



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

MICROBIOLOGÍA DEL PROCESO DE
BIOMETANIZACIÓN Y BASES PARA EL
DISEÑO DE UN BIORREACTOR CONTINUO

Anía Uriarte, Yeray

Junio 2017

Director

Pedro Castaño

Co-directora

Alicia Muela

Curso Académico

2016/2017

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CONTEXTO ENERGÉTICO	1
1.2. ALTERNATIVAS RENOVABLES	2
1.3. OBTENCIÓN Y USO DE BIOGÁS	3
1.4. OBJETIVO	4
2. MICROBIOLOGÍA DEL PROCESO	4
2.1. PROCESO BIOQUÍMICO	5
2.1.1. Etapa 1: Hidrólisis de biopolímeros	5
2.1.2. Etapa 2: Acidogénesis	6
2.1.3. Etapa 3: Acetogénesis	6
2.1.4. Etapa 4: Metanogénesis	8
2.2. COMUNIDAD MICROBIANA	9
2.2.1. Dominio <i>Bacteria</i>	10
2.2.2. Dominio <i>Archaea</i>	12
3. PRODUCCIÓN DE BIOGAS	14
3.1. POTENCIAL BIOQUÍMICO DEL METANO	14
3.2. BASES PARA EL DISEÑO DEL REACTOR	18
3.2.1. Cinética del reactor	18
3.3. CONFIGURACIÓN DEL REACTOR	19
3.3.1. Co-digestión	20
3.3.2. 2 CSTRs en serie	21
4. CONCLUSIONES	24
5. BIBLIOGRAFÍA	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTEXTO ENERGÉTICO

El trinomio energía, economía y ecología en un escenario sostenible despierta una gran preocupación en la sociedad, lo que le ha llevado a convertirse en el tema central en la última conferencia de las Naciones Unidas sobre cambio climático celebrada en diciembre de 2015 en París. El objetivo principal se centraba en recortar las emisiones de gases de efecto invernadero (*green-house gases*, GHG), manteniendo a su vez el crecimiento de la economía mundial y garantizando la seguridad energética de una forma equitativa e integral (Conti et al., 2016).

Según los últimos datos publicados por la Agencia Internacional de la Energía (*International Energy Agency*, IEA), y por primera vez en los últimos 40 años, han comenzado a separarse dos de los índices más estrechamente relacionados desde la primera revolución industrial, las emisiones de GHG y el crecimiento económico mundial. Dicha ruptura se debe principalmente a la fuerte inversión en nuevas fuentes de energía más limpias e innovadoras y con baja emisión de óxido carbónico (CO₂). Todo ello se traduce en la necesidad de adoptar un cambio en la visión actual de la naturaleza, sus recursos y su explotación, así como de avanzar conjuntamente hacia una economía circular e igualitaria (Stahel, 2016).

Es un hecho que la población mundial continúa creciendo de forma rápida y exponencial, del mismo modo que lo hace la demanda energética global. Para el año 2040, teniendo en cuenta las tecnologías conocidas hasta la fecha y las tendencias políticas y demográficas actuales, se prevé que ésta aumente en un 48%. A día de hoy, aproximadamente el 81% de dicha demanda se cubre gracias a recursos fósiles como el petróleo, el gas natural y el carbón, y se considera además que supondrán todavía la principal fuente de energía en un futuro próximo, cerca de un 78% del total para 2040 (Conti et al., 2016).

Cabe destacar que el consumo de gas natural es el único recurso fósil que presenta un crecimiento positivo del 1.9%/año, frente a un descenso en el uso del petróleo y el carbón. Esto se debe a la existencia de grandes reservas de gas, así como de su alta eficiencia y su limpia combustión gracias a su alta concentración de metano (CH₄).

Como cualquier otro combustible produce CO₂, pero presenta una importante ventaja molecular debido a su baja relación C:H (1:4), de forma que sus emisiones son menores en un 50% respecto al carbón y en un 30% frente al petróleo (Conti et al., 2016).

Es por ello que encontrar una vía o fuente alternativa de obtención de gas con similares características, tal y como se plantea a lo largo del trabajo, supondría una ventaja energética, pero sobre todo contribuiría a un sistema económico y medioambiental más sostenible asegurando el acceso a la energía a poblaciones rurales y países en desarrollo que están más expuestos a los problemas socioeconómicos y medioambientales (Larson y Kartha, 2000).

De cara al futuro, tanto las Naciones Unidas como el IEA, el departamento de Energía de Estados Unidos (*U.S. Energy Information Administration*, EIA) o el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre Cambio Climático (*Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC) entre otros, remarcan la necesidad de aunar fuerzas y establecer una estrategia común para conseguir una transformación política, económica y energética global basada en alternativas renovables. Para ello, se ha propuesto reducir gradualmente la inversión en tecnologías de explotación de recursos fósiles, aumentando por el contrario los recursos destinados a la investigación de nuevas fuentes de energía renovables (Biroi et al., 2015).

1.2. ALTERNATIVAS RENOVABLES

Las últimas décadas están marcadas por una fuerte dedicación e innovación científico-tecnológica que ha permitido modernizar las técnicas de explotación de las diversas fuentes naturales y renovables de energía.

Reciben este nombre ya que se producen de forma continua e inagotable a escala humana, evitan la generación de residuos y limitan la dependencia económica exterior. Más concretamente podemos agrupar bajo este término a la energía hidráulica y marina, eólica, solar, geotérmica y la obtenida a partir de la biomasa; lo que abre un mundo de nuevas posibilidades (Edenhofer et al., 2012). Cabe destacar que su explotación se ha mantenido prácticamente constante a lo largo de los últimos años, marcada por un ligero crecimiento y alcanzando a día de hoy únicamente el 12.9% de la energía total.

Aplicando un sistema económico sostenible, el IPCC sugiere que el consumo de energía global estará cubierto por fuentes de energías renovables en un 30% para mediados de siglo y hasta en un 50% para finales del 2075 (Conti et al., 2016; Pachauri et al., 2014). En este crecimiento, la biomasa jugará el papel más importante, fuente sobre la que nos centraremos a lo largo de este trabajo, más concretamente en residuos sólidos pecuarios, agroforestales o urbanos como fuente de materia orgánica.

Anualmente se generan toneladas de desechos, en su mayoría de origen animal derivados del sector ganadero, que son almacenados al aire libre para su descomposición (Cuéllar y Webber, 2008). Una mezcla húmeda de residuos animales con sólidos orgánicos agrícolas o urbanos conforma una de las propuestas con mayor potencial energético y beneficio ecológico, obteniendo un gas inodoro rico en metano similar al gas natural a través de los microorganismos bajo condiciones anaerobias (Angelidaki y Ellegaard, 2003).

Emplear residuos orgánicos reduciría de forma considerable la demanda de madera u otros materiales sólidos causantes de la deforestación. Además, tras el proceso de fermentación se obtiene un residuo líquido y denso muy rico en materia inorgánica, generalmente nitrógeno, lo que mejora el efecto fertilizante y disminuye de forma importante los malos olores asociados (Weiland, 2010).

1.3. OBTENCIÓN Y USO DE BIOGÁS

El proceso de obtención de biogás se basa en una degradación anaerobia multietapa que requiere la acción combinada de bacterias y arqueas quimioorganotrofas y quimiolitotrofas englobadas bajo lo que se denomina como proceso de biometanización. En relación al oxígeno, son en su mayoría anaerobias estrictas, a excepción de algunas facultativas, lo que limita la supervivencia de otros organismos patógenos que puedan interferir en el proceso (Mara y Horan, 2003).

La sintrofia establecida en este tipo de ecosistemas (biorreactor) permite llevar a cabo la degradación completa de la materia orgánica alimentada, liberando biogás compuesto principalmente por CH_4 y CO_2 , además de otras pequeñas impurezas que pueden eliminarse fácilmente para su aplicación a nivel industrial o doméstico (Kadam y Panwar, 2017).

Las características del biogás propician su uso en una gran variedad de escenarios, perspectivas y situaciones: Aún hoy en el siglo XXI, más de dos billones de personas obtienen energía a partir de la combustión directa de la biomasa para cocinar o calentarse ya que no pueden acceder a combustibles de mayor calidad. Pequeños biorreactores domésticos permitirían aprovechar los residuos de una forma más eficiente y satisfacer así las necesidades básicas en estas áreas. Además, el uso del biogás reduce considerablemente las enfermedades causadas por la exposición prolongada al humo y partículas en suspensión derivadas de la combustión de la materia orgánica. Este hecho supone más de la mitad de las muertes en países en desarrollo, evitables a través del uso de estos biorreactores (Larson y Kartha, 2000; Mengistu et al., 2015).

Por otro lado, tratando el biogás y eliminando el CO₂ con el objetivo de obtener un gas enriquecido en CH₄ hasta una concentración mínima del 95%, hace posible su inyección en la red de gas natural (Kadam y Panwar, 2017; Murphy et al., 2004).

1.4. OBJETIVO

Este trabajo trata de sintetizar los procesos bioquímicos y microbiológicos a partir de los cuales se puede producir metano empleando distintos residuos orgánicos. Se estudiarán las complejas relaciones sintróficas de los microorganismos implicados, el efecto de variables, así como su relación con la cinética y el rendimiento global del proceso. A partir de todo ello se establecerán una serie de condiciones de operación y directrices del diseño conceptual de un biorreactor o sistema de biorreactores para obtener el máximo beneficio.

2. MICROBIOLOGÍA DEL PROCESO

La producción de biogás es un complejo proceso multietapa llevado a cabo por microorganismos en condiciones anóxicas y basado en estrictas relaciones e interdependencias microbianas ya que, ningún microorganismo de forma independiente, es capaz de llevar a cabo todas las etapas del proceso (Mara y Horan, 2003). Los componentes mayoritarios del biogás (CH₄ y CO₂) son los productos finales de una cascada de reacciones bioquímicas consecutivas y/o paralelas (Pavlostathis y Gomez, 2009) (**Figura 1**).

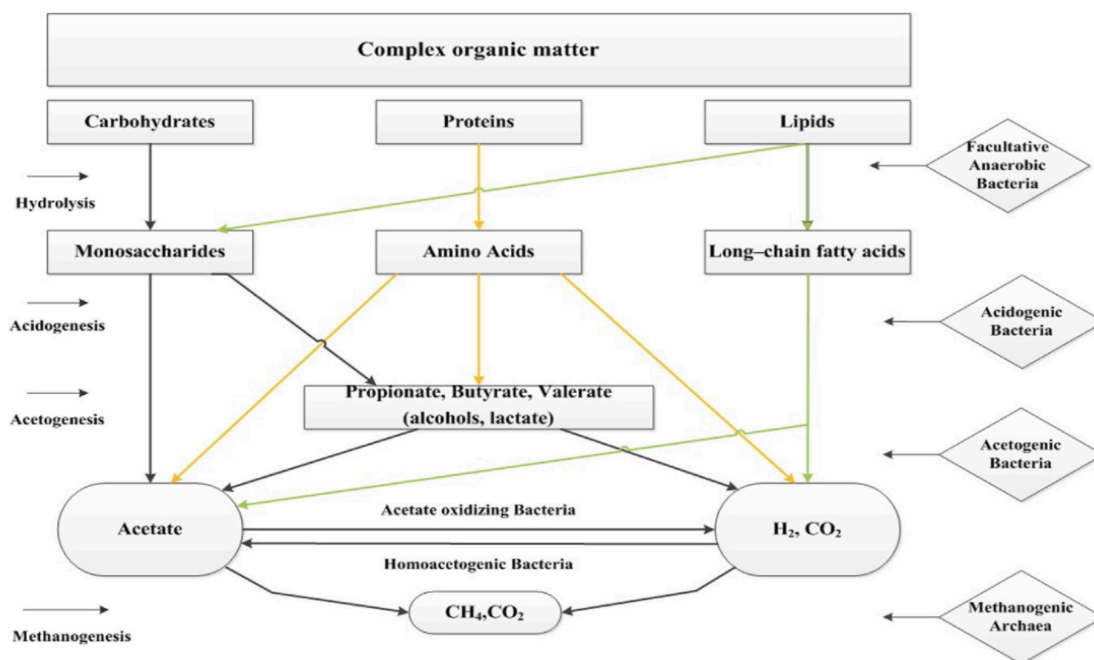


Figura 1. Proceso de conversión anaerobia de biomasa en metano. A la izquierda se indica la etapa del proceso. A la derecha se indica el grupo de microorganismos implicados. En el centro se especifican los intermediarios metabólicos (Christy et al., 2014).

2.1. PROCESO BIOQUÍMICO

En ausencia de un aceptor exógeno de electrones, como nitrato o sulfato, la degradación anaerobia de la materia orgánica se da a través de la acción cooperativa entre diferentes grupos tróficos de microorganismos con el fin de conseguir la degradación de variedad de sustratos poliméricos y monoméricos hasta CH_4 y CO_2 . El proceso se puede diferenciar en 4 etapas: Hidrólisis y acidogénesis, llevadas a cabo por bacterias fermentadoras anaerobias y anaerobias facultativas; acetogénesis, mediada por bacterias fermentativas acetogénicas junto a procariotas consumidores de hidrógeno; y metanogénesis, conducida exclusivamente por arqueas metanogénicas (Weiland, 2010).

2.1.1. Etapa 1: Hidrólisis de biopolímeros

La hidrólisis compone la primera y más esencial fase en la degradación anaerobia de biopolímeros que, por su complejidad química y estructural, no pueden ser utilizados directamente por los microorganismos. Estas moléculas de elevado peso molecular son incapaces de atravesar la pared celular por lo que es necesaria una digestión

extracelular para poder obtener así pequeños monómeros solubles (Pavlostathis y Gomez, 2009). Esta digestión está mediada por enzimas hidrolíticos que los microorganismos secretan al medio.

Los residuos animales, agroforestales y urbanos suponen una mezcla compleja de materiales lignocelulósicos, grandes polisacáridos, proteínas y grasas, por lo es habitual encontrar altas concentraciones de celulasas, pectinasas, amilasas, proteasas y lipasas en el reactor durante esta primera etapa del proceso (Mara y Horan, 2003).

A pesar de la complejidad metabólica de las posteriores transformaciones, la hidrólisis es considerada como la etapa limitante y más influyente en la cinética global del proceso de biometanización (Angelidaki et al., 2011; Goswami et al., 2016). Determina la concentración máxima de sustrato disponible, así como la tasa de crecimiento microbiano y, por tanto, va a influir directamente en el tiempo de retención en el biorreactor.

2.1.2. Etapa 2: Acidogénesis

La segunda etapa del proceso consiste en una serie fermentaciones donde los productos de la hidrólisis son degradados ahora de forma intracelular dando lugar a una gran variedad de compuestos como ácidos grasos volátiles, acetato, etanol, lactato, hidrógeno y CO₂ (Kleerebezem et al., 2005; Ramsay y Pullammanappallil, 2001; Ren et al., 1997; Temudo et al., 2008).

2.1.3. Etapa 3: Acetogénesis

Los productos de la acidogénesis son posteriormente oxidados a acetato, hidrógeno y CO₂ por distintos grupos bacterianos que se conocen como bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (OHPA). La función principal de las acetogénicas consiste en aumentar la eficiencia del proceso de biometanización a través de la oxidación de los productos finales liberados en las fermentaciones, dando lugar a los sustratos que pueden ser metabolizados fácilmente por las arqueas metanogénicas en la fase final (Mara y Horan, 2003).

Bajo condiciones estándar la acetogénesis presenta un carácter endergónico, por lo que las bacterias implicadas son capaces de crecer única y exclusivamente en ambientes con baja concentración de hidrógeno, tal y como ocurre en el interior del

reactor (Schink, 1997). Las OHPA deben crecer en sintrofia obligada, estableciendo relaciones mutualistas con arqueas metanogénicas consumidoras de hidrógeno (**Figura 2**) u otros procariotas presentes en el proceso como las homoacetogénicas o las bacterias sulfato-reductoras (Flaherty y Collins, 2006; Gavala et al., 2003). De esta forma, la transferencia de hidrógeno interespecies da a la reacción un carácter exergónico (Stams y Plugge, 2009)

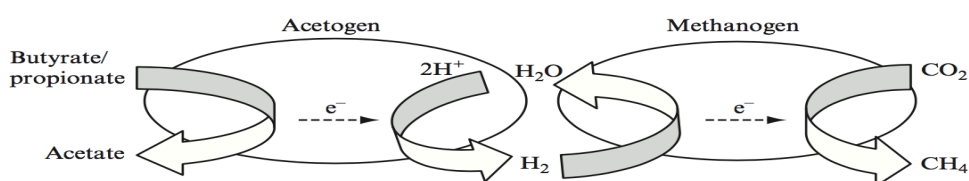


Figura 2. Transferencia interespecífica de H_2 entre bacterias OHPA y arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (Angelidaki et al., 2011).

Estudios como el de Flaherty y Collins (2006) y Batstone et al. (2006) combinando técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (*fluorescent in situ hybridization*, FISH) y microscopía láser confocal observaron complejas estructuras granulares compuestas por grupos heterogéneos de bacterias y arqueas, rodeadas de una matriz extracelular rica en minerales (**Figura 3**).

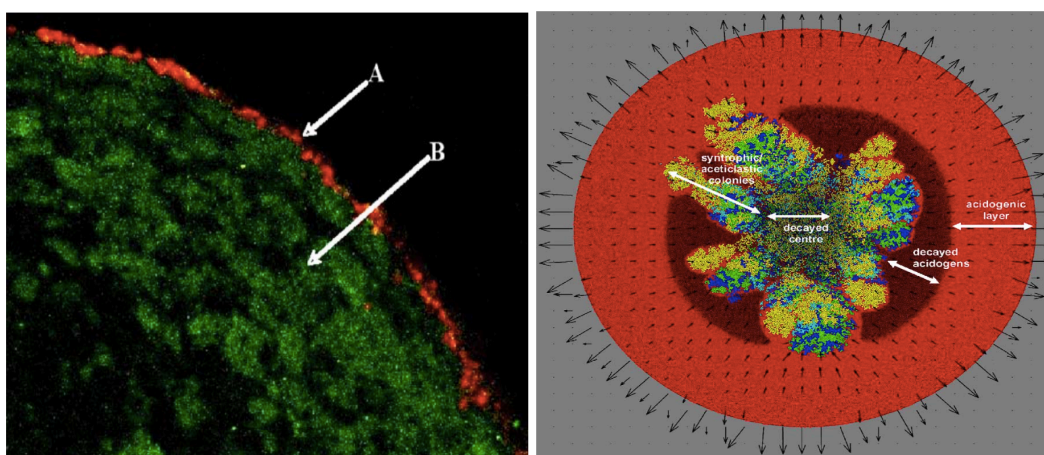


Figura 3. Hibridación fluorescente *in situ* mostrando la estructura del gránulo en un biorreactor anaerobio. La imagen de la izquierda muestra la organización general: A) Bacterias, B) Arqueas (Flaherty y Collins, 2006). La imagen de la derecha muestra la organización detallada: Metanogénicas acetoclásticas (amarillo); Metanogénicas hidrogenotróficas (azul oscuro); Acidogénicas (Rojo), Acetogénicas OHPA (Verde y Cian) (Batstone et al., 2006).

Tal y como se observa en la **Figura 3** la organización no tiene lugar al azar, sino que las bacterias OHPA establecen micro colonias rodeadas de arqueas metanogénicas hidrogenotrópicas favoreciendo la transferencia de hidrógeno y sustratos interespecies.

2.1.4. Etapa 4: Metanogénesis

La fase final del proceso es la metanogénesis, es decir, la síntesis de la forma más reducida posible del carbono, el CH_4 . Tras la hidrólisis, esta última fase es considerada como la siguiente etapa limitante del proceso debido a la baja velocidad de las reacciones (Goswami et al., 2016). Todas ellas son llevadas a cabo por arqueas anaerobias estrictas y en función de los sustratos que utilizan se diferencian en tres grupos, acetoclásticas, hidrogenotrópicas y metilotrópicas.

Las arqueas hidrogenotrópicas son capaces de generar metano a partir del hidrógeno y el CO_2 presentes en el reactor liberados en las etapas previas del proceso por bacterias hidrolíticas, fermentadoras y acetogénicas. La propia actividad de las arqueas hidrogenotrópicas impulsa el desarrollo de las etapas 2 (acidogénesis) y 3 (acetogénesis) al disminuir la presión parcial de hidrógeno del reactor. Su presencia va a determinar junto a los hidrolíticas el rendimiento global del proceso de biometanización (Stams y Plugge, 2009).

Las metanogénicas acetoclásticas llevan a cabo la transformación directa de acetato en un grupo carboxilo que se oxidará a CO_2 , y un grupo metilo que dará lugar al CH_4 (Christy et al., 2014).

Una pequeña parte del biogás liberado en el reactor se debe a la actividad de un reducido grupo de arqueas denominadas metilotrópicas. En este caso, el metano liberado se debe a la degradación de compuestos metilados, generalmente alcoholes metílicos, metilaminas y metilsulfuros (Goswami et al., 2016).

A día de hoy existe una gran controversia en relación a la vía principal de síntesis de CH_4 . Únicamente 1/3 de la materia orgánica de partida es transformada en hidrógeno, mientras que 2/3 acaba transformándose finalmente en acetato, por lo que debería ser éste el sustrato principal favoreciendo la ruta acetoclástica, tal y como

avalan varios estudios (Angelidaki et al., 2011; Goswami et al., 2016; Mara y Horan, 2003).

2.2. COMUNIDAD MICROBIANA

Comprender la organización y el comportamiento de la comunidad microbiana implicada en el proceso de biometanización es una etapa crucial a la hora de establecer las condiciones óptimas de operación y aumentar así el rendimiento en la producción de biogás (Ren et al., 1997).

Los métodos clásicos de estudio de microorganismos basados en el aislamiento y la obtención de cultivos puros en el laboratorio han sido de poca ayuda en la caracterización de la comunidad microbiana implicada en la biometanización. Este fracaso radica en parte en la imposibilidad para hacer crecer a muchos de los microorganismos implicados, pero también en la dificultad para reproducir en el laboratorio la simbiosis que se establece entre ellos (Enoki et al., 2011; Mori y Kamagata, 2014).

En la última década, los avances en el campo de la metagenómica, el desarrollo de nuevas técnicas de cribado de alto rendimiento y el crecimiento de bibliotecas de cDNA y RNA ribosómico 16S han abierto un nuevo horizonte, permitiendo determinar de forma cuantitativa y cualitativa la compleja composición de las poblaciones microbianas implicadas en el proceso (Wirth et al., 2012). La proporción de las distintas especies depende de factores internos del reactor como el sustrato, la temperatura, el pH, el tipo de fermentador y su agitación.

Recientemente, estudios como Chojnacka et al. (2015) han analizado el DNA total de la comunidad microbiana presente en el efluente de un biorreactor empleando técnicas de secuenciación y modernas herramientas bioinformáticas (pirosecuenciación-454 y *Sequencing by Oligo Ligation and Detection*). Sus resultados muestran a los procariotas como organismos predominantes (**Figura 4**), destacando el Dominio *Bacteria* frente al Dominio *Archaea*.

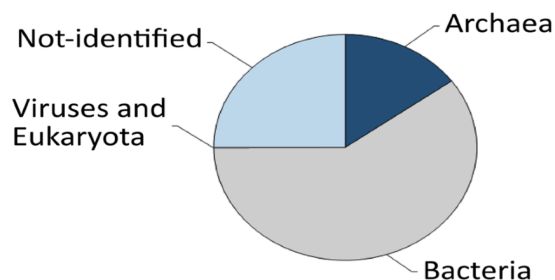


Figura 4. Distribución de microorganismos por dominios en un reactor UASB a 25°C (Chojnacka et al., 2015).

Aunque su presencia en el reactor sea mínima, cabe destacar la implicación de microorganismos del Dominio *Eukarya*, en concreto de los grupos *Protozoa* y *Fungi* que entrarían en el reactor a través de los residuos empleados como materia prima y favorecerían su degradación en las primeras etapas del proceso (Mara y Horan, 2003). Las secuencias de DNA vírico se deben por otro lado a la propia lisis celular durante el proceso metanogénico. Destaca el gran número de especies aún desconocidas en este tipo de ecosistemas, como lo demuestra la elevada proporción de fragmentos de DNA que no presentan homología con ninguna secuencia conocida (Wirth et al., 2012).

2.2.1. Dominio *Bacteria*

Este mismo trabajo profundiza en el estudio de *Bacteria* y *Archaea* a 25°C, basándose en el análisis de rRNA 16S. Dentro del dominio *Bacteria* destaca el phylum *Firmicutes*, más concretamente la clase *Clostridia* y *Bacilli*; seguido de los phyla *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Cloacimonetes* y *Spirochaetes* (Figura 5).

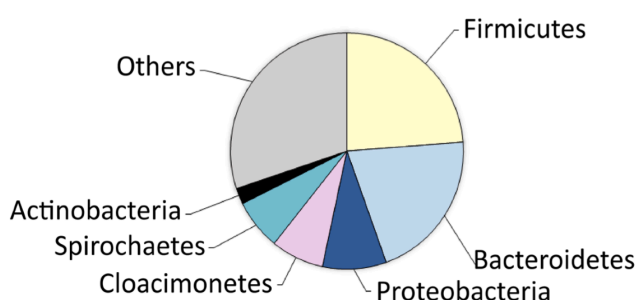


Figura 5. Distribución de bacterias por phylum en un reactor UASB a 25°C (Chojnacka et al., 2015).

La importante presencia de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* sugiere un papel principal y esencial de estos en las fases 1 (hidrólisis), 2 (acidogénesis) y 3 (acetogénesis). Conforman un grupo de bacterias muy diverso capaz de hidrolizar eficientemente y fermentar de forma simultánea biomasa rica en lignocelulosa y proteínas (Han et al., 2016; Ramsay y Pullammanappallil, 2001).

Varios trabajos avalan que dicha distribución se mantiene prácticamente inalterable bajo condiciones mesófilas a 37°C (Wirth et al., 2012). Sin embargo, un incremento de la temperatura puede provocar alteraciones importantes en la comunidad de bacterias.

La **Figura 6** presenta los resultados del estudio realizado por Heeg et al. (2014) en el que se compara la composición de la comunidad bacteriana presente en un biorreactor funcionando a 37°C y 55°C. Se puede observar que en condiciones termófilas (55°C) disminuye de forma considerable la población de *Bacteroidetes*, favoreciendo aún más el número de *Firmicutes*.

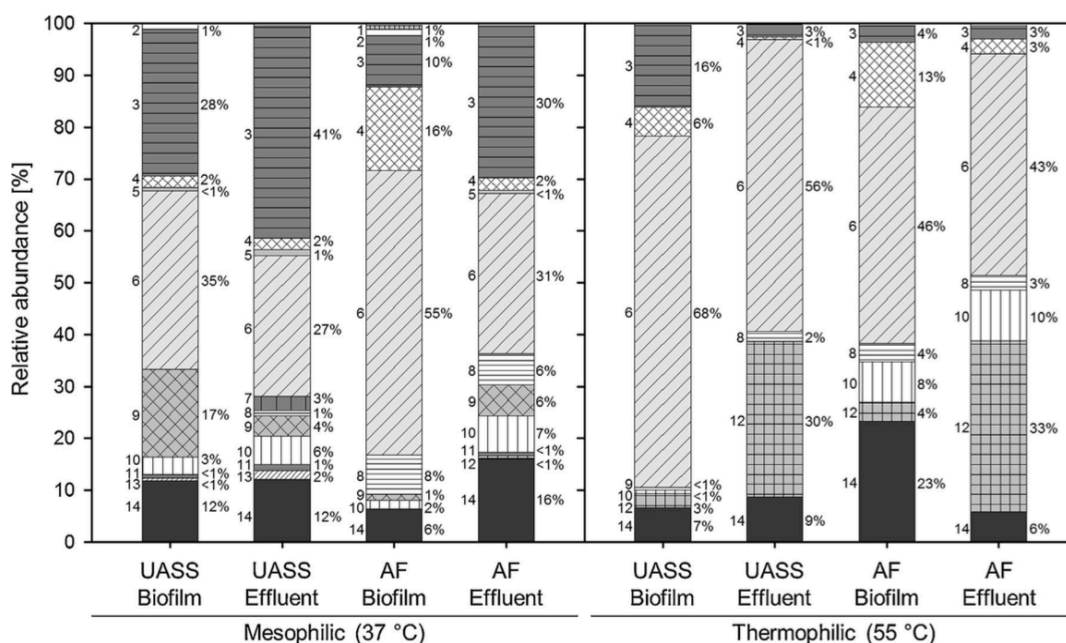


Figura 6. Distribución de bacterias por phylum en un reactor en dos fases (UASS-AF) en condiciones mesófilas (37°C) y termófilas (55°C). Los números a la izquierda referencian la localización filogenética: 1. *Acidobacteria*; 2. *Actinobacteria*; 3. *Bacteroidetes*; 4. *Chloflexi*; 5. *Fibrobacteres*; 6. *Firmicutes*; 7. *Lentisphaerae*; 8. *Proteobacteria*; 9. *Spirochaetes*; 10. *Synergistetes*; 11. *Tenericutes*; 12. *Thermotogae*; 13. *Verrucomicrobia*; 14. DNA desconocido. Los números a la derecha referencian la abundancia relativa en porcentaje (Heeg et al., 2014).

2.2.2. Dominio *Archaea*

De forma general, las arqueas son consideradas como el organismo clave en el proceso de biometanización. Son microorganismos que liberan gas metano como producto final de su metabolismo energético, encuadrados dentro del phylum *Euryarchaeota*.

El trabajo de Chojnacka et al. (2015) encuentra dominantes los organismos pertenecientes al orden *Methanomicrobiales* (**Figura 7**). Se trata de arqueas hidrogenotróficas (Friedrich, 2005; Hallam et al., 2003), lo que remarca su implicación en relaciones mutualistas obligadas e indica que la síntesis de metano provendría en mayor medida de la ruta hidrogenotrófica, es decir, a partir de hidrógeno, confirmando la gran controversia comentada en el apartado 2.1.4 (Roland Wirth et al. 2012; Christy et al. 2014).

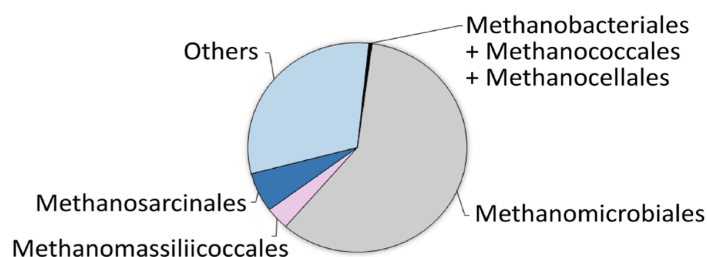


Figura 7. Distribución de arqueas por orden en un reactor UASB a 25°C (Chojnacka et al., 2015).

Otros órdenes como las *Methanosarcinales* sintetizan metano principalmente a partir del acetato liberado tras la fermentación, mientras que las *Methanomassiliicoccales* son capaces de emplear los compuestos metilados.

Centrándonos en la temperatura de funcionamiento del reactor y, al igual que ocurría en el caso de las bacterias, debe considerarse como un factor determinante en la distribución de las arqueas. Comparando la composición de las poblaciones presentes a 37°C y 55°C, Heeg et al. (2014) encuentran que bajo condiciones termófilas aumenta de forma importante la presencia de *Methanosarcinales* y *Methanobacteriales*, reduciendo al mínimo las *Methanomicrobiales*, el grupo dominante a 37°C (**Figura 8**). La presencia de las *Methanobacteriales*

hidrogenotróficas está justificada por su carácter termófilo y su capacidad de establecer relaciones mutualistas con el phylum bacteriano *Thermotogae*, cuyo crecimiento estaba favorecido también a altas temperaturas (**Figura 6**).

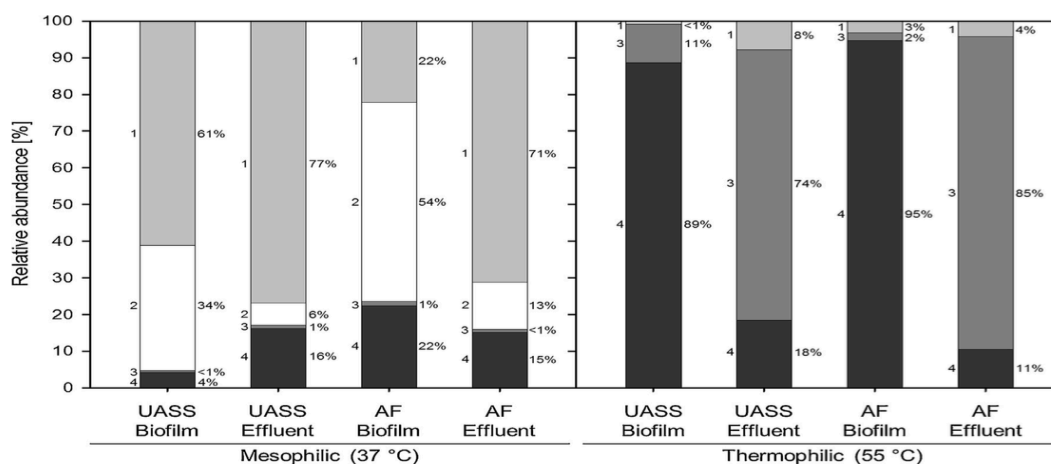


Figura 8. Distribución de arqueas por orden en un reactor en dos fases (UASS-AF) en condiciones mesófilas (37°C) y termófilas (55°C). Los números a la izquierda referencian la localización filogenética: 1. *Methanomicrobiales*; 2. *Methanosaetaceae*; 3. *Methanobacteriales*; 4. *Methanosarcinaceae*. Los números a la derecha referencian la abundancia relativa en porcentaje (Heeg et al., 2014).

Los cambios observados en la comunidad procariota estarían repercutiendo directamente en la eficacia del proceso. En la **Tabla 1** se presentan los resultados del trabajo arriba mencionado, que encuentra un aumento del 65% en la producción de CH₄ y en el rendimiento global del proceso.

Tabla 1. Producción de CH₄ y rendimiento total obtenido bajo condiciones mesófilas (37°C) y termófilas (55°C) con un tiempo de retención de 20 días (Heeg et al., 2014).

	Condiciones	
	Mesófilas (37°C)	Termófilas (55°C)
Producción Biogas [LLvs ⁻¹ d ⁻¹]	0.434 ± 0.109	0.811 ± 0.198
Producción CH ₄ [LLvs ⁻¹ d ⁻¹]	0.262 ± 0.075	0.434 ± 0.113
Rendimiento CH ₄ [L kgvs ⁻¹]	105 ± 31	173 ± 45

La mejora en el rendimiento se podría explicar por un aumento en la síntesis de intermediarios derivados de la hidrólisis, acidogénesis y acetogénesis por parte del

grupo *Firmicutes*. Pertenecen en su mayoría a la clase *Clostridia*, imprescindibles debido a su alta actividad celulolítica, destacando la especie *Clostridium thermocellum* que presenta una temperatura óptima de crecimiento entre los 50-60°C (McBee, 1954). Es característica además por sus eficientes celulasas de alta afinidad, organizadas en complejos enzimáticos denominados celulosomas.

Además, una mayor productividad podría estar relacionada con el proceso de granulación característico de los procesos de digestión anaerobia (Chojnacka et al., 2015). Se ha demostrado que las metanogénicas acetoclásticas del orden *Methanosarcinales* presentan un papel fundamental en el proceso de nucleación en el desarrollo de dichos gránulos que serán colonizados más adelante por los demás microorganismos. Esto favorece la sintrofia y sirve además a las propias arqueas a modo de protección frente a agentes externos como la temperatura o inhibidores como el amonio (Demirel y Scherer, 2008).

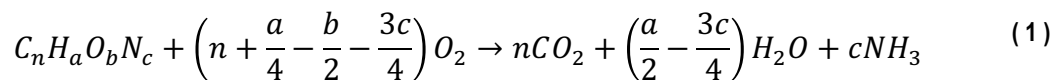
3. PRODUCCIÓN DE BIOGAS

3.1. POTENCIAL BIOQUÍMICO DEL METANO

El potencial metanogénico del sustrato está relacionado con su degradabilidad y el estado de oxidación de las macromoléculas que lo conforman. De esta forma, la naturaleza y características de la biomasa alimentada en el reactor son una de las principales variables para controlar el rendimiento en la producción de biogás (Angelidaki et al., 2011). La biomasa presenta una composición muy compleja y difícil de analizar. Por tanto, la primera dificultad la encontramos a la hora establecer índices de caracterización unívocos que permitan comparar la cinética de metanogénesis a partir de alimentaciones de naturaleza muy distinta. Una aproximación muy extendida es usar la denominada “demanda química de oxígeno” (*chemical oxygen demand*, COD) y el contenido en sólidos volátiles (*volatile solids*, VS) (Rice et al., 2017). Ambos índices aportan información sobre la biomasa predispuesta a ser transformada en CH₄ y CO₂ (Angelidaki et al., 2011)

El parámetro COD se define como la cantidad de oxígeno necesario para oxidar completamente la materia orgánica y por lo tanto la capacidad de donar electrones de los distintos compuestos y actuar como fuente de energía (Mara y Horan, 2003). Por

otro lado, el VS esta correlacionado con la cantidad de materia perdida en una muestra seca durante 1 h a 550 °C, lo que permite estimar de manera sencilla la fracción de materia biodegradable (Douglas, 2016). De esta forma para una estequiometria simplificada:



$$\frac{COD}{VS} = \frac{\left(n + \frac{a}{4} - \frac{b}{2} - \frac{3c}{4}\right) \cdot 32}{12n + a + 16b + 14c} \quad (2)$$

Los valores de COD y VS pueden determinarse tanto experimentalmente como a través de la estequiometría simplificada tal y como se indica en la Ecuación (1). Una vez definida la composición elemental del sustrato y sabiendo el valor de COD/VS se puede predecir la contribución relativa de los distintos componentes orgánicos de la alimentación en la producción de biogás (Parker et al., 2008) descrito en la Ecuación (2). Cuanto mayor sea la relación, mayor será el contenido energético.

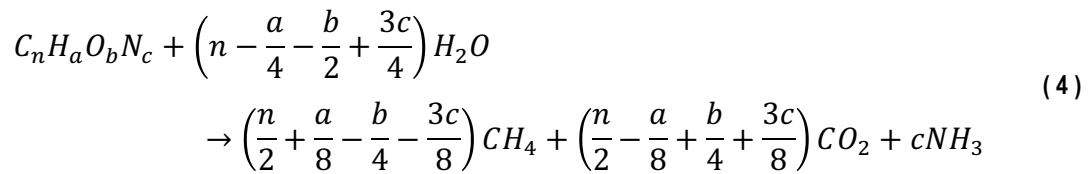
Sin embargo, trabajos como Pavlostathis y Gomez (2009) indican que al trabajar bajo condiciones anóxicas, el inverso de esta Ecuación (2) da una visión más realista de la implicación de los sustratos en la producción de metano, de forma que cuanto mayor sea el COD más costosa será realmente la conversión.

En términos de producción, cada sustrato tendrá un potencial conocido como “potencial metanogénico teórico” ($B_{o,th}$) determinado a través de la ecuación de Buswell (Lesteur et al., 2010):

$$B_{o,th} = \frac{\left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} - \frac{3c}{8}\right) \cdot 22.4}{12n + a + 16b + 14c} \quad (3)$$

Éste se expresa en L CH₄/g VS, asumiendo 22.4 L el volumen de un mol de gas bajo condiciones estándar.

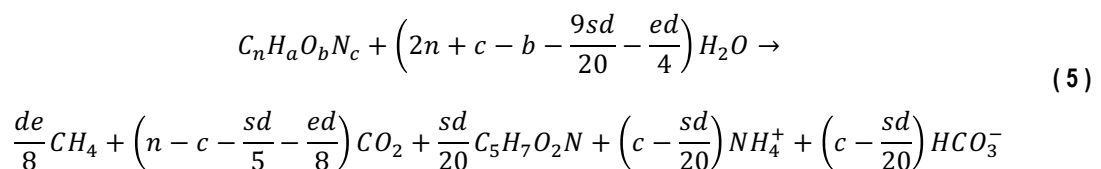
Para establecer los valores estequiométricos se toma como referencia la conversión de una mezcla compleja compuesta por carbohidratos, proteínas y grasas hasta CH_4 y CO_2 bajo condiciones anaerobias, siguiendo la ecuación de Boyles (Nielfa et al., 2015):



De esta forma, cuanto menor sea el estado de oxidación del carbono mayor-menor serán los valores de los coeficientes estequiométricos a y b respectivamente, por lo que se liberará mayor cantidad de CH_4 durante el proceso (Angelidaki et al., 2011). Estos índices y aproximaciones permiten clasificar el potencial de generación de biogás a partir de una alimentación determinada. Sin embargo, hay que tener en cuenta otros factores determinantes:

- Una pequeña fracción del sustrato, cerca del 5%, es empleada por los microorganismos en los procesos de síntesis, crecimiento y división celular.
- Los residuos sólidos presentan una fracción de material inerte o inaccesible para las bacterias hidrolíticas, cerca del 30%, por su carácter recalcitrante.
- Las condiciones de operación a gran escala pueden asociarse a limitaciones en la distribución de factores nutricionales.

Otros modelos adaptan estas observaciones para poder calcular rendimientos de CH_4 más reales. Por ejemplo, el modelo propuesto por McCarty (1972):



donde $C_nH_aO_bN_c$ hace referencia a la fórmula empírica del sustrato digerido; $C_5H_7O_2N$ a la fórmula empírica de masa seca de microorganismos; s a la fracción de

sustrato implicada en el crecimiento y división celular; e a la fracción de sustrato implicada en la producción de energía (mediante ATP) en la célula; $d = (4n + a - 2b - 3c)$.

A diferencia de la ecuación de Boyles (Ec. (4)), la Ecuación (5) permite llevar a cabo una estimación sobre el rendimiento de los microorganismos considerando la materia y energía empleada en los procesos anabólicos (Pavlostathis y Gomez, 2009).

Tabla 2. Características del sustrato indicando el COD/VS y el rendimiento en VS/COD y $B_{o,th}$. Los datos obtenidos por la Ecuación (4) toman la celulosa, gelatina y glicerol como sustratos de referencia. (Angelidaki et al., 2011). Los datos obtenidos por la Ecuación (5) toman la glucosa, pirrolinona y ácido palmítico como sustratos de referencia (Pavlostathis y Gomez, 2009).

Tipo sustrato	Ecuación (4)			Ecuación (5)			
	Composición	$B_{o,th}$ (L CH ₄ /g VS)	COD/VS (g COD/g VS)	VS/COD (g VS/g COD)	Composición	$B_{o,th}$ (L CH ₄ /g VS)	VS/COD (g VS/g COD)
Carbohidratos	$(C_6H_{10}O_5)_n$	0.415	1.19	0.84	$C_6H_{12}O_6$	0.291	0.35
Proteínas	$C_5H_7NO_2$	0.496	1.42	0.70	C_4H_6ON	0.492	0.205
Lípidos	$C_{57}H_{104}O_6$	1.014	2.9	0.34	$C_{16}H_{32}O_2$	0.940	0.038

En función de los resultados recogidos en la **Tabla 2** se observa que los lípidos presentan el menor estado de oxidación y conforman por lo tanto la mayor fuente de energía en la producción de metano. Sin embargo, tal y como vemos en la **Figura 9**, bajo condiciones anaerobias la fermentación de carbohidratos y proteínas presenta un mayor rendimiento asociado a un mayor grado de degradación, aportando energía más rápidamente con un menor tiempo de retención (Pavlostathis y Gomez, 2009).

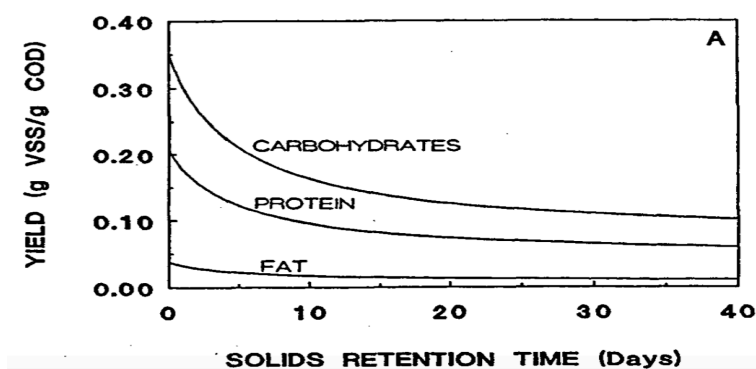


Figura 9. Rendimiento en VS/COD en la conversión de carbohidratos, proteínas y grasas en función del tiempo de retención bajo condiciones anaerobias (Pavlostathis y Gomez, 2009).

3.2. BASES PARA EL DISEÑO DEL REACTOR

En el proceso de producción de biogás a partir de residuos orgánicos se han planteado, estudiado e implementado numerosos tipos de diseños para el reactor o “trenes” de reactores, presentándose trabajos en fermentadores discontinuos (batch), semi-continuos o continuos (Boe, 2006). En estos reactores la máxima tasa de crecimiento microbiano se obtiene al trabajar en estado estacionario (Klass, 1984), a pesar de lo cual, la elección del reactor viene determinada por el tipo de alimentación a tratar y de su concentración total de sólidos (*total solids*, TS). El parámetro experimental TS, a diferencia del VS, hace referencia al contenido sólido seco, correlacionado con la cantidad de materia perdida en una muestra seca a 105°C hasta que se alcanza una masa constante, lo que nos permite determinar el tratamiento más adecuado (Rice et al., 2017).

El abono presenta una fracción importante de agua y fibras recalcitrantes con bajo potencial metanogénico pero con una composición habitual de TS comprendida entre el 5-9%. Esto lo convierte en un disolvente excelente para la digestión anaerobia de otros sólidos orgánicos que presentan un TS mayor entre el 10-40% y no son fluidos (Gavala et al., 2003), lo que favorece de forma considerable el rendimiento en la producción de biogás y permite el uso de reactores de mezcla perfecta (*continuously stirred tanks reactors*, CSTR).

3.2.1. Cinética del reactor

Como se indica en el apartado 2.1.1 la hidrólisis es considerada como una reacción de primer orden que conforma la etapa limitante. Ante esta situación la tasa de producción vendrá definida por la cinética del proceso más lento:

$$\frac{dF}{dt} = -k_h F \quad (6)$$

donde F hace referencia a la concentración de VS (moles de VS/L) y k_h a la tasa de hidrólisis (días⁻¹). En estado estacionario el balance de materia del CSTR (ecuación de diseño) sigue la siguiente expresión:

$$F = \frac{F_0}{1 + k_h \theta} \quad (7)$$

donde F , F_0 hacen referencia a la concentración de VS (mol VS/L) en la alimentación y el efluente respectivamente; y θ al tiempo de retención hidráulico (*hydraulic retention time*, HRT) (días).

La tasa de hidrólisis determina la máxima concentración de sustrato disponible (S) para las arqueas metanogénicas y por lo tanto influye en su tasa de crecimiento. La expresión se obtiene al reordenar la Ecuación 7:

$$S = F_0 - F = \frac{F_0 k_h \theta_c}{1 + k_h \theta_c} \quad (8)$$

donde θ_c hace referencia al tiempo de retención de sólidos (*solid retention time*, SRT) (días).

3.3. CONFIGURACIÓN DEL REACTOR

La biometanización en un único CSTR es el proceso más sencillo y fácil de controlar, pero con menor rendimiento. Los microorganismos y el sustrato se mantienen en suspensión y pueden extraerse del reactor por el efluente (Angelidaki y Boe, 2005), ya que parte de la alimentación permanece en el reactor un tiempo mucho menor que el HRT nominal (**Figura 10**).

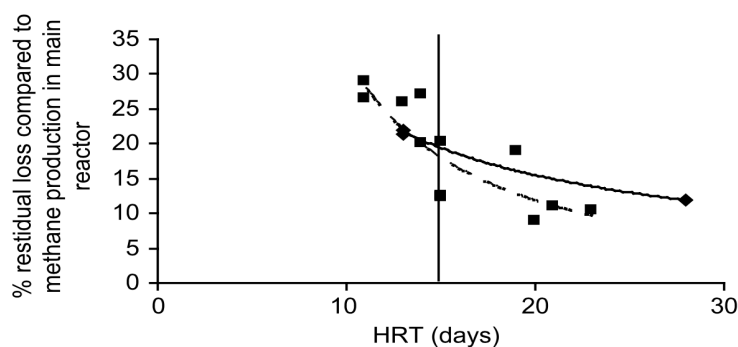


Figura 10. Pérdida de material particulado en un único reactor en función del tiempo de retención (HRT). Ensayo bajo condiciones mesófilas (—) y termófilas (- -) (Angelidaki y Boe, 2005)

Como alternativa se han propuesto sistemas en dos CSTRs en serie con resultados prometedores pero que presentan ciertas limitaciones. Estudios como Demirel y Yenigu (2002) muestran que no es viable llevar a cabo una separación completa de las distintas etapas favoreciendo cada una de ellas de forma individual como se pensaba en un inicio. Esta limitación se debe a variaciones importantes en el pH asociadas a alteraciones en el volumen de ácidos grasos volátiles (*volatile fatty acids*, VFA) y otros nutrientes que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos, además de alterar la sintrofia entre bacterias y arqueas (Kaparaju et al., 2009).

Para abordar estas limitaciones y conseguir un mayor rendimiento en la degradación de los sólidos orgánicos es posible establecer un sistema de dos CSTRs en serie precedidos de una fase de hidrólisis independiente ya que las bacterias implicadas en esta primera etapa presentan un pH óptimo de actividad inferior al de los demás microorganismos, comprendido entre 5.5-6.5 (Weiland, 2010).

3.3.1. Co-digestión

El trabajo llevado a cabo por Parawira et al. (2008) demuestra que establecer un sistema de co-digestión aumenta el rendimiento en la producción de biogás hasta un máximo del 60% (**Figura 11**), favoreciendo el flujo de VFA y la producción final de CH₄.

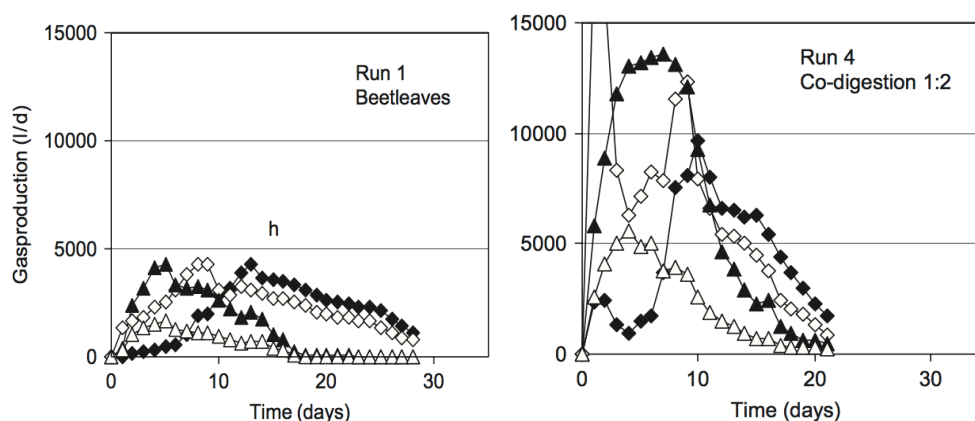


Figura 11. Producción diaria de CH₄ (▲) y CO₂ (◇) a partir de residuos sólidos agrícolas bajo condiciones mesófilas (37°C) con un HRT entre 21-36 días en un reactor discontinuo batch de 10 m³ de volumen. La imagen de la izquierda muestra la producción en una sola etapa en ausencia de una hidrólisis independiente. La imagen de la derecha muestra la producción en dos etapas en presencia de una co-digestión previa (Parawira et al., 2008).

La **Figura 11** muestra como la producción de CO_2 aumenta considerablemente como consecuencia de una rápida fermentación asociada a la alta eficacia de la hidrólisis bajo condiciones ácidas. Todo ello se traduce en un mayor potencial metanogénico trabajando incluso a un menor HRT.

3.3.2. 2 CSTRs en serie

Otros estudios como Kaparaju et al. (2009) han demostrado que una digestión con dos reactores CSTR metanogénicos conectados en serie (**Figura 12**) con una distribución del 50/50% (v/v) entre el reactor principal y el post-digestor aumenta el rendimiento entre un 15-20% al disminuir la concentración de VFA en el efluente en comparación con una operación unitaria, lo que se traduce en un mayor rendimiento sin perder la simbiosis (**Figura 13**).

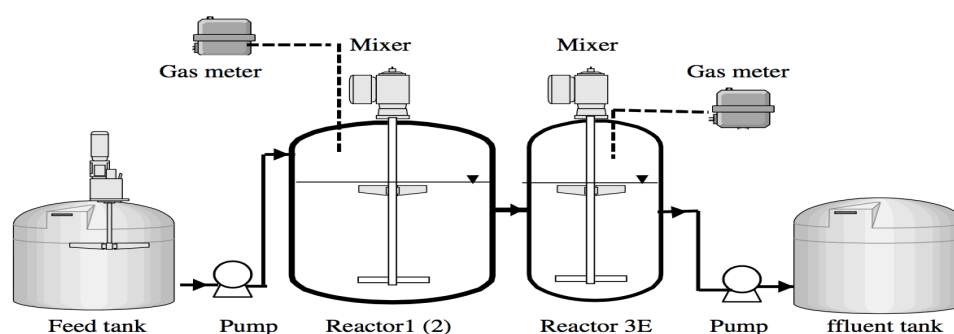


Figura 12. Esquema de la disposición de los reactores CSTR en serie (R1 + R3E) a escala piloto (Kaparaju et al., 2009).

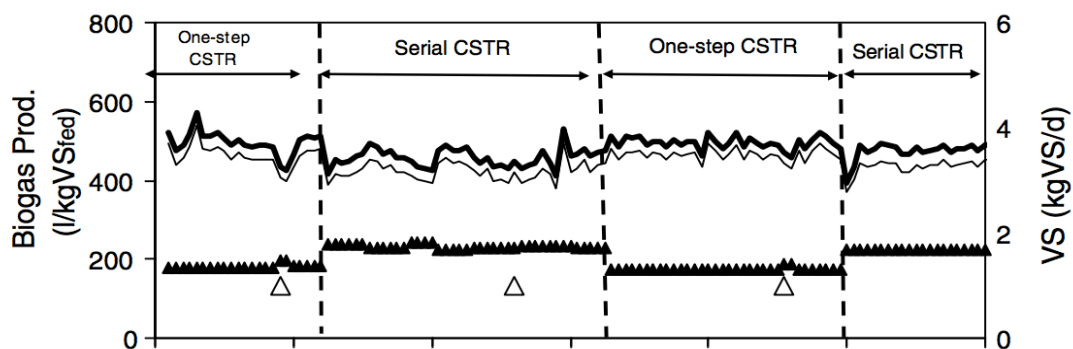


Figura 13. Rendimiento en la producción de biogás (L biogás/kg VS) a escala piloto bajo condiciones termófilas en fase unitaria (—) y dos reactores en serie (—) con una distribución 77/13% (v/v) (Kaparaju et al., 2009).

Del mismo modo es posible obtener una mayor tasa de conversión estableciendo un mayor reactor principal acompañado de una pequeña post-digestión. Sin embargo, menores HRTs en el segundo biorreactor aumentan la susceptibilidad del proceso a posibles sobrecargas.

Mantener un viable primer CSTR es esencial para una eficiente post-digestión. Trabajar con reactores en serie a una distribución del volumen menor al 50% en el reactor principal es insuficiente para mantener la estabilidad debido a una mayor acumulación de VFA en el primer reactor y a una posible separación de la etapa 2 (acidogénesis) de la 3 (acetogénesis) y 4 (metanogénesis) entre ambos biorreactores.

En sistemas CSTR el HRT es uno de los parámetros clave en la productividad y estabilidad del reactor. Trabajar con una configuración en serie supondría una distribución más óptima del tiempo de retención entre ambos reactores tal y como se ilustra en la **Figura 14**, disminuyendo la pérdida de microorganismos, material particulado y potencial metanogénico (Angelidaki y Boe, 2005).

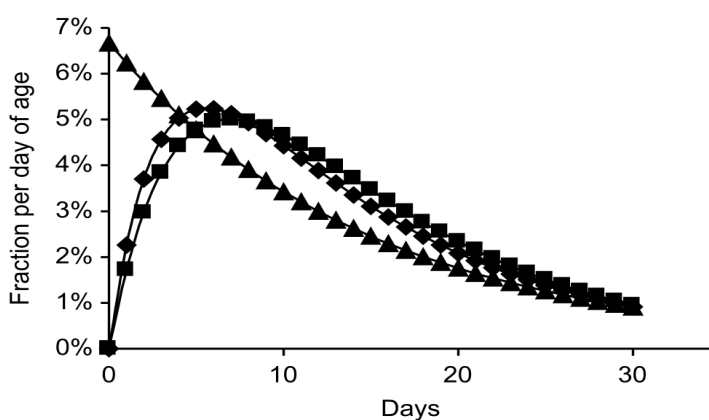


Figura 14. Fracción de la mezcla del reactor que abandona el sistema en función del tiempo y la configuración del reactor (distribución del HRT). Un único CSTR (▲), dos reactores CSTR 66/33% (v/v) (■), dos reactores CSTR 80/20% (v/v) (◆) (Angelidaki y Boe, 2005).

De esta forma, un sistema de dos CSTRs en serie consigue disminuir la fracción de biomasa que permanece en el reactor un tiempo de residencia inferior al HRT optimizado en la cinética, en comparación con un sistema de una única etapa CSTR. En otras palabras, disminuye la distribución de tiempos de residencia del efluente, aumentando el tiempo de residencia medio y aproximándolo a un valor más óptimo.

Al establecer las condiciones de operación, el HRT no debe exceder la menor tasa de crecimiento de los microorganismos, es decir, de las arqueas metanogénicas (Jabłoński et al., 2015). Por ello se suele trabajar típicamente en un rango mínimo de 15-30 días bajo condiciones mesófilas o entre 10-20 días bajo condiciones termófilas, inferiores incluso si se dispone de sistemas de recirculación (Angelidaki et al., 2011; Boe, 2006).

La temperatura es otro parámetro de control del proceso de biometanización con un efecto significativo en parámetros biológicos como el crecimiento microbiano (Apartado 2.2), además de perturbar parámetros físicos como la viscosidad, la tensión superficial, la transferencia de materia y el tiempo de retención (Angelidaki et al., 2003; Pavlostathis y Gomez, 2009).

$$\theta_c^{min} = [0.148 \cdot (1.116)^{(T-25)} - 0.015]^{-1} \quad (9)$$

donde θ_c^{min} hace referencia al tiempo de retención mínimo, T a la temperatura de operación (°C) y 0.015 al coeficiente de muerte celular (días⁻¹).

La Ecuación (9) permite determinar el efecto de la temperatura sobre el tiempo de retención mínimo. De esta forma, a mayor temperatura el HRT será menor y, volviendo a la Ecuación (8) la tasa de hidrólisis y la concentración de sustrato aumenta, favoreciendo la producción de biogás (Pavlostathis y Gomez, 2009).

A la hora de establecer las condiciones de operación es más ventajoso trabajar dentro del rango termófilo (45-55°C) (**Figura 15a**) manteniendo la misma temperatura entre ambos reactores (**Figura 15b**) ya que, variaciones de $\pm 10^\circ\text{C}$ entre el reactor principal y el post-digestor, pueden disminuir el rendimiento del segundo CSTR hasta en un 35-50% (Angelidaki y Boe, 2005).

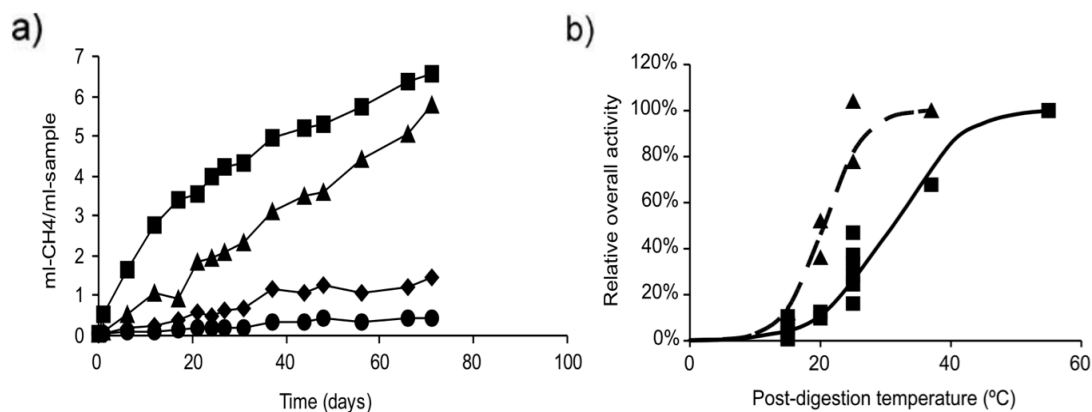


Figura 15. a) Rendimiento en la producción de CH₄ (mL CH₄/mL VS) a 15°C (●); 20°C (◆); 25°C (▲); 55°C (■) con un HRT de 70 días. b) Actividad relativa del post-digestor en comparación con el reactor principal en % bajo condiciones mesófilas a 37°C (▲) y termófilas a 55°C (■) (Angelidaki y Boe, 2005).

El menor rendimiento que vemos en el post-digestor se debe a un desequilibrio térmico de las bacterias y arqueas adaptadas a la temperatura del reactor principal, y a una alteración sintrófica, bloqueándose el proceso de granulación y las relaciones mutualistas. Todo ello se traduce en un aumento en los VFA que inhiben la actividad metanogénica al superar el valor máximo (1.5 g VFA/L) para mantener la actividad óptima dentro del reactor (Angelidaki y Boe, 2005).

4. CONCLUSIONES

La producción de biogás se presenta como una alternativa antes los problemas medioambientales y energéticos actuales, despertando el interés de las economías mundiales. En las próximas décadas la denominada bioenergía supondrá la fuente renovable más significativa al ofrecer una atractiva alternativa a los recursos fósiles en detrimento y al tradicional consumo de la biomasa, recortando las diferencias de género y los problemas de salud asociados a su combustión en países en desarrollo.

Los últimos avances en el campo de la genómica han permitido dar una nueva visión al proceso de biometanización, estudiando la eficiencia del proceso más allá del reactor. Los recientes estudios han demostrado que la distribución de bacterias y arqueas afecta a la estabilidad y al rendimiento global en la producción de biogás. Controlando parámetros sencillos como la temperatura, el pH y el tiempo de retención, es posible aumentar la viabilidad del biogás a través de la distribución y sintrofia de los microorganismos.

La hidrólisis marca el ritmo y la viabilidad del proceso metanogénico. Establecer una etapa independiente favoreciendo la degradación de residuos orgánicos con alto carácter recalcitrante y estimular el crecimiento de bacterias celulolíticas aumenta el flujo de compuestos orgánicos dispuestos a ser transformados en metano.

Los trabajos publicados hasta la fecha no permiten obtener una visión completa de lo que ocurre en el biorreactor. Son necesarios nuevos estudios metagenómicos y diseños piloto que esclarezcan las incongruencias planteadas y descubran nuevas bacterias aún desconocidas con habilidades únicas en la producción de biogás.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Angelidaki, I., Boe, K. 2005. Effect of operating conditions and reactor configuration on efficiency of full-scale biogas plants. *Water Sci. Technol.* 52: 189-194.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L. 2003. Codigestion of manure and organic wastes in centralized biogas plants: status and future trends. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 109: 95-105.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B. K. 2003. Applications of the anaerobic digestion process, en: Ahring, B.K. *Biomethanation II*, Springer., Berlin, pp. 1-33.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M., Stams, A. J. M. 2011. Biomethanation and its potential. *Methods Enzymol.* 494: 329-353.
- Batstone, D. J., Picioreanu, C., Loosdrecht, M. C. M. Van. 2006. Multidimensional modelling to investigate interspecies hydrogen transfer in anaerobic biofilms. *Water Res.* 40: 3099-3108.
- Biol, F., Cozzi, L., Dorner, D., Gül, T., Wanner, B., Kęsicki, F., Coon, T. 2015. Energy and Climate Change. International Energy Agency.
- Boe, K. 2006. Online monitoring and control of the biogas process. Ph. D. Thesis. Institute of Environment and Resources. Technical University of Denmark.
- Chojnacka, A., Szczęśny, P., Błaszczuk, M. K., Zielenkiewicz1, U., Detman, A., Salamon, A., Sikora, A. 2015. Noteworthy facts about a methane producing microbial community processing acidic effluent from sugar beet molasses fermentation. *PLoS One.* 12: 1-23.
- Christy, P. M., Gopinath, L. R., Divya, D. 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 34: 167-173.
- Conti, J., Holtberg, P., Diefenderfer, J., LaRose, A., Turnure, J. T., Westfall, L. 2016. International Energy Outlook. U.S. Energy Information Administration.
- Cuéllar, A. D., Webber, M. E. 2008. Cow Power: The energy and air quality benefits of converting manure to biogas. *Environ. Res. Lett.* 3: 69-77.
- Demirel, B., Scherer, P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Environ. Sci. Technol.* 7: 173-190.
- Demirel, B., Yenigu, O. 2002. Two-phase anaerobic digestion processes. *Chem. Technology Biotechnol.* 77: 743-755.

- Douglas, H. 2016. Methane Production Potential of Waste Materials. Ph. D. Thesis. Oklahoma State University.
- Edenhofer, O., Pichs Madruga, R., Sokona, Y. 2012. Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation. Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Enoki, M., Shinzato, N., Sato, H., Nakamura, K., Kamagata, Y. 2011. Comparative proteomic analysis of *Methanothermobacter thermautotrophicus* in pure culture and in co-culture with a butyrate-oxidizing bacterium. *Mol. Reprod. Dev.* 79: 413-422.
- Flaherty, V. O., Collins, G. 2006. The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Environ. Sci. Technol.* 5: 39-55.
- Friedrich, M. W. 2005. Methyl-coenzyme M reductase genes: Unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-Oxidizing archaea. *Methods Enzymol.* 397: 428-442.
- Gavala, H. N., Angelidaki, I., Ahring, B. K. 2003. Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 81: 58-93.
- Goswami, R., Chattopadhyay, P., Shome, A. 2016. An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities : a step towards sustainable waste management. *3 Biotech* 6: 1-12.
- Hallam, S. J., Girguis, P. R., Preston, C. M., Richardson, P. M., Delong, E. F., Ridge, B., Ridge, B. 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5483-5491.
- Han, S., Liu, Y., Zhang, S., Luo, G. 2016. Reactor performances and microbial communities of biogas reactors : effects of inoculum sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 100: 987-995.
- Heeg, K., Pohl, M., Sontag, M., Mumme, J., Klocke, M., Nettmann, E. 2014. Microbial communities involved in biogas production from wheat straw as the sole substrate within a two-phase solid-state anaerobic digestion. *Syst. Appl. Microbiol.* 37: 590-600.
- Jabłoński, S., Rodowicz, P., Łukaszewicz, M. 2015. Methanogenic archaea database containing physiological and biochemical characteristics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 1360-1368.
- Kadam, R., Panwar, N. L. 2017. Recent advancement in biogas enrichment and its applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 73: 892-903.
- Kaparaju, P., Ellegaard, L., Angelidaki, I. 2009. Optimisation of biogas production from manure through serial digestion: Lab-scale and pilot-scale studies. *Bioresour. Technol.* 100: 701-709.
- Klass, D. L. 1984. Methane from anaerobic fermentation. *Science.* 223: 1021-1028.
- Kleerebezem, R., Lema, J. M., Loosdrecht, M. C. M. Van. 2005. Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 93: 592-606.
- Larson, E. D., Kartha, S. 2000. Expanding roles for modernized biomass energy. *Energy Sustain. Dev.* 4: 15-25.
- Lesteur, M., Bellon-Maurel, V., Gonzalez, C., Latrille, E., Roger, J. M., Junqua, G., Steyer, J. P. 2010. Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochem.* 45: 431-440.
- Mara, D., Horan, N. 2003. Handbook of Water and Wastewater Microbiology. 1st ed. Elsevier, London.
- McBee, R. H. 1954. The Characteristics of *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 67: 505-506.

- Mengistu, M. G., Simane, B., Eshete, G., Workneh, T. S. 2015. A review on biogas technology and its contributions to sustainable rural livelihood in Ethiopia. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 48: 306-316.
- Mori, K., Kamagata, Y. 2014. The Challenges of Studying the Anaerobic Microbial World. *Microbes Environ.* 29: 335-337.
- Murphy, J. D., McKeogh, E., Kiely, G. 2004. Technical/economic/environmental analysis of biogas utilisation. *Appl. Energy* 77: 407-427.
- Nielfa, A., Cano, R., Fdz-Polanco, M. 2015. Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnol. Reports.* 5: 14-21.
- Pachauri, R. K., Meyer, L., Allen, M. R. 2014. *Climate Change: Synthesis Report.* Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Parawira, W., Read, J. S., Mattiasson, B., Bjo, L. 2008. Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy* 32: 44-50.
- Parker, W. J., Jones, R. M., Murthy, S. 2008. Characterization of the COD/VSS ratio during anaerobic digestion of waste activated sludge: Experimental and modeling studies. *Civ. Environ. Eng.* 10: 524-533.
- Pavlostathis, S. G., Gomez, E. G. 2009. Critical reviews in environmental control kinetics of anaerobic treatment: A critical review, critical reviews in environmental control. *Rev. Environ. Control.* 21: 411-490.
- Ramsay, I. R., Pullammanappallil, P. C. 2001. Protein degradation during anaerobic wastewater treatment: Derivation of stoichiometry. *Biodegradation* 12: 247-257.
- Ren, N., Wang, B., Huang, J. 1997. Ethanol-Type Fermentation from Carbohydrate in High Rate Acidogenic Reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 54: 428-433.
- Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D. 2017. *Standard methods for the examination of water and wastewater.* 23rd ed. American Public Health Association. Washington, DC.
- Schink, B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 262-280.
- Stahel, W. R. 2016. Circular economy. *Nature* 531: 435-438.
- Stams, A. J. M., Plugge, C. M. 2009. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat. Microbiol.* 7: 568-577.
- Temudo, M. F., Poldermans, R., Kleerebezem, R., Loosdrecht, M. C. M. Van. 2008. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: A chemostat study. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 1088-1098.
- Weiland, P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 849-860.
- Wirth, R., Kovács, E., Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Kovács, K. L. 2012. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. *Biotechnol. Biofuels* 5: 1-16.