valores corresponden a la media de las repeticiones. En azul se representan las codigestiones con barro activado vacuno (*V*) y en verde con barro activado porcino (*P*). Los números entre paréntesis corresponden a los distintos ensayos: (1) carga inicial, (2) segunda carga, (3) tercera carga



Figura 5.8 Tratamiento V al inicio (*derecha*) y final (*izquierda*) de la primera carga. La degradación del residuo de cebolla no es completa luego de 77 días de ensayo

5.3 Resultados



Figura 5.9 Tratamiento V al final de la tercera carga. Se observa que el residuo de cebolla no fue degradado durante el período de ensayo

5.3 Resultados

Tabla 5.3 Resultados de la digestión anaeróbica de cebolla con barro activado vacuno (V) y con barro activado porcino (P) a 18 °C. Se muestran los valores medios de cuatro repeticiones y los errores estándar

Tratamientos	Carga	HRT (días)	pH		Reducción ST (%)	Reducción SV (%)	Grado de digestión (%)	Días en producir gas inflamable	Relación DI/DT
			inicial	final					
V	1	77	7,8±0,14	8±0	27	10,6	34,7	46±13,3	0,36
	2	56	7,3±0,25	8±0	33,3	11,5	41	-	-
	3	30	6,5±0	5±0,0	3,6	2,3	5,8	-	-
P	1	77	7,3±0,14	8±0	23,8	16,6	36,5	4,25±0,25	0,77
	2	56	7,5±0	8±0	34,4	23,2	49,6	5,25±1,55	0,82
	3	30	7±0	6±0,35	21,1	14,1	32,2	-	-

HRT Tiempo de retención hidráulica; *ST* sólidos totales; *SV* sólidos volátiles; *DI* descargas inflamables; *DT* descargas totales

5.3.2.4. PCR del gen *mcrA* y DGGE de *Eubacteria*

En todos los reactores se detectó la presencia del gen *mcrA*, demostrando la existencia de las AM (Tabla 5.4).

Los cambios en la estructura de la comunidad microbiana durante la codigestión de cebolla con BV y BP fueron monitoreados utilizando la técnica de DGGE. El análisis basado en las curvas densitométricas de los perfiles de la comunidad de *Eubacteria*, mostró una similitud del 80,2 % entre todas las muestras (Fig. 5.10). El inóculo BV y las muestras iniciales de la primera carga de ambos tratamientos formaron un grupo independiente. Las poblaciones de BV sólo son detectadas en las muestras de la primera carga de V. En cambio, algunas bandas de BP también se observaron en las muestras del tratamiento P. En general en el tratamiento V se observa inestabilidad en las comunidades, con bandas que aparecen y desaparecen. En las dos primeras cargas del tratamiento P los perfiles son menos variables que los de V, principalmente en las poblaciones con alto G+C. Sin embargo, las comunidades de la muestra final de la tercera carga de ambos tratamientos son diferentes al resto.

Tabla 5.4 Fragmentos amplificados (pb) del gen *mcrA* en los biorreactores incubados a 18 °C

Tratamientos	Muestra	<i>mcrA</i>
V	1i	475
	1f	477
	2i	475
	2f	475
	3i	482
	3f	482
P	1i	483
	3f	476
	2i	472
	2f	487
	3i	495
	3f	503

V codigestión de cebolla con BV; P codigestión de cebolla con BP; 1 carga inicial; 2 segunda carga; 3 tercera carga; i muestreo inicial; f muestreo final.

5.3 Resultados

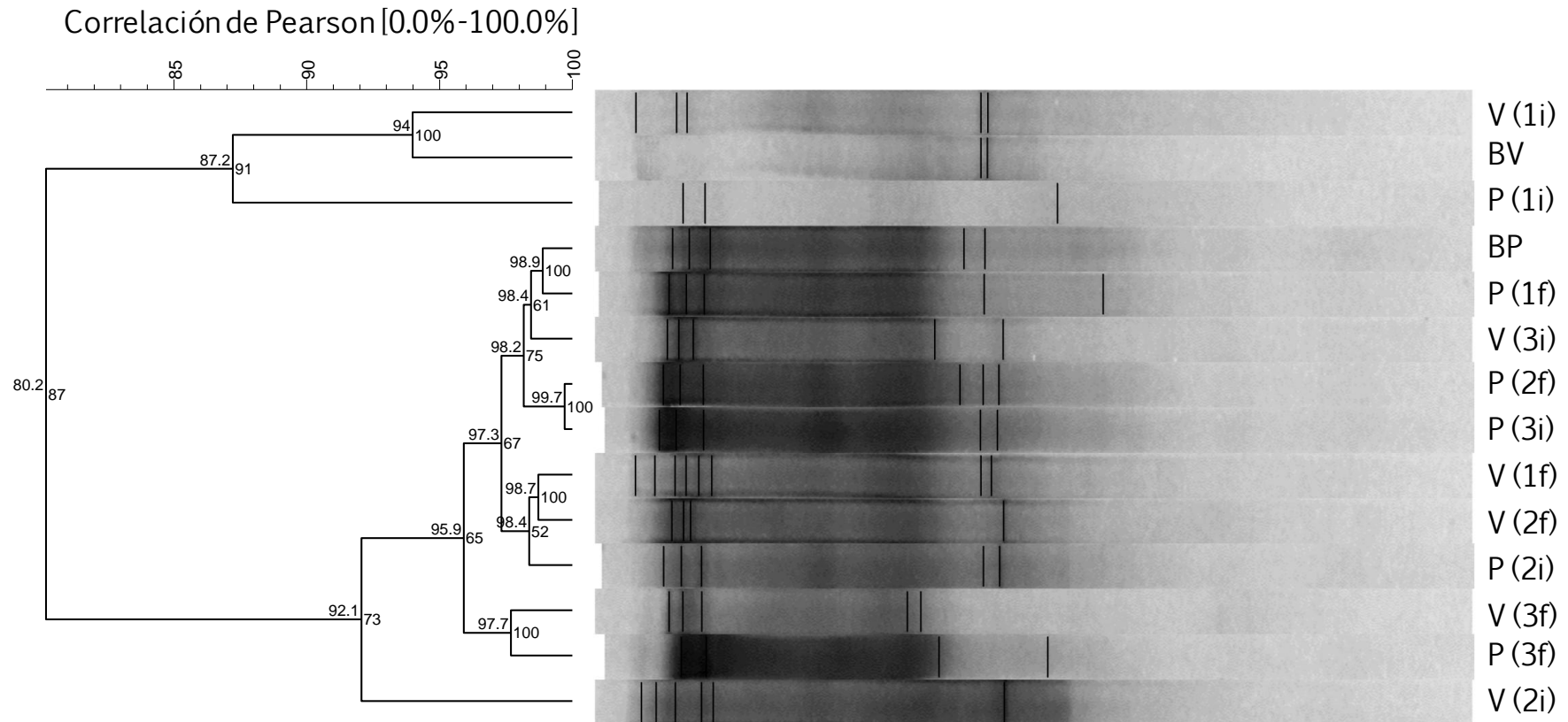


Figura 5.10 Dendrograma basado en las curvas densitométricas de los perfiles de la comunidad de *Eubacteria* de los biorreactores incubados a 18 °C y de los barros inoculados. El análisis se realizó con la correlación de Pearson y se utilizó el método de agrupamiento de pares con media aritmética no ponderada (UPGMA). En cada nodo, el número del lado izquierdo indica el valor de similitud y el número a la derecha la correlación cofenética. *BV* barro activado con estiércol vacuno; *BP* barro activado con estiércol porcino; *V* codigestión de cebolla con *BV*; *P* codigestión de cebolla con *BP*; *1* carga inicial; *2* segunda carga; *3* tercera carga; *i* muestreo inicial; *f* muestreo final

5.3.3. Ensayos realizados en EEA INTA Ascasubi

Simultáneamente al desarrollo de los experimentos realizados en el presente capítulo, se hicieron una serie de cuatro ensayos en la EEA INTA Hilario Ascasubi en colaboración con el grupo de horticultura de dicha entidad (Mairoser *et al.* 2014; Mairoser *et al.* 2013). Se emplearon como reactores, Erlenmeyers de 2 l conectados continuamente a una columna de agua para la medición diaria de producción de biogás (Fig. 5.11). En estos estudios se evaluó la codigestión del residuo de cebolla con barros activados a partir de distintos estiércoles (vaca, pollo y cerdo) y en distintas proporciones. Se realizaron cargas sucesivas del mismo modo al explicado en el inciso 5.2.3. Se logró la producción de biogás en las tres codigestiones a 24 °C. En estos ensayos también se pudo observar que disminuye el volumen de producción de biogás con las sucesivas cargas y que más del 90 % del total de biogás se produce en los primeros 25 días de ensayo. De las tres codigestiones, la del barro de estiércol vacuno fue la menos perturbada por el efecto de las cargas.

En base a los resultados obtenidos en estos ensayos y a los de este capítulo, se diseñaron dos nuevas experiencias (Mairoser *et al.* 2015). En esta ocasión, los reactores se incubaron en bateas con agua para lograr una temperatura de digestión de 35 °C (Fig. 5.11). En primer lugar, se evaluó la codigestión de cebolla (28 %) con BV en dos proporciones (20 y 28 %). El ensayo tuvo una duración de 34 días, detectándose la producción de gas inflamable al día siguiente del armado en ambas mezclas. El tratamiento con mayor proporción de BV produjo en promedio 17,1 l de biogás mientras que el de menor proporción logró en promedio 7,1 l de biogás. Se concluyó que el tratamiento con igual proporción de BV y cebolla es el más indicado para la codigestión de estos residuos. En el segundo ensayo, se evaluaron dos tratamientos con igual proporción de cebolla y barro. En uno de los tratamientos se utilizó como inóculo BV y en el otro, el barro formado durante la digestión del primer ensayo (BR). Como se puede observar en la figura 5.12, el comportamiento de los tratamientos con 28 % BV es semejante, mientras que la producción de biogás con BR disminuye.

5.3 Resultados



Figura 5.11 Biorreactores utilizados en los ensayos realizados en la EEA INTA Ascasubi. *Izquierda* Erlenmeyers conectados a una columna de agua para medición diaria de la producción de biogás; *derecha* los reactores se colocaron en bateas para lograr la digestión a 35 °C

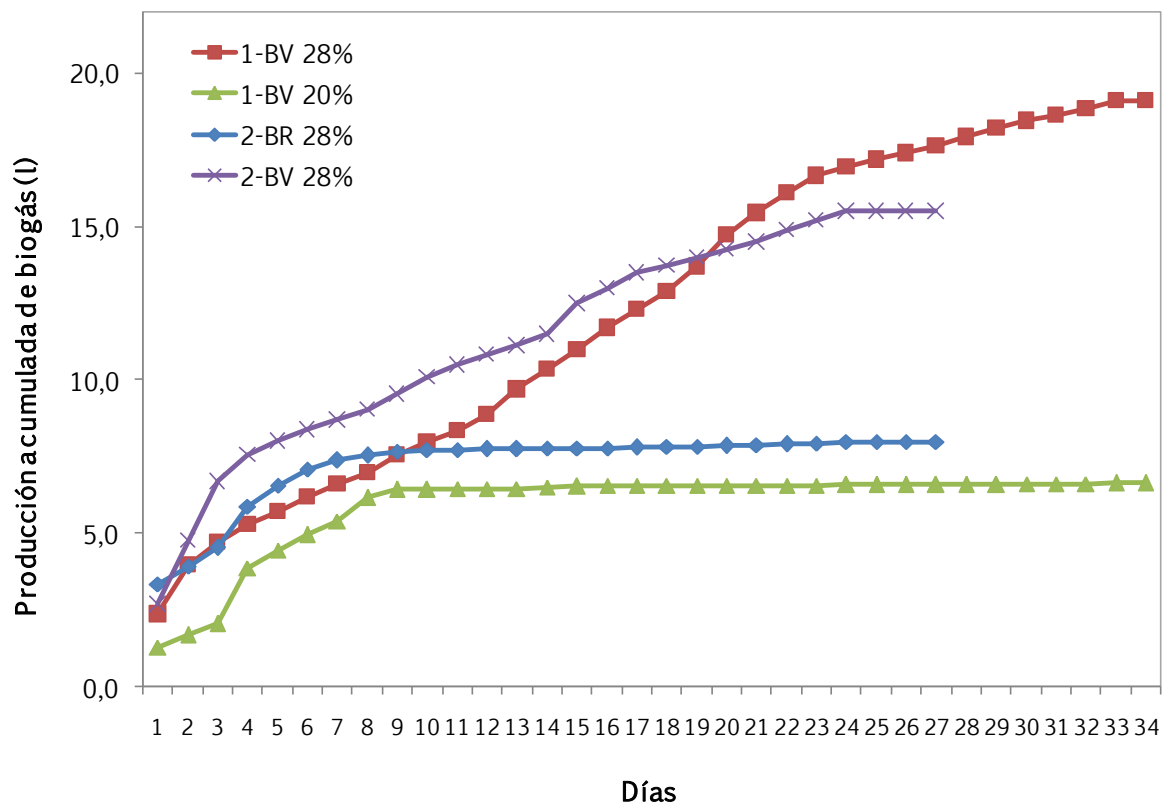


Figura 5.12 Acumulación de biogás durante la codigestión del residuo de cebolla con barro activado. *Leyenda:* se indica el número de ensayo delante del tratamiento y detrás la proporción de barro utilizada. *BV* barro activado con estiércol vacuno; *BR* barro formado durante la digestión del primer ensayo

5.4. **Discusión**

Mediante la serie de ensayos realizados en este estudio se buscó reproducir el ciclo que se generaría en un reactor de carga discontinua instalado a campo. De los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, se sabía que era necesario codigerir el residuo de cebolla con otro sustrato que aportara AM para lograr la biometanización. Por lo tanto, se planteó una carga inicial en la que se mezcló cebolla con barros activados. Finalizado este ensayo, se realizaron dos cargas más en las que se dejó como barro, el digerido formado durante la digestión anterior a fin de evaluar si era posible lograr un barro adaptado a las características del residuo de cebolla.

5.4.1. **Codigestión a 35 °C**

Mediante el agregado de barro activado, generado tanto con estiércol de vaca como de cerdo, se logró la producción de gas inflamable. Por lo tanto, la incorporación de este tipo de barro en el biorreactor aporta AM y hace factible la producción de biogás a partir del residuo de cebolla. En general, el tiempo para la detección del gas inflamable disminuyó con las cargas, lo que hace suponer que la población de AM del barro formado en los reactores, estaba más activa al momento de las cargas que la de BP y BV.

En todas las cargas, el tratamiento V produjo mayor cantidad de biogás que P. Particularmente en la última carga, se observó una disminución significativa en el volumen producido en ambos tratamientos. Esto coincide con lo detectado en los ensayos de codigestión efectuados en la EEA INTA Ascasubi con BV y residuo de cebolla (sección 5.3.3). Curiosamente, se pudo observar en todos los ensayos realizados por nuestro grupo de trabajo, una disminución de la eficiencia en la producción de biogás cuando la codigestión no se realiza con barro activado a partir de estiércol. Por lo tanto, no se formaría un barro estabilizado a partir de la codigestión del residuo de cebolla que permita independizarse del agregado de barro activado en las siguientes cargas. Se ha reportado que la codigestión en proporciones aproximadamente iguales, de desechos de comida o de residuos

5.4 Discusión

agrícolas con estiércol de vaca o cerdo, tiene un efecto sinérgico que resulta en una mayor producción de CH₄ (40-50 %) comparado con la digestión de los sustratos individualmente (Agyeman y Tao 2014; El-Mashad y Zhang 2010; Ferrer *et al.* 2014; Wu *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2013). Sin embargo, al disminuir la proporción de inóculo se puede producir la acumulación de ácidos grasos volátiles, dando lugar a la inhibición de la metanogénesis y en consecuencia, afectando el rendimiento de CH₄ (Ali Shah *et al.* 2014). Consecuentemente, para mantener una población de AM activas es necesario incorporar, en cada carga, las mismas proporciones de barro activado y cebolla.

El pH es uno de los parámetros de diagnóstico en el manejo de la DA, considerándose que un proceso es estable cuando se opera en rangos de pH de 6,8 - 8,5 (Gerardi 2003; Schnürer y Jarvis 2010). En las tres cargas, el pH se mantuvo en el rango adecuado para la producción de CH₄ (Tabla 5.1). Indicando que, a 35 °C, ambos barros activados tuvieron capacidad tampón frente al residuo de cebolla, el cual posee pH ácido. Este efecto también fue observado en la codigestión de residuos de comida con estiércol vacuno, lo que permitió una mayor carga orgánica sin necesidad de controlar el pH (Zhang *et al.* 2013). De este modo, el agregado de barro estaría logrando dos objetivos, incorporar AM y contrarrestar el pH ácido del residuo de cebolla, situación que no se había logrado con los tratamientos realizados en el capítulo IV.

En la tercera carga, el tiempo de retención disminuyó en 47 días con respecto a la duración de la carga inicial. El tiempo de retención de 30 días logrado en la última carga también se ha reportado en digestores con estiércol vacuno y desechos de comida (El-Mashad y Zhang 2010). En el caso del tratamiento V, el grado de digestión del residuo se mantuvo constante en todas las cargas a pesar de que la eficiencia en el volumen de biogás disminuyó. Esto estaría indicando que la degradación del residuo se acelera con las sucesivas cargas sugiriendo una adaptación y/o selección de los microorganismos responsables de la degradación de la cebolla. Por el contrario, se puede suponer que hay algún efecto negativo sobre la actividad de las AM o que su número no es lo suficientemente alto para consumir los ácidos que se estarían formando a

5.4 Discusión

una tasa más elevada, lo que en cualquiera de los casos disminuye la producción de biogás. En el tratamiento P, el efecto negativo estaría afectando, además de las AM, a la comunidad hidrolítica, ya que el porcentaje de degradación del residuo es menor que en las cargas precedentes.

Las comunidades de *Eubacteria* son las responsables de las tres primeras etapas de la biometanización y es el grupo dominante en los digestores anaeróbicos, por lo tanto si la comunidad es estable, el proceso también lo será (Krause *et al.* 2008; Wirth *et al.* 2012). Las muestras finales de la primera y tercera carga del tratamiento V se agruparon en el dendrograma con una similitud del 96,2 % (Fig. 5.6, V(1f) y V(3f)). Esto sugiere una relativa estabilidad de la comunidad de *Eubacteria*, que se corresponde con el grado de digestión constante del residuo entre las tres cargas. Se observó que ambos tratamientos presentaron un perfil con dos comunidades polarizadas. De estas dos comunidades, la de bajo contenido en GC presenta mayor variación. Particularmente, el perfil de las comunidades del tratamiento P es menos diverso que las de V. La riqueza y diversidad de las poblaciones microbianas está relacionada con la eficiencia de la digestión. Gou *et al.* (2014) encontraron que la reducción de la cantidad de bandas en el perfil de la comunidad se correlacionaba con una disminución en el rendimiento de CH₄ y en la eficiencia de eliminación de SV.

Por otra parte, se observó que las comunidades de BV no se detectan en ninguno de los reactores del tratamiento V. En el caso de BP, se puede observar que solo algunas bandas prevalecen en los reactores. Por lo tanto, la comunidad de *Eubacteria* que se establece en los biorreactores provendría del residuo de cebolla. Esto es concordante con lo observado en los capítulos II y III, en los que se detectó que el residuo de cebolla posee bacterias nativas con la capacidad de degradar tanto sus catáfilas internas como externas. La importancia del sustrato sobre la estructura de la población de *Bacteria* fue evidenciada cuando reactores con distintos residuos y el mismo estiércol presentaron comunidades microbianas diferentes (St-Pierre y Wright 2014). Resultados similares se encontraron en la codigestión de estiércol de cerdo con maíz, el perfil de la comunidad del estiércol difirió del perfil del efluente del reactor (Fliegerová *et al.* 2012).

5.4.2. Codigestión a 18 °C

En todos los parámetros medidos, se observó mayor variabilidad entre las cargas de la codigestión a 18 °C que a 35 °C.

Inicialmente, el volumen de biogás generado en el tratamiento V fue inferior a la producción a 35 °C, mientras que el volumen alcanzado en P no presentó diferencias entre las dos temperaturas. No obstante, se detectó gas inflamable en los dos tratamientos. Por lo tanto, se verifica nuevamente que los barros aportan AM y, además, que las mismas son activas a 18 °C. A pesar de esto, el período para detectar el gas inflamable en V fue muy prolongado. En ambos tratamientos, no sólo disminuyó la producción de biogás a lo largo de las cargas sino que finalmente no se detectó gas inflamable. Cabe recordar que debido al método de detección empleado, esto no implica necesariamente que no se produjera CH₄, sino que probablemente la concentración de este compuesto en la mezcla de biogás no fue suficiente (< 45 %) para encender la llama (Deublein y Steinhauser 2008).

En ambos tratamientos, los valores de pH de las dos primeras cargas estuvieron dentro de los valores apropiados para la biometanización (Gerardi 2003). En la última carga, los biorreactores finalizaron con pH ácido, lo que estaría indicando que el proceso estaba en fase acidogénica. Al igual que lo observado a 35 °C, los efectos beneficiosos de los barros (capacidad tampón y producción de CH₄) se diluyen con las cargas. Más aún, en la digestión a 18 °C estos efectos son menos perdurables en el tiempo.

A pesar de que los dos tratamientos presentaron reducción de SV y degradación del residuo, estos valores son inferiores a los logrados en la degradación mesofílica. No obstante, coinciden con los informados por Alvarez y Lidén (2009) para la DA de estiércol vacuno a 18 °C.

Los valores de todos los parámetros medidos en la digestión a 18 °C indican un desbalance en la biometanización. La inhibición de este proceso es consecuencia del efecto de varios factores relevantes. La temperatura de incubación probablemente haya afectado negativamente sobre todo a las AM. Se sabe que estas arqueas son más competitivas a temperaturas elevadas (Pender *et al.* 2004). En este sentido, se ha informado que el rendimiento de CH₄ en la DA de

5.4 Discusión

remolacha y paja disminuyó con la temperatura (Bohn *et al.* 2007b). Si se reduce la actividad de las AM, y el resto de los microorganismos integrantes de la cadena productora de biogás continúan degradando el sustrato, los ácidos producidos se acumulan junto con el CO₂, disminuyendo el pH (Ahring 2003). A esto se agrega que la cebolla es un residuo con pH bajo, lo que estimula aún más la acidificación del reactor. La acumulación de ácidos y la disminución del pH terminan inhibiendo la actividad de todos los microorganismos responsables de la hidrólisis (Zverlov *et al.* 2009).

Los perfiles de las comunidades de los reactores a 18 °C son más parecidos entre sí (80,2 %) que los de la digestión mesofílica. Al igual que lo que sucede a 35 °C, las bandas presentes en BV no se observan en los perfiles de los reactores. Así mismo, los perfiles de las comunidades de los reactores a 18 °C son diferentes a los de 35 °C, es decir que a partir de las mismas mezclas de sustratos se establecieron distintas poblaciones de acuerdo a la temperatura de digestión. Esto concuerda con otros autores que sugieren que la temperatura tiene un efecto más importante sobre la riqueza y diversidad de las poblaciones microbianas que el sustrato (Ziganshin *et al.* 2013). Los cambios en los patrones de las comunidades microbianas reflejan la inestabilidad del sistema dentro del biorreactor. Bohn *et al.* (2007a) estudiaron la DA de residuos de cosecha a 16 °C y a 25 °C. Estos autores detectaron que la relación entre la cantidad de *Archaea* respecto al total de procariontas disminuyó en la DA a 16 °C. A su vez, el aumento de la cantidad de *Bacteria*, debido principalmente al desarrollo de las acidogénicas, condujo a un aumento en la tasa de hidrólisis y en el contenido de SV, resultando la metanogénesis el paso limitante.

Como era previsible, el comportamiento de los biorreactores es diferente a 18 que 35 °C. La DA es menos eficiente a bajas temperaturas, especialmente con BV como inóculo. En la DA a baja temperatura de aguas residuales acidificadas, se logró un proceso estable y eficiente luego de un período mayor a tres años (McKeown *et al.* 2009). En el caso de la DA con estiércol a bajas temperaturas (20-25 °C), se sabe que para lograr rendimientos similares al de la DA a 35 °C, el HRT debe ser entre 100 a 300 días (Hill *et al.* 2001). Dada la dinámica de la

5.4 Discusión

generación del residuo de cebolla es necesario que la degradación se logre en un período no mayor a 30-60 días. Por lo tanto, instalar un biorreactor en la zona productora de cebolla del sur de la provincia de Buenos Aires, demandaría un diseño de digestor en el que se prevea un sistema de calefacción para lograr una temperatura constante de 35 °C.

5.5. Conclusiones

Tanto el barro activado a partir de estiércol de vaca como de cerdo, fueron aptos para la codigestión con el residuo de cebolla, logrando la producción de gas inflamable y generando un efecto tampón en el biorreactor.

La biometanización es más eficiente a 35 °C, ya que genera mayor cantidad de biogás y mayor grado de digestión del sustrato. Cuando la biometanización se lleva a cabo a 18 °C, se genera inicialmente un retraso en la producción de gas inflamable y posteriormente provoca el estancamiento del proceso en la fase acidogénica. Este efecto es más pronunciado en la codigestión con barro activado de estiércol vacuno.

Existe una disminución en la eficiencia de la biometanización con las sucesivas cargas en ambas temperaturas. A partir del residuo de cebolla no se forma un barro estabilizado que posea capacidad tampón y que permita el establecimiento de una comunidad metanogénica activa. Por lo tanto, es necesario incorporar en cada carga barro estabilizado junto con el residuo a degradar.

La comunidad de *Eubacteria* que predomina en la codigestión está influenciada por el sustrato. No obstante, las comunidades dominantes son diferentes dependiendo de la temperatura.

En base a los resultados obtenidos en este grupo de ensayos y a la disponibilidad y necesidad de gestión de los residuos a nivel local, se recomienda optar por la codigestión de cebolla con estiércol vacuno en condiciones mesofílicas.

Capítulo VI

Conclusiones generales y perspectivas futuras

A partir de los estudios realizados en esta Tesis, se comprobó que el residuo de la producción de cebolla del VBRC es factible de ser utilizado como sustrato en la biometanización, estableciendo una alternativa de reutilización viable para estos residuos. Para demostrar esta perspectiva, se establecieron diversos estudios de los cuales se detallan a continuación, las conclusiones más relevantes.

Se desarrolló un medio de cultivo, a partir de los nutrientes del bulbo de cebolla, apropiado para el crecimiento de microorganismos nativos del residuo. Este medio de cultivo permitió detectar aislamientos con diferentes capacidades para desarrollar sobre los nutrientes de la cebolla y con distinto comportamiento de acuerdo a la temperatura de incubación. La metodología empleada para la caracterización de los aislamientos permitió identificar las cepas con mejor performance en la degradación aeróbica de las hojas internas de la cebolla. De las cepas identificadas filogenéticamente, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* MB2-62 y *Pseudomonas poae* VE-74, tienen potencial para ser consideradas como inóculos con la finalidad de mejorar la etapa hidrolítica de la digestión anaeróbica. En consecuencia, podrían ser de gran interés biotecnológico.

El método de enriquecimiento diseñado para detectar la actividad celulolítica en anaerobiosis, permitió obtener cultivos mixtos con actividad hidrolítica y seleccionar aquellos con alta capacidad de degradación. La utilización de la catáfila protectora como sustrato en la evaluación de la capacidad hidrolítica, permitió

6. Conclusiones y perspectivas

apreciar la actividad de los cultivos sobre el sustrato natural, evidenciando diferentes estrategias de degradación. Las bacterias nativas del residuo son capaces de realizar la degradación de las catáfilas protectoras, actuando en su mayoría, en consorcios degradadores. Todas las cepas identificadas pertenecían al phylum *Firmicutes*. Particularmente, *Desulfotomaculum guttoideum* es una especie clave en la degradación anaeróbica de cebolla.

En síntesis, los microorganismos nativos del residuo de cebolla poseen la capacidad de degradarlo tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En las dos condiciones de oxígeno, las distintas formas de degradación observadas sugieren que existe biodiversidad en los tipos de enzimas hidrolíticas presentes.

Las características desventajosas del residuo de la producción de cebolla representan un desafío para conducir adecuadamente su biodegradación y lograr el producto deseado. A pesar del contenido de compuestos azufrados de la cebolla, la población de bacterias sulfato reductoras encontradas se corresponde con las detectadas en digestores con otros residuos, por lo tanto no interferirían negativamente en la biometanización. Además, se encontró que la presencia de las sulfato reductoras está asociada a la aparición de patógenos bacterianos en los bulbos. El residuo de cebolla contiene todos los grupos funcionales necesarios para la etapa hidrolítica-acetogénica de la biometanización. Sin embargo, para lograr la producción de metano, se debe incorporar en el reactor otro sustrato que aporte arqueas metanogénicas.

Las variables evaluadas en los distintos experimentos permitieron determinar las condiciones más adecuadas para optimizar la biodegradación anaeróbica del residuo de cebolla y lograr la biometanización. El agregado de una fuente nitrogenada (urea a razón de 10 % del volumen de cebolla) favorece la degradación. Además, al utilizar como inóculo el efluente de biorreactores que ya degradaron el residuo, se incorporan comunidades microbianas degradadoras activas que logran degradar el residuo en un período de 30 días.

Adicionalmente, la incorporación de barro activado, generado tanto con estiércol de vaca como de cerdo, en la misma proporción que el residuo de cebolla en el biorreactor, aporta AM y hace factible la producción de biogás a

6. Conclusiones y perspectivas

partir del residuo de cebolla. Además, logra un efecto tampón en el biorreactor frente al pH ácido del residuo de cebolla. Para conservar los efectos benéficos, es necesario incorporar, en cada carga, las mismas proporciones de barro activado y cebolla.

La temperatura es un factor importante en la biometanización del residuo de cebolla. En condiciones mesofílicas (30-35 °C), la degradación alcanza un mayor grado de digestión del sustrato y produce mayor volumen de biogás. A temperaturas inferiores (18 °C), las características desfavorables de la cebolla generan más rápidamente un desbalance en la degradación provocando el estancamiento del proceso en la fase ácida.

La comunidad de *Eubacteria* que se establece en los biorreactores proviene mayoritariamente del residuo de cebolla, corroborando que las bacterias nativas poseen la capacidad de degradarlo. Además, a partir de la misma mezcla de sustratos se establecen distintas poblaciones dependiendo de la temperatura de digestión, ratificando que la microbiota nativa tiene diferentes capacidades tal como se detectó en el medio de cultivo de cebolla.

Los resultados observados en el marco de la Tesis proveen la base que permitirá mejorar las técnicas que hemos ideado y utilizado, como así también completar los conocimientos que hemos adquirido. Se describen a continuación sugerencias de estudios que permitirán profundizar cada una de las partes de este trabajo.

El aislamiento y la caracterización de las bacterias celulolíticas provenientes de material vegetal en degradación, será de utilidad para identificar y monitorear las comunidades hidrolíticas en los biorreactores y ayudará a definir las condiciones óptimas para lograr un mayor rendimiento en la hidrólisis del sustrato. Sería importante explorar las interacciones de los microorganismos integrantes de los cultivos mixtos degradadores de celulosa obtenidos en esta Tesis y la presencia de diferentes enzimas. Debido a la complejidad del celulosoma, se propone analizar genes de diferentes módulos catalíticos, como los genes de glucósido hidrolasa (*cel5* y *cel48*) que están presentes en una amplia diversidad de bacterias anaeróbicas degradadoras de celulosa. Además, los aislamientos obtenidos podrían

6. Conclusiones y perspectivas

evaluarse en estudios de bioaumentación para mejorar la hidrólisis en los biorreactores.

La falta de conocimiento sobre el metabolismo microbiano involucrado en la digestión anaeróbica, particularmente de residuos no convencionales, suele conducir a un manejo inadecuado de los biorreactores, provocando fallas en su funcionamiento y desalentando la adopción de esta tecnología. La comprensión de la función y actividad de los microorganismos responsables de la biometanización ayudará a resolver los inconvenientes que se presenten y en consecuencia, contribuirá al establecimiento de esta tecnología en nuestro país. Es de suma importancia determinar los factores que estimulan o inhiben a los grupos funcionales dentro del biorreactor en relación a cada sustrato para lograr una adecuada degradación. Para ello se propone estudiar, mediante métodos moleculares, la composición de la comunidad del biorreactor y la presencia de los genes de función de las capacidades fisiológicas de interés (hidrólisis de celulosa, acetogénesis, metanogénesis y sulfato reducción) durante las diferentes etapas de la codigestión. En particular, mediante PCR cuantitativa, se debería estudiar la presencia y dinámica de las arqueas metanogénicas, con especial énfasis en los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* debido a que se ha establecido que la relación entre ellos es importante para monitorear la estabilidad del proceso. Finalmente, se deberá relacionar la estructura y función de las comunidades microbianas con los parámetros físicos y químicos medidos en el reactor (contenido de metano, sulfuro de hidrógeno, pH, ácidos grasos volátiles, amonio y nitrato).

Es importante generar y difundir los conocimientos que permitan la generación de productos útiles, como el biogás, a partir de la conversión de los residuos en recursos. La adopción de este tipo de tecnologías por la sociedad permitirá mitigar los perjuicios ambientales asociados a la actividad antropogénica.

Bibliografía

- Agyeman FO, Tao W (2014) Anaerobic co-digestion of food waste and dairy manure: Effects of food waste particle size and organic loading rate. *Journal of Environmental Management* 133 (0):268-274.
- Ahring B (2003) Perspectives for anaerobic digestion. En: Ahring B, Angelidaki I, de Macario EC *et al.* (eds) *Biomethanation I*, vol 81. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg, págs 1-30.
- Akunna JC, Bizeau C, Moletta R (1992) Denitrification in anaerobic digesters: Possibilities and influence of wastewater COD/N-NOX ratio. *Environmental Technology* 13 (9):825-836.
- Albertson ML, Pruden A, Oliver RT (2006) Enhanced anaerobic digestion of biomass waste for optimized production of renewable energy and solids for compost. *International Congress Series* 1293:221-229.
- Ali Shah F, Mahmood Q, Maroof Shah M, Pervez A, Ahmad Asad S (2014) Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. *The Scientific World Journal* 2014:21.
- Alvarez R, Lidén G (2009) Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama, cow and sheep manure for improved methane production. *Biomass and Bioenergy* 33 (3):527-533.
- Amann R, Ludwig W, Schleifer K (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59 (1):143-169.
- Amaral JA, Knowles R (1994) Methane metabolism in a temperate swamp. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (11):3945-3951.
- Ancasi EG, Carrillo L, Benítez Ahrendts MR (2006) Mohos y levaduras en agua envasada y bebidas sin alcohol. *Revista Argentina de Microbiología* 38 (2):93-96.
- Andrén O, Bengtsson J, Clarholm M (1995) Biodiversity and species redundancy among litter decomposers. En: Collins HP, Robertson GP, Klug MJ (eds) *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*, vol 63. Developments in Plant and Soil Sciences. Springer Netherlands, págs 141-151.

Bibliografía

- Angelidaki I, Ahring BK (2000) Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. *Water Science & Technology* 41 (3):189-194.
- APHA (1992) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18 ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Archer DB, Thompson LA (1987) Energy production through the treatment of wastes by micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 63:59s-70s.
- Asaka O, Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (11):4081-4085.
- Asankulova A (2008) Analysis of factors influencing biogas release. *Applied Solar Energy* 44 (3):229-231.
- Baldasano JM, Soriano C (2000) Emission of greenhouse gases from anaerobic digestion processes: comparison with other municipal solid waste treatments. *Water Science & Technology* 41 (3):275-282.
- Banihani Q, Sierra-Alvarez R, Field J (2009) Nitrate and nitrite inhibition of methanogenesis during denitrification in granular biofilms and digested domestic sludges. *Biodegradation* 20 (6):801-812.
- Barton LL, Fauque GD (2009) Chapter 2 Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. En: Allen I, Laskin SS, Geoffrey MG (eds) *Advances in Applied Microbiology*, vol 68. Academic Press, págs 41-98.
- Bayer E, Shoham Y, Lamed R (2013) Lignocellulose-decomposing bacteria and their enzyme systems. En: Rosenberg E, DeLong E, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds) *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, págs 215-266.
- Bayer EA, Chanzy H, Lamed R, Shoham Y (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology* 8 (5):548-557.
- Becker CA (1997) Producción de cebolla en el sur de la provincia de Buenos Aires. En: Galmarini CR (ed) *Manual del cultivo de la cebolla*. INTA Centro Regional Cuyo, San Juan, pág 128.
- Beffa T, Blanc M, Marilley L, Fischer JL, Lyon P-F, Aragno M (1996) Taxonomic and metabolic microbial diversity during composting. En: de Bertoldi M, Sequi P, Lemmes B, Papi T (eds) *The Science of Composting*. vol 1. Chapman & Hall, London, págs 149-161.
- Béguin P (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Review of Microbiology* 44 (1):219-248.
- Béguin P, Aubert J-P (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* 13 (1):25-58.
- Behrendt U, Ulrich A, Schumann P (2003) Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (5):1461-1469.
- Benítez V, Mollá E, Martín-Cabrejas M, Aguilera Y, López-Andréu F, Cools K, Terry L, Esteban R (2011) Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): Dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition* 66 (1):48-57.

Bibliografía

- Bohn I, Björnsson L, Mattiasson B (2007a) Effect of temperature decrease on the microbial population and process performance of a mesophilic anaerobic bioreactor. *Environmental Technology* 28 (8):943-952.
- Bohn I, Björnsson L, Mattiasson B (2007b) The energy balance in farm scale anaerobic digestion of crop residues at 11–37 °C. *Process Biochemistry* 42 (1):57-64.
- Bolarinwa OA, Ugoji EO (2010) Production of biogas from starchy wastes. *J Sci Res Dev* 12:34 – 45.
- Braun R (2007) Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. En: Ranalli P (ed) *Improvement of crop plants for industrial end uses*. Springer Netherlands, págs 335-416.
- Braun R, Drog B, Bochmann G, Weiß S, Kirchmayr R (2010) Recent developments in bio-energy recovery through fermentation. En: Insam H, Franke-Whittle I, Goberna M (eds) *Microbes at Work*. Springer Berlin Heidelberg, págs 35-58.
- Braun R, Wellinger A (2003) Potential of co-digestion. IEA Bioenergy Report under Task 37 - Energy from Biogas and Landfill Gas.
- Brocklehurst TF, Lund BM (1981) Properties of Pseudomonads causing spoilage of vegetables stored at low temperature. *Journal of Applied Bacteriology* 50 (2):259-266.
- Callaghan FJ, Wase DAJ, Thayanithy K, Forster CF (1999) Co-digestion of waste organic solids: batch studies. *Bioresource Technology* 67 (2):117-122.
- Cardinali-Rezende J, Moraes AM, Colturato LDB, Carneiro E, Marriel I, Chartone-Souza E, Nascimento AA (2011) Phylogenetic and physiological characterization of organic waste-degrading bacterial communities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (2):245-252.
- Cardoso C, Laurent G, Rodríguez RA, Miglierina AM, Minoldo G, Dagna N, Orden L Potentially crop-N supply from different organic amendments to a soil from the low valley of the Río Negro province, Argentina. En: Ortega Blu R, Ospina S. P, Martínez S. MM (eds) IInd International symposium on organic matter management and compost use in horticulture, Santiago, Chile, 2015. Acta Hort., ISHS, pp 193-198.
- Carver SM, Nelson MC, Lepistö R, Yu Z, Tuovinen OH (2012) Hydrogen and volatile fatty acid production during fermentation of cellulosic substrates by a thermophilic consortium at 50 and 60 °C. *Bioresource Technology* 104 (0):424-431.
- Cirne DG, Lehtomäki A, Björnsson L, Blackall LL (2007) Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology* 103 (3):516-527.
- Clarens M, Bernet N, Delgenès JP, Moletta R (1998) Effects of nitrogen oxides and denitrification by *Pseudomonas stutzeri* on acetotrophic methanogenesis by *Methanosarcina mazei*. *FEMS Microbiology Ecology* 25 (3):271-276.
- Conn KE, Lutton JS, Rosenberger SA (2012) *Onion disease guide: a practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors*. Seminis Vegetable Seeds, Inc., EEUU.

- Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M (2007) Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology* 18 (12):609-625.
- Chachkhiani M, Dabert P, Abzianidze T, Partskhaladze G, Tsiklauri L, Dudaauri T, Godon JJ (2004) 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology* 93 (3):227-232.
- Chakraborty N, Sarkar GM, Lahiri SC (2002) Biomethanation of plant materials and agricultural residues using dung samples as wild population of microbes and also with isolated methanogens. *The Environmentalist* 22 (2):173-182.
- Chamkha M, Garcia JL, Labat M (2001) Metabolism of cinnamic acids by some Clostridiales and emendation of the descriptions of *Clostridium aerotolerans*, *Clostridium celerecrescens* and *Clostridium xylanolyticum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51 (6):2105-2111.
- Chanakya HN, Srikumar KG, Anand V, Modak J, Jagadish KS (1999) Fermentation properties of agro-residues, leaf biomass and urban market garbage in a solid phase biogas fermenter. *Biomass and Bioenergy* 16 (6):417-429.
- Chandra R, Takeuchi H, Hasegawa T (2012) Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (3):1462-1476.
- Chartrain M, Zeikus JG (1986) Microbial ecophysiology of whey biomethanation: Characterization of bacterial trophic populations and prevalent species in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (1):188-196.
- Chen J, Weimer PJ (2001) Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. *Microbiology* 147 (1):21-30.
- Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS (2008) Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99 (10):4044-4064.
- Chroni C, Kyriacou A, Georgaki I, Manios T, Kotsou M, Lasaridi K (2009) Microbial characterization during composting of biowaste. *Waste Management* 29 (5):1520-1525.
- Chu C-F, Ebie Y, Xu K-Q, Li Y-Y, Inamori Y (2010) Characterization of microbial community in the two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (15):8253-8261.
- Chynoweth DP, Owens JM, Legrand R (2001) Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy* 22 (1-3):1-8.
- Chynoweth DP, Wilkie AC, Owens JM (1999) Anaerobic Treatment of Piggery Slurry. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 12 (4):607-628.
- Dar S, Kleerebezem R, Stams A, Kuenen J, Muyzer G (2008) Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (6):1045-1055.
- Desvaux M (2005) *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (4):741-764.
- Deublein D, Steinhauser A (2008) *Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Bibliografía

- Duran M, Tepe N, Yurtsever D, Punzi V, Bruno C, Mehta R (2006) Bioaugmenting anaerobic digestion of biosolids with selected strains of *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Actinomyces* species for increased methanogenesis and odor control. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73 (4):960-966.
- El-Mashad HM, Zhang R (2010) Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste. *Bioresource Technology* 101 (11):4021-4028.
- Eyers L, Agathos S, El Fantroussi S (2004) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) as a fingerprinting tool for analyzing microbial communities in contaminated environments. En: Walker J, Spencer JT, Ragout de Spencer A (eds) *Environmental Microbiology*, vol 16. Methods in Biotechnology. Humana Press, págs 407-417.
- FAO (2013) FAOSTAT. <http://www.fao.org/statistics/en/>
- Ferreira-Leitao V, Gottschalk LMF, Ferrara MA, Nepomuceno AL, Molinari HBC, Bon EPS (2010) Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. *Waste and Biomass Valorization* 1 (1):65-76.
- Ferrer P, Cambra-López M, Cerisuelo A, Peñaranda DS, Moset V (2014) The use of agricultural substrates to improve methane yield in anaerobic co-digestion with pig slurry: Effect of substrate type and inclusion level. *Waste Management* 34 (1):196-203.
- Fliegerová K, Mrázek J, Kajan M, Podmirseg SM, Insam H (2012) The effect of maize silage as co-substrate for swine manure on the bacterial community structure in biogas plants. *Folia Microbiologica* 57 (4):281-284.
- Fogarty AM, Tuovinen OH (1991) Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 55 (2):225-233.
- Fondevila M, Dehority BA (1994) Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly in coculture or added sequentially. *Journal of Applied Bacteriology* 77 (5):541-548.
- Fondevila M, Dehority BA (1996) Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. *Journal of animal science* 74 (3):678-684.
- Franke-Whittle I, Knapp B, Fuchs J, Kaufmann R, Insam H (2009) Application of COMPOCHIP microarray to investigate the bacterial communities of different composts. *Microbial Ecology* 57 (3):510-521.
- Fry LJ, Merrill R (1973) *Methane digesters for fuel gas and fertilizer. With complete instructions for two working models*. Newsletter of the New Alchemy Institute, vol 3, 8va ed. The New Alchemy Institute Santa Barbara, California.
- Funbapa (2012). Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica. <http://www.funbapa.org.ar/>.
- Galmarini CR (1997) Producción y mercado de la cebolla Argentina. En: Galmarini CR (ed) *Manual del cultivo de la cebolla*. INTA Centro Regional Cuyo, San Juan, pág 128.
- Galmarini CR, Gaviola J, Pereyra M, Burzichelli S, Ruiz AM (2003) Breve caracterización de la cadena agroalimentaria de cebolla en la Argentina. *IDIA XXI* 4:73-76.

Bibliografía

- Gerardi MH (2003) *The microbiology of anaerobic digesters*. Wastewater microbiology series. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Goberna M, Insam H, Pascual JA, Sánchez J (2005) Storage effects on the community level physiological profiles of Mediterranean forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 37 (1):173-178.
- Gogotova GI, Vainshtein MB (1983) The sporogenous sulfate reducing bacterium *Desulfotomaculum guttoideum* sp. nov. *Mikrobiologiya* 52:789-793.
- Gómez-Brandón M, Fernández-Delgado Juárez M, Domínguez J, Insam H (2013) Animal manures: Recycling and management technologies. En: Matovic MD (ed) *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. InTech, pág 460.
- Goodfellow M (2012) Phylum XXVI. *Actinobacteria* phyl. nov. En: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J *et al.* (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer New York, págs 33-2028.
- Gou C, Yang Z, Huang J, Wang H, Xu H, Wang L (2014) Effects of temperature and organic loading rate on the performance and microbial community of anaerobic co-digestion of waste activated sludge and food waste. *Chemosphere* 105 (0):146-151.
- Green SJ, Leigh MB, Neufeld JD (2010) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. En: Timmis K (ed) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, págs 4137-4158.
- Griffin ME, McMahon KD, Mackie RI, Raskin L (1998) Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnology and Bioengineering* 57 (3):342-355.
- Griffiths G, Trueman L, Crowther T, Thomas B, Smith B (2002) Onions—A global benefit to health. *Phytotherapy Research* 16 (7):603-615.
- Gürtler V, Stanisich VA (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142 (1):3-16.
- Haruta S, Cui Z, Huang Z, Li M, Ishii M, Igarashi Y (2002) Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (4):529-534.
- Hendriksen H, Ahring B (1996) Combined removal of nitrate and carbon in granular sludge: Substrate competition and activities. *Antonie van Leeuwenhoek* 69 (1):33-39.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8):3233-3241.
- Hill DT, Taylor SE, Grift TE (2001) Simulation of low temperature anaerobic digestion of dairy and swine manure. *Bioresource Technology* 78 (2):127-131.
- Hines ME, Visscher PT, Teske AP, Devereux R (2007) Sulfur cycling. En: Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, Lipson DA, Mills AL, Stetzenbach LD (eds) *Manual of Environmental Microbiology*. 3ra ed. ASM Press, Washington, D.C., pág 1316.
- Hintze J (2013) NCSS 9. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.
- Hirasawa JS, Sarti A, Del Aguila NKS, Varesche MBA (2008) Application of molecular techniques to evaluate the methanogenic archaea and anaerobic bacteria in

- the presence of oxygen with different COD:Sulfate ratios in a UASB reactor. *Anaerobe* 14 (4):209-218.
- Hofman-Bang J, Zheng D, Westermann P, Ahring BK, Raskin L (2003) Molecular ecology of anaerobic reactor systems. En: Ahring B, Angelidaki I, de Macario EC *et al.* (eds) *Biomethanation I*, vol 81. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg, págs 151-203.
- Holt JG (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9na ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Horiuchi J-I, Kanno T, Kobayashi M (2000) Effective onion vinegar production by a two-step fermentation system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90 (3):289-293.
- Huang X, Madan A (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9 (9):868-877.
- Insam H, Franke-Whittle I, Goberna M (2010) Microbes in aerobic and anaerobic waste treatment. En: Insam H, Franke-Whittle I, Goberna M (eds) *Microbes at Work*. Springer Berlin Heidelberg, págs 1-34.
- Insam H, Riddech N, Klammer S (2002) *Microbiology of Composting*. 1ra ed. Springer-Verlag Berlin.
- Ishii K, Takii S (2003) Comparison of microbial communities in four different composting processes as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology* 95 (1):109-119.
- Ishii Si, Shimoyama T, Hotta Y, Watanabe K (2008) Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell. *BMC Microbiology* 8 (1):1-12.
- Jaime L, Martín-Cabrejas MA, Mollá E, López-Andréu FJ, Esteban RM (2001) Effect of storage on fructan and fructooligosaccharide of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2):982-988.
- Jaime L, Mollá E, Fernández A, Martín-Cabrejas MA, López-Andréu FJ, Esteban RM (2002) Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (1):122-128.
- Jay J (2000a) Fruit and vegetable products: whole, fresh-cut, and fermented. En: Jay J (ed) *Modern Food Microbiology*. Aspen Food Science Text Series. Springer US, págs 131-161.
- Jay J (2000b) Low-temperature food preservation and characteristics of psychrotrophic microorganisms. En: Jay J (ed) *Modern Food Microbiology*. Aspen Food Science Text Series. Springer US, págs 323-339.
- Juottonen H, Galand PE, Yrjälä K (2006) Detection of methanogenic *Archaea* in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene. *Research in Microbiology* 157 (10):914-921.
- Kato S, Haruta S, Cui ZJ, Ishii M, Igarashi Y (2004) Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 51 (1):133-142.
- Kato S, Haruta S, Cui ZJ, Ishii M, Igarashi Y (2005) Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11):7099-7106.

Bibliografía

- Kirchmayr R, Resch C, Mayer M, Prechtel S, Faulstich M, Braun R, Wimmer J (2007) Anaerobic degradation of animal by-products. En: Oreopoulou V, Russ W (eds) *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. Springer US, págs 159-191.
- Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4):1328-1333.
- Klüber H, Conrad R (1998) Effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology* 25 (3):301-318.
- Koeck DE, Pechtl A, Zverlov VV, Schwarz WH (2014) Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 29:171-183.
- Koumoutsis A, Chen X-H, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss R (2004) Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology* 186 (4):1084-1096.
- Krause L, Diaz NN, Edwards RA, Gartemann K-H, Krömeke H, Neuweiger H, Pühler A, Runte KJ, Schlüter A, Stoye J, Szczepanowski R, Tauch A, Goesmann A (2008) Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of Biotechnology* 136 (1-2):91-101.
- Kudo H, Cheng KJ, Costerton JW (1987) Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the *in vitro* degradation of straw cellulose. *Canadian Journal of Microbiology* 33 (3):244-248.
- Kutzner HJ (2008) Microbiology of composting. En: Rehm H-J, Reed G (eds) *Biotechnology Set*. 2da ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, págs 35-100.
- Leadbetter JR (2003) Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Current Opinion in Microbiology* 6 (3):274-281.
- Lee D-Y, Xu K-Q, Kobayashi T, Li Y-Y, Inamori Y (2014) Effect of organic loading rate on continuous hydrogen production from food waste in submerged anaerobic membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy* 39 (30):16863-16871.
- Lee Y-J, Kim B-K, Lee B-H, Jo K-I, Lee N-K, Chung C-H, Lee Y-C, Lee J-W (2008) Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology* 99 (2):378-386.
- Lee Z-K, Li S-L, Kuo P-C, Chen IC, Tien Y-M, Huang Y-J, Chuang C-P, Wong S-C, Cheng S-S (2010) Thermophilic bio-energy process study on hydrogen fermentation with vegetable kitchen waste. *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (24):13458-13466.
- Lehtomäki A, Huttunen S, Rintala JA (2007) Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio. *Resources, Conservation and Recycling* 51 (3):591-609.

Bibliografía

- Lehtomäki A, Viinikainen TA, Rintala JA (2008) Screening boreal energy crops and crop residues for methane biofuel production. *Biomass and Bioenergy* 32 (6):541-550.
- Leschine SB (1995) Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Review of Microbiology* 49 (1):399-426.
- Levén L, Eriksson ARB, Schnürer A (2007) Effect of process temperature on bacterial and archaeal communities in two methanogenic bioreactors treating organic household waste. *FEMS Microbiology Ecology* 59 (3):683-693.
- Li S-L, Whang L-M, Chao Y-C, Wang Y-H, Wang Y-F, Hsiao C-J, Tseng IC, Bai M-D, Cheng S-S (2010) Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (1):61-70.
- Li Y-Y, Lam S, Fang HHP (1996) Interactions between methanogenic, sulfate-reducing and syntrophic acetogenic bacteria in the anaerobic degradation of benzoate. *Water Research* 30 (7):1555-1562.
- Lindstrom JE, Barry RP, Braddock JF (1998) Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. *Soil Biology & Biochemistry* 30 (2):231-239.
- Lü F, Hao L, Zhu M, Shao L, He P (2012) Initiating methanogenesis of vegetable waste at low inoculum-to-substrate ratio: Importance of spatial separation. *Bioresource Technology* 105 (0):169-173.
- Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3):506-577.
- Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP (2010) *Brock Biology of Microorganisms*. 13 ed. Pearson Education, Inc., San Francisco, CA.
- Mairosser A, Rinland ME, Bellacomo C, Caracotche V, García F, Baffoni P, Martinez E Producción de metano en co-digestión de residuos de cebolla y estiércol vacuno en el Valle Bonaerense del Río Colorado (VBRC). En: Valdez J, Alessandro MS, Portela JA (eds) XXXVII Congreso Argentino de Horticultura, Mendoza, Argentina, 23 al 26 de Septiembre 2014. Asociación Argentina de Horticultura (ASAHO), p 52.
- Mairosser A, Rinland ME, García D, Bellacomo C, Caracotche V, García F, Baffoni P, Martinez E, Gómez MA Producción de metano mediante la utilización de residuos de cebolla en el Valle Bonaerense del Río Colorado (VBRC). XXXVI Congreso Argentino de Horticultura, Tucumán, Argentina, 24 al 26 de Septiembre 2013. Asociación Argentina de Horticultura (ASAHO), p 421.
- Mairosser, A.; Rinland, E.; Orden, L.; Bellacomo, C.; Caracotche, V.; García, F.; Dunel, L.; Storniolo, R. Evaluación de la codigestión de residuos de cebolla con diferentes proporciones de barro activado para la producción de biogás en el Valle Bonaerense del río Colorado. XXXVIII Congreso Argentino de Horticultura, Mendoza, Argentina, 5 al 8 de Octubre 2015. Asociación Argentina de Horticultura (ASAHO), p 61.

Bibliografía

- Martínez RM, Miglierina AM, Luna M, van Konijnenburg A, Pellejero G (2008) Evaluación del compostaje de los residuos del procesamiento de la cebolla. *Pilquen X* (9):1-8.
- Mata-Alvarez J, Macé S, Llabrés P (2000) Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology* 74 (1):3-16.
- McKeown RM, Hughes D, Collins G, Mahony T, O'Flaherty V (2012) Low-temperature anaerobic digestion for wastewater treatment. *Current Opinion in Biotechnology* 23 (3):444-451.
- McKeown RM, Scully C, Mahony T, Collins G, O'Flaherty V (2009) Long-term (1243 days), low-temperature (4-15 °C), anaerobic biotreatment of acidified wastewaters: Bioprocess performance and physiological characteristics. *Water Research* 43 (6):1611-1620.
- Medina J (2008) *Cebolla: guía técnica*. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), Santo Domingo, DO.
- Miglierina AM, Ayastuy ME, Rodríguez RA, Fernández JA, Van Konijnenburg A Alternative materials as substrates for seedlings production. En: Pascual JA, Pérez-Alfocea F (eds) Vth International symposium on seed, transplant and stand establishment of horticultural crops, Murcia, España, 2011. Acta Hort., ISHS, pp 211-218.
- Miron J, Ben-Ghedalia D (1993) Digestion of structural polysaccharides of *Panicum* and vetch hays by the rumen bacterial strains *Fibrobacter succinogenes* BL2 and *Butyrivibrio fibrisolvens* D1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39 (6):756-759.
- Misi SN, Forster CF (2001) Batch co-digestion of multi-component agro-wastes. *Bioresource Technology* 80 (1):19-28.
- Mitchell WJ, Albasheri KA, Yazdanian M (1995) Factors affecting utilization of carbohydrates by clostridia. *FEMS Microbiology Reviews* 17 (3):317-329.
- Miyazaki K, Irbis C, Takada J, Matsuura A (2008) An ability of isolated strains to efficiently cooperate in ethanolic fermentation of agricultural plant refuse under initially aerobic thermophilic conditions: Oxygen deletion process appended to consolidated bioprocessing (CBP). *Bioresource Technology* 99 (6):1768-1775.
- Mizrahi I (2013) Rumen Symbioses. En: Rosenberg E, DeLong E, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds) *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, págs 533-544.
- Mizuno O, Li YY, Noike T (1998) The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. *Water Research* 32 (5):1626-1634.
- Møller HB, Sommer SG, Ahring BK (2004) Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy* 26 (5):485-495.
- Mongkolthananuruk W, Dharmsthiti S (2002) Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50 (2):101-105.
- Morvan B, Rieu-Lesme F, Fonty G, Gouet P (1996) *In vitro* interactions between rumen H₂-producing cellulolytic microorganisms and H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria. *Anaerobe* 2 (3):175-180.

Bibliografía

- Müller H, Zachow C, Alavi M, Tilcher R, Krempf PM, Thallinger GG, Berg G (2013) Complete genome sequence of the sugar beet endophyte *Pseudomonas poae* RE*1-1-14, a disease-suppressive bacterium. *Genome Announcements* 1 (2):1-2.
- Murray WD (1986) Symbiotic relationship of *Bacteroides cellulosolvens* and *Clostridium saccharolyticum* in cellulose fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (4):710-714.
- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, SchÄfer H, Wawer C (2004) Section 3 update: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. En: Kowalchuk GA, Bruijn FJ, Head IM, Akkermans AD, Elsas JD (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Springer Netherlands, págs 2645-2671.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (3):695-700.
- Muyzer G, Stams AJM (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6 (6):441-454.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54 (4):655-670.
- Noike T, Endo G, Chang J-E, Yaguchi J-I, Matsumoto J-I (1985) Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering* 27 (10):1482-1489.
- O'Flaherty V, Collins G, Mahony T (2006) The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 5 (1):39-55.
- O'Reilly C, Colleran E (2005) Toxicity of nitrite toward mesophilic and thermophilic sulphate-reducing, methanogenic and syntrophic populations in anaerobic sludge. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32 (2):46-52.
- Obi SKC, Umezurike GM (1981) Pectic enzyme activities of bacteria associated with rotted onions (*Allium cepa*). *Applied and Environmental Microbiology* 42 (4):585-589.
- Oremland RS, Marsh LM, Polcin S (1982) Methane production and simultaneous sulphate reduction in anoxic, salt marsh sediments. *Nature* 296 (5853):143-145.
- Palop M. LL., Valles S., Piñaga F., Flors A. (1989). Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium celerecrescens* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39 (1):68-71.
- Pellejero G, Miglierina AM, Aschkar G, Jiménez Ballesta R (2015) Physical characterisation of three composts mixed with onion wastes. *Journal of Global Agriculture and Ecology* 2 (1):36-41.
- Pender S, Toomey M, Carton M, Eardly D, Patching JW, Colleran E, O'Flaherty V (2004) Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors. *Water Research* 38 (3):619-630.

Bibliografía

- Percheron G, Bernet N, Moletta R (1999) Interactions between methanogenic and nitrate reducing bacteria during the anaerobic digestion of an industrial sulfate rich wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* 29 (4):341-350.
- Phae C-G, Sasaki M, Shoda M, Kubota H (1990) Characteristics of *Bacillus subtilis* isolated from composts suppressing phytopathogenic microorganisms. *Soil Science and Plant Nutrition* 36 (4):575-586.
- Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, Hallet S, Germon JC (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (12):6121-6128.
- Ponce-Noyola T, de la Torre M (1993) Interactions in a mixed culture composed of *Cellulomonas flavigena* and *Xanthomonas* sp. growing in continuous culture on sugar cane bagasse. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40 (4):531-534.
- Priest FG, Goodfellow M, Shute LA, Berkeley RCW (1987) *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37 (1):69-71.
- Rabus R, Hansen T, Widdel F (2013) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. En: Rosenberg E, DeLong E, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds) *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, págs 309-404.
- Ren Z, Ward TE, Logan BE, Regan JM (2007) Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic *Clostridium* species. *Journal of Applied Microbiology* 103 (6):2258-2266.
- Ricca DM, Ziemer CJ, Kerr BJ (2010) Changes in bacterial communities from swine feces during continuous culture with starch. *Anaerobe* 16 (5):516-521.
- Rodríguez-Martínez J, Garza GY, Aguilera CA, Martínez ASY, Sosa SGJ (2005) Influence of nitrate and sulfate on the anaerobic treatment of pharmaceutical wastewater. *Engineering in Life Sciences* 5 (6):568-573.
- Rose P, Whiteman M, Moore PK, Zhu YZ (2005) Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Natural Product Reports* 22 (3):351-368.
- Rowe R, Todd R, Waide J (1977) Microtechnique for most-probable-number analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 33 (3):675-680.
- Ryckeboer J, Mergaert J, Coosemans J, Deprins K, Swings J (2003a) Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *Journal of Applied Microbiology* 94:127-137.
- Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, De Clercq D, Coosemans J, Insam H, Swings J (2003b) A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology* 53 (4):349-410.
- Sabry SA (1992) Microbial degradation of shrimp-shell waste. *Journal of Basic Microbiology* 32 (2):107-111.
- Schievano A, D'Imporzano G, Adani F (2009) Substituting energy crops with organic wastes and agro-industrial residues for biogas production. *Journal of Environmental Management* 90 (8):2537-2541.
- Schleifer K-H (2009) Phylum XIII. *Firmicutes* Gibbons and Murray 1978, 5 (*Firmacutes* [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). En: Vos P, Garrity GM, Jones D *et al.*

- (eds) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer New York, págs 19-1317.
- Schnürer A, Jarvis Å (2010) *Microbiological handbook for biogas plants*. Swedish Waste Management, Malmö.
- Schuchardt F (2005) Composting of organic waste. En: Jördening H-J, Winter J (eds) *Environmental Biotechnology. Concepts and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, págs 333-354.
- Sekiguchi Y, Kamagata Y, Syutsubo K, Ohashi A, Harada H, Nakamura K (1998) Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 144 (9):2655-2665.
- Sharma VK, Caudelli M, Fortuna F, Cornacchia G (1997) Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: Review. *Energy Conversion and Management* 38 (5):453-478.
- Shilev S, Naydenov M, Vancheva V, Aladjadjian A (2007) Composting of food and agricultural wastes. En: Oreopoulou V, Russ W (eds) *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry*. Springer US, New York, USA, págs 283-301.
- Singh P, Suman A, Tiwari P, Arya N, Gaur A, Shrivastava AK (2008) Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24 (5):667-673.
- Singleton P (2004) *Bacterias en biología, biotecnología y medicina*. 5ta ed. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España.
- Sonakya V, Raizada N, Kalia V (2001) Microbial and enzymatic improvement of anaerobic digestion of waste biomass. *Biotechnological Letters* 23 (18):1463-1466.
- Sowers KR (2009) Methanogenesis. En: Schaechter M (ed) *Encyclopedia of Microbiology*. 3ra ed. Academic Press, Oxford, págs 265-286.
- St-Pierre B, Wright A-D (2014) Comparative metagenomic analysis of bacterial populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (6):2709-2717.
- Stackebrandt E, Sproer C, Rainey FA, Burghardt J, Páuker O, Hippe H (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: Evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 47 (4):1134-1139.
- Staley TE, Griffin JB (1981) Simultaneous enumeration of denitrifying and nitrate reducing bacteria in soil by a microtiter most-probable-number (MPN) procedure. *Soil Biology and Biochemistry* 13 (5):385-388.
- Stams A, Elferink S, Westermann P (2003) Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria. En: Ahring B, Angelidaki I, de Macario E *et al.* (eds) *Biomethanation I*, vol 81. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer Berlin - Heidelberg, págs 31-56.

Bibliografía

- Sudha Rani K, Seenayya G (1999) High ethanol tolerance of new isolates of *Clostridium thermocellum* strains SS21 and SS22. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:173-178.
- Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA (2005) *Principles and applications of soil microbiology*. 2da ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12):2725-2729.
- Utkhede RS, Rahe JE (1983) Effect of *Bacillus subtilis* on growth and protection of onion against White Rot. *Journal of Phytopathology* 106 (3):199-203.
- Vaneekhaute C, Meers E, Michels E, Ghekiere G, Accoe F, Tack FMG (2013) Closing the nutrient cycle by using bio-digestion waste derivatives as synthetic fertilizer substitutes: A field experiment. *Biomass and Bioenergy* 55 (0):175-189.
- Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D (2007) Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (3):495-548.
- Verniere C, Pruvost O, Civerolo EL, Gambin O, Jacquemoud-Collet JP, Luisetti J (1993) Evaluation of the Biolog substrate utilization system to identify and assess metabolic variation among strains of *Xanthomonas campestris* pv. Citri. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1):243-249.
- Vester F, Ingvorsen K (1998) Improved most-probable-number method to detect sulfate-reducing bacteria with natural media and a radiotracer. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (5):1700-1707.
- Volokita M, Abeliovich A, Soares MIM (2000) News & notes: Detection of microorganisms with overall cellulolytic activity. *Current Microbiology* 40 (2):135-136.
- Wagner AO, Malin C, Lins P, Illmer P (2011) Effects of various fatty acid amendments on a microbial digester community in batch culture. *Waste Management* 31 (3):431-437.
- Wagner M, Loy A, Klein M, Lee N, Ramsing NB, Stahl DA, Friedrich MW (2005) Functional marker genes for identification of sulfate reducing prokaryotes. En: Jared RL (ed) *Methods in Enzymology*, vol 397. Academic Press, págs 469-489.
- Wagner M, Roger AJ, Flax JL, Brusseau GA, Stahl DA (1998) Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of Bacteriology* 180 (11):2975-2982.
- Wan S, Sun L, Douieb Y, Sun J, Luo W (2013) Anaerobic digestion of municipal solid waste composed of food waste, wastepaper, and plastic in a single-stage system: Performance and microbial community structure characterization. *Bioresource Technology* 146 (0):619-627.
- Wang P, Li T, Hu A, Wei Y, Guo W, Jiao N, Zhang C (2010) Community structure of *Archaea* from deep-sea sediments of the South China sea. *Microbial Ecology* 60 (4):796-806.

Bibliografía

- Warade SD, Kadam SS (2004) La cebolla. En: Salunkhe DK (ed) *Tratado de ciencia y tecnología de las hortalizas*. Acribia S.A., Zaragoza, España, pág 739.
- Weon H-Y, Kim B-Y, Kim J-S, Lee S-Y, Cho Y-H, Go S-J, Hong S-B, Im W-T, Kwon S-W (2006) *Pseudoxanthomonas suwonensis* sp. nov., isolated from cotton waste composts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (3):659-662.
- Westermann P, Ahring BK (1987) Dynamics of methane production, sulfate reduction and denitrification in a permanently waterlogged alder swamp. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (10):2554-2559.
- Wieser M, Denner EBM, Kämpfer P, Schumann P, Tindall B, Steiner U, Vybiral D, Lubitz W, Maszenan AM, Patel BKC, Seviour RJ, Radax C, Busse H-J (2002) Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (2):629-637.
- Wirth R, Kovacs E, Maroti G, Bagi Z, Rakhely G, Kovacs K (2012) Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnology for Biofuels* 5 (1):41.
- Wu X, Yao W, Zhu J, Miller C (2010) Biogas and CH₄ productivity by co-digesting swine manure with three crop residues as an external carbon source. *Bioresource Technology* 101 (11):4042-4047.
- Wuhrmann K (1982) Ecology of methanogenic systems in nature. En: Mislin H, Bachofen R (eds) *New Trends in Research and Utilization of Solar Energy through Biological Systems*, vol 43. EXS 43: Experientia Supplementum. Birkhäuser Basel, págs 121-126.
- Xu F, Shi J, Lv W, Yu Z, Li Y (2013) Comparison of different liquid anaerobic digestion effluents as inocula and nitrogen sources for solid-state batch anaerobic digestion of corn stover. *Waste Management* 33 (1):26-32.
- Xu K, Liu H, Du G, Chen J (2009) Real-time PCR assays targeting formyltetrahydrofolate synthetase gene to enumerate acetogens in natural and engineered environments. *Anaerobe* 15 (5):204-213.
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan TR, Kohli S, Rana V (2004) Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques—a review. *Bioresource Technology* 95 (1):1-10.
- Yang B, Dai Z, Ding S-Y, Wyman CE (2011) Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* 2 (4):421-450.
- Yutin N, Galperin MY (2013) A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology* 15 (10):2631-2641.
- Zabaloy M, Gómez M (2005) Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biology and Fertility of Soils* 42 (2):83-88.
- Zabaloy MC (2009) *Evaluación integrada del impacto de herbicidas sobre las comunidades microbianas de suelos agrícolas*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Bibliografía

- Zaid AM, Bonasera JM, Beer SV (2012) OEM—A new medium for rapid isolation of onion-pathogenic and onion-associated bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 91 (3):520-526.
- Zhang C, Xiao G, Peng L, Su H, Tan T (2013) The anaerobic co-digestion of food waste and cattle manure. *Bioresource Technology* 129 (0):170-176.
- Ziganshin A, Liebetrau J, Pröter J, Kleinsteuber S (2013) Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (11):5161-5174.
- Zohri A-N, Abdel-Gawad K, Saber S (1995) Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiological Research* 150 (2):167-172.
- Zverlov V, Köck D, Schwarz W (2015) The role of cellulose-hydrolyzing bacteria in the production of biogas from plant biomass. En: Kamm B (ed) *Microorganisms in Biorefineries*, vol 26. Microbiology Monographs. Springer Berlin Heidelberg, págs 335-361.
- Zverlov VV, Hiegl W, Köck DE, Kellermann J, Köllmeier T, Schwarz WH (2010) Hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic degradation of plant biomass. *Engineering in Life Sciences* 10 (6):528-536.
- Zverlov VV, Hiegl W, Köck DE, Kellermann J, Schwarz WH (2009) Prevalence and role of hydrolytic bacteria in mesophilic and thermophilic biogas reactors. *Internationale Wissenschaftstagung Biogas Science* Band 2:267-282.
- Zverlov VV, Schwarz WH (2008) Bacterial cellulose hydrolysis in anaerobic environmental subsystems - *Clostridium thermocellum* and *Clostridium stercorarium*, thermophilic plant-fiber degraders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125 (1):298-307.

Anexos

Anexo I – Medios de cultivo

Medio de cultivo	Composición	g/l AD
Caldo Nitrato	KNO ₃	1
	Caldo nutritivo	8
Medio mínimo	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
	K ₂ HPO ₄	0,5
	KCl	0,25
	NH ₄ H ₂ PO ₄	1,25
MCA (Caldo)	KH ₂ PO ₄	1,5
	Urea	2
	MgSO ₄	0,8
	CaCl ₂	0,15
	Citrato de sodio	3,5
	K ₂ HPO ₄	2
	Extracto de levadura	0,5
	Cisteína HCl	0,15
	Resazurina	0,002
MCA (Agar)	Agar (+ Caldo MCA)	15
Postgate B	KH ₂ PO ₄	0,5
	NH ₄ Cl	1
	CaSO ₄	1
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2
	Sodio acetato	3,5
	Extracto de levadura	1
	Ácido ascórbico	0,1
	Ácido tioglicólico	0,1
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Ajustar a pH 7,0 - 7,5 con NaOH y HCl.		
RCA (Agar)	Peptona	10
	Extracto de carne	10
	Extracto de levadura	3
	Dextrosa	5
	NaCl	5
	Almidón soluble	1
	Cisteína HCl	0,5
	Acetato de sodio	3
	Resazurina	0,002
	Agar	14,5

Anexo II - Alineamiento de las secuencias del gen ADNr 16S

Anexo II

MB2-A41	G	C	T	C	A	G	G	A	C	G	A	A	C	G	C	T	G	G	C	G	G	C	G	T	G	C	C	T	A	A	T	A	C	A	T	G	C	A	A	G						
MB2-A2	
BU-A43	T	
MB2-A35	T	
MB2-A6	T	
VL-A36	T	
VL-A8	-	T	
MB2-A37

MB2-A41	T	C	G	A	G	C	G	G	A	C	A	G	A	T	G	-	-	-	-	-	G	G	A	G	C	T	T	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	C						
MB2-A2
BU-A43	A	.	G	C	.	.	T	T	C	A	A	-	G	.	A	.	.	T	.	T	.	G	G	A	C	G	G	A	A	.	T		
MB2-A35	A	.	G	C	.	.	T	T	C	A	A	A	G	.	A	.	.	T	.	T	.	G	G	A	T	G	G	A	A	.	T		
MB2-A6	A	.	G	C	.	.	T	C	A	A	A	-	T	.	A	.	.	T	.	T	.	G	G	A	T	G	G	A	T	.	T		
VL-A36	A	.	G	C	.	.	T	C	A	A	A	-	T	.	A	.	.	T	.	T	.	G	G	A	T	G	G	A	T	.	T		
VL-A8	A	.	G	C	.	.	T	T	C	A	A	-	G	.	A	.	.	T	.	T	.	G	G	A	C	G	G	A	A	.	T		
MB2-A37	A	.	.	.	-	-	A	.	C	A	G	C	A	T	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	T	.	.	.	

MB2-A41	C	C	T	G	-	-	-	A	T	G	T	T	A	G	C	G	G	C	G	A	C	G	G	G	T	G	A	G	T	A	A	C	A	C	G	T	G	G	G						
MB2-A2	-	-	-
BU-A43	G	A	A	A	-	T	T	G	A	C
MB2-A35	T	G	A	A	A	T	T	G	A	C	.	G
MB2-A6	T	G	A	A	-	T	T	G	A	C
VL-A36	T	G	A	A	-	T	T	G	A	C
VL-A8	G	A	A	A	-	T	T	G	A	C	.	G
MB2-A37	T	G	A	.	-	C	T	G	.	T	T

Anexo II

MB2-A41	T A A C C T G C C T	G T A A	G A	C T	G G G A T A A C	T C C G	G G A A A C	C G G G
MB2-A2
BU-A43	C A T .	C .	G G	A G T T	G A C T
MB2-A35	C A T .	C .	G G	A G T T	G A C T
MB2-A6	C A T .	C .	G G	A G T T	G A C T
VL-A36	C A T .	C .	G G	A G T T	G . C T
VL-A8	C A T .	C .	G G	A G T T	G A C T
MB2-A37	T . C .	. .	G G	G T . T	G . A C

MB2-A41	G C T A A T A C C G	G A T	G G - -	T T G T C T G A A C	C G C A T G G	T T C A	G A
MB2-A2 - -
BU-A43	C . .	A A G C	A C A C A G T G -	A . G . -
MB2-A35	C . .	A A G C	A C A C A G T G -	A . G . -
MB2-A6	C . .	A A G C	A C A C A G T G -	A . G . -
VL-A36	C . .	A A G C	A C A C A G T G -	A . G . -
VL-A8	C . .	A A G C	A C A C A G T G -	A . G . -
MB2-A37	C . .	. A - C	A . A . . . T G G T	C C G G

MB2-A41	C A T A	A A A	G G T G G C T T C G	G C T A	C C A C T T	A C A G A T G G A C	C C G
MB2-A2
BU-A43	T G . G	A A C T C . G G T .	. - . . . - - - -	. - - - - -	T G
MB2-A35	T G . G	A A C T C . G G T .	. - . . . - - - -	. - - - - -	T G
MB2-A6	T G . G	A A C T C . G G T .	. - . . . - - - -	. - - - - -	T G
VL-A36	T G . G	A A C T C . G G T .	. - . . . - - - -	. - - - - -	T G
VL-A8	T G . G	A A C T C . G G T .	. - . . . - - - -	. - - - - -	T G
MB2-A37	T . . C A . C A A . . C	G - - - - -	. A

Anexo II

MB2-A41	G	T	A	G	G	G	A	A	T	C	T	T	C	C	G	C	A	A	T	G	G	A	C	G	A	A	A	G	T	C	T	G	A	C	G	G	A	G	C	A				
MB2-A2
BU-A43	.	.	G	A	.	.	G	G	A	G	G	C	C	T	C	C	.	.	.	G			
MB2-A35	.	.	G	A	.	.	G	G	A	G	G	C	C	T	C	C	.	.	.	G			
MB2-A6	.	.	G	A	.	.	G	G	A	G	G	C	C	T	C	C	.	.	.	G			
VL-A36	.	.	G	A	.	.	G	G	A	G	G	C	C	T	C	C	.	.	.	G			
VL-A8	.	.	G	A	.	.	G	G	A	G	G	C	C	T	C	C	.	.	.	G			
MB2-A37	.	.	G	.	.	.	G	.	.	A	.	.	G	.	A	G	C	T	.	C			

MB2-A41	A	C	G	C	C	G	C	G	T	G	A	G	T	G	A	T	G	A	A	G	G	T	T	T	C	G	G	A	T	C	G	T	A	A	A	G	C	T	C				
MB2-A2
BU-A43	A	T	A	T	A	T	
MB2-A35	A	T	A	T	A	T	
MB2-A6	A	T	A	T	A	T	
VL-A36	A	T	A	T	A	T	
VL-A8	A	T	A	T	A	T	
MB2-A37	G	.	A	.	.	C	T	

MB2-A41	T	G	T	T	G	T	T	A	G	G	G	A	A	G	A	A	C	A	A	G	T	G	C	C	G	T	T	C	A	A	A	T	A	G	G	G	C	G	G	C				
MB2-A2
BU-A43	.	A	.	C	-	-	-	.	.	C	A	G	G	.	.	.	G	.	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MB2-A35	.	A	.	C	-	-	-	.	.	C	A	G	G	.	.	.	G	.	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MB2-A6	.	A	.	C	-	-	-	.	.	C	A	G	G	.	.	.	G	.	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VL-A36	.	A	.	C	-	-	-	.	.	C	A	G	G	.	.	.	G	.	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VL-A8	.	A	.	C	-	-	-	.	.	C	A	G	G	.	.	.	G	.	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MB2-A37	.	.	.	C	C	.	.	G	.	T	.	.	C	.	.	.	A	C	.	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Anexo II

MB2-A41	A	C	C	T	T	G	A	C	G	G	T	A	C	C	T	A	A	C	C	A	G	A	A	A	G	C	C	A	C	G	G	C	T	A	A	C	T	A	C	G						
MB2-A2	
BU-A43	-	-	-	-	G	.	T	.	A	G		
MB2-A35	-	-	-	-	G	.	T	.	A	G	
MB2-A6	-	-	-	-	G	.	T	.	A	G	
VL-A36	-	-	-	-	G	.	T	.	A	G	
VL-A8	-	-	-	-	G	.	T	.	A	G
MB2-A37	-	-	-	-	G	.	C	.	G	G	.	G	T	C	

MB2-A41	T	G	C	C	A	G	C	A	G	C	C	G	C	G	G	T	A	A	T	A	C	G	T	A	G	G	T	G	G	C	A	A	G	C	G	T	T	G	T	C						
MB2-A2	
BU-A43	G	A	.	
MB2-A35	G	A	.	
MB2-A6	G	A	.	
VL-A36	G	A	.	
VL-A8	G	A	.	
MB2-A37	G	A

MB2-A41	C	G	G	A	A	T	T	A	T	T	G	G	G	C	G	T	A	A	A	G	G	G	C	T	C	G	C	A	G	G	C	G	G	T	T	T	C	T	T	A																	
MB2-A2										
BU-A43	T	.	.	.	C	A	G	.	T	.	A	C	A	C	T	G	C								
MB2-A35	T	.	.	.	C	A	G	.	T	.	A	C	A	C	T	G	C					
MB2-A6	T	.	.	.	C	A	G	.	T	.	A	C	A	C	T	G	C			
VL-A36	T	.	.	.	C	A	G	.	T	.	A	C	A	C	T	G	C		
VL-A8	T	.	.	.	C	A	G	.	T	.	A	C	A	C	T	G	C	
MB2-A37	T	.	.	.	C	T	G	.	T	C	A	C	T	G	C

Anexo II

MB2-A41	A	G	T	C	T	G	A	T	G	T	G	A	A	A	G	C	C	C	C	C	G	G	C	T	C	A	A	C	C	G	G	G	G	A	G	G	G	T	C	A		
MB2-A2
BU-A43	G	A	G	G	C	C	.	.	G	A	C	T	G	.	T		
MB2-A35	G	A	G	G	C	C	.	.	G	A	C	T	G	.	T		
MB2-A6	G	A	G	G	C	C	.	.	G	A	C	T	G	.	T		
VL-A36	G	A	G	G	C	C	.	.	G	A	C	T	G	.	T		
VL-A8	G	A	G	G	C	C	.	.	G	A	C	T	G	.	T		
MB2-A37	A	.	G	C	T	A	T	A	T	G	T	.	.	.	C	A	T	A	G	A	C	T	G	.	G		

MB2-A41	T	T	G	G	A	A	A	C	T	G	G	G	A	A	C	T	T	G	A	G	T	G	C	A	G	A	A	G	A	G	G	A	G	A	G	T	G	G	A		
MB2-A2
BU-A43	T	.	.	T	G	.	.	.	A	G	T	A	
MB2-A35	T	.	.	T	G	.	.	.	G	G	T	A	
MB2-A6	T	.	.	T	G	.	.	.	A	G	T	A	
VL-A36	T	.	.	T	G	.	.	.	A	G	T	A	
VL-A8	T	.	.	T	G	.	.	.	A	G	T	A	
MB2-A37	.	.	T	T	.	.	T	G	A	.	.	T	.	.	.	T	A	G	.	C	

MB2-A41	A	T	T	C	C	A	C	G	T	G	T	A	G	C	G	G	T	G	A	A	A	T	G	C	G	T	A	G	A	G	A	T	G	T	G	G	A	G	G	A	
MB2-A2
BU-A43	T	A	T	.	T	A
MB2-A35	T	A	T	.	T	A
MB2-A6	T	A	T	.	T	A
VL-A36	T	A	T	.	T	A
VL-A8	T	A	T	.	T	A
MB2-A37	C	G

Anexo II

MB2-A41	A	C	A	C	C	A	G	T	G	G	C	G	A	A	G	G	C	G	A	C	T	C	T	C	T	G	G	T	C	T	G	T	A	A	C	T	G	A	C	G		
MB2-A2
BU-A43	G	.	T	A	.	.	A		
MB2-A35	G	.	T	A	.	.	A		
MB2-A6	G	.	T	A	.	.	A		
VL-A36	G	.	T	A	.	.	A		
VL-A8	G	.	T	A	.	.	A		
MB2-A37	G	.	T	A	.	.	G	.	T		

MB2-A41	C	T	G	A	G	G	A	G	C	G	A	A	A	G	C	G	T	G	G	G	G	A	G	C	G	A	A	C	A	G	G	A	T	T	A	G	A	T	A	C	
MB2-A2
BU-A43	T	C	T	A
MB2-A35	T	C	T	A
MB2-A6	T	C	T	A
VL-A36	T	C	T	A
VL-A8	T	C	T	A
MB2-A37	C	A	A	T	.	.	A

MB2-A41	C	C	T	G	G	T	A	G	T	C	C	A	C	G	C	C	G	T	A	A	A	C	G	A	T	G	A	G	T	G	C	T	A	A	G	T	G	T	T	A		
MB2-A2
BU-A43	A	.	A	.	.	G
MB2-A35	A	.	A	.	.	G	
MB2-A6	A	.	A	.	.	G	
VL-A36	A	.	A	.	.	G	
VL-A8	A	.	A	.	.	G	
MB2-A37	T	.	A	.	.	G	G	

Anexo II

MB2-A41	G G G G	G T T T C C G C	C C C T	T A G T G C	T G C A G C	T A A C	G C A T	T A A G
MB2-A2
BU-A43	A G C A A A .	T . T .	C G	C . . C	A
MB2-A35	A G C A A A .	T . T .	C G	C . . C	A
MB2-A6	A G C A A A .	T . T .	C G	C . . C	A
VL-A36	A G C A A A .	T . T .	C G	C . . C	A
VL-A8	A G C A A A .	T . T .	C G	C . . C	A
MB2-A37 C . G A C .	. . T .	C C	C . G . . T	A	A

MB2-A41	C A C T C C	G C C T G G G G	A G T A C G	G T C G C A A G	A C T G A A A C T C A A
MB2-A2
BU-A43	T . T . . .	A	T	A
MB2-A35	T . T . . .	A	T	A
MB2-A6	T . T . . .	A	T	A
VL-A36	T . T . . .	A	T	A
VL-A8	T . T . . .	A	T	A
MB2-A37	T . A . . .	A C	G T

MB2-A41	A G G A A T T G A C G G G G	G C C C G C A C A A G C	G G T G G A G	C A T G T G G
MB2-A2
BU-A43	A
MB2-A35	A
MB2-A6	A
VL-A36	A
VL-A8	A
MB2-A37	A	T

Anexo II

MB2-A41	T T T A A T T C G A A G C A A C G C G A A G A A C C T T A C C A	G	G T C T T G A
MB2-A2
BU-A43	A
MB2-A35	A
MB2-A6	A
VL-A36	A
VL-A8	A
MB2-A37

MB2-A41	C A T C	C T	-	C T	G A C	A A T C C T	A G	A G	A	T A G G A C G	- -	T C	C C C T	T C
MB2-A2	-	- -
BU-A43	G G	A A	C G G G A	. -	T A	.	C G A T C	. C	- -	T	A
MB2-A35	G G	A A	C G G G A	. -	T A	.	C G A T C	. C	- -	T	A
MB2-A6	G G	A A	C G G G A	. -	T A	.	C G A T C	. C	- -	T	A
VL-A36	G G	A A	C G G G A	. -	T A	.	C G A T C	. C	- -	T
VL-A8	G G	A A	C G G G A	. -	T A	.	C G A T C	. C	- -	T	A
MB2-A37 A	A	. .	A	. .	G . G G . A	- G C A T T A	G G	. G

MB2-A41	G G G G	G C A	-	G A G T	G A C A G G T G G T G C A T G G T T G T C G T C A G C T
MB2-A2	-
BU-A43	C A T	-	T C T A
MB2-A35	C A T	-	T C C A
MB2-A6	C A T	-	T C T A
VL-A36	C A T	-	T C C A
VL-A8	C A T	-	T C C A
MB2-A37	A A	. G	T T . A

Anexo II

MB2-A41	C	G	T	G	T	C	G	T	G	A	G	A	T	G	T	T	G	G	G	T	T	A	A	G	T	C	C	C	G	C	A	A	C	G	A	G	C	G	C	A											
MB2-A2					
BU-A43				
MB2-A35			
MB2-A6		
VL-A36		
VL-A8	
MB2-A37

MB2-A41	A	C	C	C	T	T	G	A	T	C	T	T	A	G	T	T	G	C	C	A	-	G	C	A	-	-	T	T	C	A	G	T	T	G	G	G	C	A	C	T												
MB2-A2
BU-A43	A	T	C	A	.	.	.	-	.	.	.	A	G	.	C	A	
MB2-A35	A	T	C	A	.	.	.	-	.	.	.	A	G	.	.	A	
MB2-A6	A	T	C	A	.	.	.	-	.	.	.	A	G	.	.	C	A	
VL-A36	A	T	C	A	.	.	.	-	.	.	.	A	G	.	.	A	
VL-A8	A	T	C	A	.	.	.	-	.	.	.	G	G	.	A	G	C	.	C	
MB2-A37	T	G	A	T	.	C	.	.	.	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MB2-A41	C	T	A	A	G	G	T	G	A	C	T	G	C	C	G	G	T	G	A	C	A	A	A	C	C	G	G	A	G	G	A	A	G	G	T	G	G	G	G	A														
MB2-A2
BU-A43	.	.	G	G	.	.	A	A	.	G	.	T	.	.	C	.	T		
MB2-A35	.	.	G	G	.	.	A	A	.	G	.	T	.	.	C	.	T		
MB2-A6	.	.	G	G	.	.	A	A	.	G	.	T	.	.	C	.	T		
VL-A36	.	.	G	G	.	.	A	A	.	G	.	T	.	.	C	.	T			
VL-A8	.	.	G	G	.	.	A	A	.	G	.	T	.	.	C	.	T			
MB2-A37	T	C	A	

Anexo II

MB2-A41	T	G	A	C	G	T	C	A	A	A	T	C	A	T	C	A	T	G	C	C	C	C	T	T	A	T	G	A	C	C	T	G	G	G	C	T	A	C	A	C						
MB2-A2	
BU-A43	T	T		
MB2-A35	T	T		
MB2-A6	T	T		
VL-A36	T	T		
VL-A8	T	T		
MB2-A37	C

MB2-A41	A	C	G	T	G	C	T	A	C	A	A	T	G	G	A	-	C	A	G	A	A	C	A	A	A	G	G	G	C	A	G	C	G	A	A	A	C	C	G	C							
MB2-A2	-
BU-A43	-	G	T	A	A	.	.	A	.	.	G	G	A	
MB2-A35	-	G	T	A	A	.	.	A	.	.	G	G	A	.	.	.	T	.	.	.	
MB2-A6	-	G	T	A	A	.	.	A	.	.	G	G	A	
VL-A36	-	G	T	A	A	.	.	A	.	.	G	G	A	
VL-A8	-	G	T	A	A	.	.	A	.	.	G	G	A	
MB2-A37	A	C	T	G	T	T	A	.	.	A	.	G	

MB2-A41	G	A	G	G	T	T	A	A	G	C	C	A	A	T	C	C	C	A	C	A	A	A	T	C	T	G	T	T	C	T	C	A	G	T	T	C	G	G	A	T							
MB2-A2
BU-A43	.	.	T	C	.	G	G	A	.	.	C	.	.	.	A	A	A	C	G	
MB2-A35	.	.	T	C	.	G	G	A	.	.	C	.	.	.	A	A	A	C	G	
MB2-A6	.	.	T	C	.	G	G	A	.	.	C	.	.	.	A	A	A	C	G	
VL-A36	.	.	T	C	.	G	G	A	.	.	C	.	.	.	A	A	A	C	G	
VL-A8	.	.	T	C	.	G	G	A	.	.	C	.	.	.	A	A	A	C	G	
MB2-A37	G	G	A	.	.	A	.	.	T	.	A	A	C	A	G	

Anexo II

MB2-A41	C	G	C	A	G	T	C	T	G	C	A	A	C	T	C	G	A	C	T	G	C	G	T	G	A	A	G	C	T	G	G	A	A	T	C	G	C	T	A	G							
MB2-A2				
BU-A43	T	.	T					
MB2-A35	T	.	T					
MB2-A6	T	.	T					
VL-A36	T	.	T					
VL-A8	T	.	T					
MB2-A37	G	C	.	.	C	T

MB2-A41	T	A	A	T	C	G	C	G	G	A	T	C	A	G	C	A	T	G	C	C	G	C	G	G	T	G	A	A	T	A	C	G	T	T	C	C	C	G	G	G										
MB2-A2			
BU-A43	A			
MB2-A35	A	
MB2-A6	A	
VL-A36	A	
VL-A8	A
MB2-A37	T	

MB2-A41	C	C	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	C	G	T	C	A	C	A	C	C	A	C	G	A	G	A	G	T	T	T	G	T	A	A	C											
MB2-A2
BU-A43	T	T	G	G	
MB2-A35	T	T	G	G	
MB2-A6	T	T	G	G		
VL-A36	T	T	G	G		
VL-A8	T	T	G	G		
MB2-A37	T	G	C	C	G	T	

Anexo II

MB2-A41	A	C	C	C	G	A	A	G	T	C	G	G	T	G	A	G	G	T	A	A	C	C	T	T	T	T	A	G	G	A	G	C	C	A	G	C	C	G	C	C
MB2-A2	
BU-A43	G	A	C	C	C	G	.	A	G	G	.	.	.	T	.	.	.	
MB2-A35	G	A	C	C	C	G	.	A	G	G	.	.	.	T	.	.	.	
MB2-A6	G	A	C	C	C	G	.	A	G	G	.	.	.	T	.	.	.	
VL-A36	G	A	C	C	C	G	.	A	G	G	.	.	.	T	.	.	.	
VL-A8	G	A	C	C	C	G	.	A	G	G	.	.	.	T	.	.	.	
MB2-A37	A	.	.	A	G	C	C	C	G	C	A	G	A	G	G	C	.	.	T	.	.	.

MB2-A41	G	A	A	G	G	T	G	G	G	A	C	A	G	A	T	G	A	T	T	G	G	G	G	T	G	A	A	G	T	C	G	T	A	A	C	A	-	-	-
MB2-A2	A	G	-
BU-A43	C	T	.	.	.	A	.	C	-	-	-		
MB2-A35	C	T	.	.	.	A	.	C	-	-	-			
MB2-A6	C	T	.	.	.	A	.	C	G	A	T	T	G	G	G			
VL-A36	C	T	.	.	.	A	.	C	-	.	.	A	G	-	-			
VL-A8	C	T	.	.	.	A	.	C	A	G	-	-			
MB2-A37	A	T	T	.	G	C	.	.	C	-	-	-	-			

MB2-A41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
MB2-A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
BU-A43	-	-	G	A	A	G	T	C	G	T	A	A	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
MB2-A35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MB2-A6	G	T	G	A	A	G	T	C	G	T	A	A	C	A	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VL-A36	-	-	G	T	A	A	C	C	G	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VL-A8	-	-	G	T	A	A	C	C	G	T	A	T	C	G	T	A	A	C	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MB2-A37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo III - Determinación de Sólidos Totales y Volátiles

1.1. Instrumental

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Horno de secado
- ✓ Horno de mufla
- ✓ Placas de evaporación: crisol de porcelana de 100 ml de capacidad
- ✓ Pinzas para crisol
- ✓ Guantes resistentes al calor
- ✓ Desecador y desecante (sílica gel)

1.2. Procedimiento

1.2.1. Sólidos Totales (ST)

1.2.1.1. Calibración

Controlar mediante un termómetro la temperatura del horno de secado, debe estar a 103–105 °C

1.2.1.2. Procedimiento

- *Preparación de la placa de evaporación:*

- Calentar un crisol de porcelana limpio en el horno de secado durante 2 h a 103 - 105 °C.
- Enfriar el crisol durante 15 min en el desecador. Utilizar **siempre** pinzas para la transferencia del crisol.
- Pesar el crisol: **B**
- Conservarlo en el desecador hasta el momento de usarlo.

- *Análisis de la muestra:*

- Mezclar bien la muestra para suspender los sólidos uniformemente.
- Retirar rápidamente la muestra antes de que ocurra asentamiento de los sólidos.
Se deben tomar 25 g de muestra

- Pesar el crisol con la muestra: **C**
- Colocar el crisol con la muestra en horno a 105 °C durante la noche para evaporar hasta desecación.
- Retirarlo al día siguiente y dejarlo enfriar en desecador durante 15 min.
- Pesar el crisol con el residuo: **A**

1.2.2. Sólidos Volátiles (SV)

1.2.2.1. Procedimiento

- Si el residuo obtenido del análisis de ST contiene grandes cantidades de materia orgánica, incinérse primero el residuo en un mechero (apoyando el crisol sobre un triángulo de pipa) protegido por una campana de extracción. La base del crisol debe llegar a rojo.
- Colocar el crisol con el residuo en la mufla, calentarla hasta 550 ± 50 °C e incinerar durante 30 min. El proceso no está completo hasta que el calor haya eliminado todo el carbono o depósito de hollín del crisol.
- Retirar el crisol con las cenizas de la mufla una vez que esta se haya enfriado.
- Transferir el crisol al desecador para terminar de enfriar. No sobrecargar el desecador y tener cuidado al abrirlo. El aire enfriado dentro del desecador habrá creado un vacío y la apertura repentina puede causar la pérdida de alguna de las cenizas del crisol.
- Pesar el crisol cuando se haya enfriado: **D**

1.3. Cálculos

$$\% \text{ de sólidos totales} = [(A - B) \times 100] / C - B$$

$$\% \text{ de sólidos volátiles} = [(A - D) \times 100] / A - B$$

Donde:

A = peso del residuo seco + placa, g.

B = peso de la placa, g.

C = peso de la muestra húmeda + placa, g.

D = peso del residuo + placa después de ignición, g.