



**TESIS DOCTORAL**

**TRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICO-BIOLÓGICOS PARA  
OPTIMIZAR LA VALORIZACIÓN ENERGÉTICA DE RESIDUOS  
ORGÁNICOS**

**CONSOLACIÓN SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**PROGRAMA DE DOCTORADO MODELIZACIÓN Y EXPERIMENTACIÓN EN  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

Conformidad del Director:

Fdo. Francisco Cuadros Blázquez

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y de la Comisión Académica del programa.

Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la

Universidad de Extremadura

**2023**



## AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral son muchas las personas de las que he recibido apoyo, por ello no puedo dar por finalizado este trabajo sin aprovechar estas líneas para expresar mi profundo agradecimiento.

En primer lugar, agradecer a mi Director de Tesis, el Catedrático Dr. Francisco Cuadros Blázquez que gracias a las ganas y entusiasmo que trasmite en sus clases de Energías Renovables, hizo interesarme por el maravilloso mundo de la biometanización, hace ya más de 7 años. Gracias por haber creído siempre en mí, por animarme a iniciar mi camino hacia la investigación, por acompañarme y guiarme en este duro pero gratificante proceso, con un gran conocimiento y desde una perspectiva experta que ha sido fundamental para abarcar las experiencias de laboratorio. Agradecer a la Dra. Almudena González González por la dedicación empleada cada vez que la he necesitado.

Llegué con ilusión y muchas ganas de aprender, sin duda mis conocimientos adquiridos en estos años os los debo a vosotros. Gracias de corazón por vuestro tiempo, esfuerzo y dedicación.

Al Departamento de Física Aplicada, por acogerme con los brazos abiertos, por vuestra cercanía y disponibilidad para ayudarme con cualquier problema.

A mis padres y hermanos, por su incondicionalidad, apoyo y sosiego. Todo lo que soy es gracias a vosotros. Gracias por animarme, comprenderme y motivarme para alcanzar mis metas aún en los momentos difíciles. Sin duda os debo el mayor agradecimiento, os quiero. También, agradecer a toda mi familia y amigos que me han acompañado y sufrido durante esta etapa. Sé que os alegráis de todo lo bueno que consiga.

A mi compañero de vida, Fran, por ayudarme, creer en mí, estar siempre a mi lado y sacarme una sonrisa en los momentos de bajón, eres lo mejor y estoy agradecida con la vida por habernos encontrado.

A la empresa Metanogenia S.L., por compartir conmigo su conocimiento sobre mercado, industria y negocio. Gracias por enseñarme a usar algunos de vuestros métodos para poder completar mi Tesis doctoral.

A mi compañera Mercedes Aranda por su gran ayuda y apoyo en el día a día. Sin ti todo esto hubiera sido mucho más difícil, gracias por todos tus consejos.

Al departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, en especial a María de Guía, Santiago Ruiz-Moyano, Alicia Rodríguez y Alejandro Hernández. Que, sin conocerme, me abrieron las puertas de su departamento y me ofrecieron apoyo y ayuda con la PCR y con todo el mundo de la microbiología. Muchísimas gracias por vuestro tiempo y dedicación. Espero que podamos seguir colaborando juntos.

A ArteSerena S.L. y al matadero Veravic S.L. por la ayuda prestada y desinteresada en la recogida de los subproductos para la realización de los ensayos de digestión anaerobia.

Asimismo, me gustaría agradecer a la Junta de Extremadura y al Fondo Social Europeo por su apoyo a este trabajo a través de la financiación de mi contrato predoctoral para formación de Doctores en los centros públicos de I+D pertenecientes al Sistema Extremeño, con Ref. PD18050. Así como el apoyo económico prestado por la Junta de Extremadura y la Unión Europea (Fondos FEDER) a través de los proyectos con Ref.: GR15146; GR18081 y GR21180. También al Ministerio de Economía y Competitividad, España a través de las ayudas EMPLEA 2016. Y a la Unión Europea por los proyectos con Ref.: 0330\_IDERCEXA\_4\_E (Programa INTERREG) y 0475\_LOCALCIR\_4\_E.

Finalmente, agradecer al instituto Politécnico de Portalegre (Portugal) y, especialmente, al Profesor Dr. Paulo Brito y a mis compañeros Luis Calado, Roberta Panizio y Ana por su acogida en el “Centro de Investigaçã para a Valorizaçã de Recursos Endógenos, VALORIZA” donde realicé parte de las investigaciones de esta Tesis Doctoral.

*“La ciencia es la progresiva aproximación  
del hombre al mundo real”*

***Max Planck***

## ÍNDICE

---

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Preámbulo.....	5
Coherencia e importancia unitaria de la Tesis Doctoral .....	6
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. La industria agroalimentaria y sus subproductos .....	11
1.1.1. La Industria láctea y ganadera .....	12
1.1.2. La Industria avícola.....	16
1.2. Métodos de gestión y su problemática ambiental actual.....	19
1.2.1. Gestión de los subproductos de quesería-ganadería .....	19
1.2.2. Gestión de los subproductos de un matadero de aves .....	20
1.3. Tecnología de tratamiento. Digestión Anaerobia .....	22
1.4. Tratamientos para optimizar el proceso de DA.....	28
1.4.1. Tratamientos físico-químico .....	28
1.4.2. Tratamiento biológico .....	31
Capítulo 2. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA.....	35
2.1. Objetivos.....	37
2.1.1. Objetivo general .....	37
2.1.2. Objetivos específicos.....	37
2.2. Materiales y métodos.....	39
2.2.1. Dispositivo experimental. Digestor anaerobio semicontinuo.....	39
2.2.2. Preparación de los sustratos .....	39
2.2.2.1. Residuos de la quesería-ganadería .....	40
2.2.2.2. Residuos del matadero avícola .....	40
2.2.3. Preparación de materiales porosos.....	41

<b>2.2.4. Puesta en marcha del proceso de digestión anaerobia y metodología experimental.....</b>	<b>42</b>
<b>2.2.5. Métodos analíticos.....</b>	<b>42</b>
2.2.5.1. <i>pH</i> .....	42
2.2.5.2. <i>Sólidos totales, volátiles y minerales, en suspensión y disueltos</i> .....	43
2.2.5.3. <i>Ácidos grasos volátiles</i> .....	44
2.2.5.4. <i>Alcalinidad</i> .....	45
2.2.5.5. <i>Demanda Química de Oxígeno, DQO</i> .....	46
2.2.5.6. <i>Nitrógeno Kjeldahl</i> .....	47
2.2.5.7. <i>Carbono Orgánico Total (COT)</i> .....	48
2.2.5.8. <i>Analizador de Biogas 5000</i> .....	49
2.2.5.9. <i>Caracterización textural y morfológica del material poroso</i> .....	49
<b>2.2.6. Metodología para la estimación de los beneficios medioambientales de la digestión anaerobia.....</b>	<b>50</b>
<b>2.2.7. Metodología para la estimación del potencial energético de la biomasa residual húmeda. ....</b>	<b>52</b>
<b>2.2.8. Metodología para el dimensionado de plantas de digestión anaerobia .....</b>	<b>53</b>
2.2.8.1. <i>Dimensionado del tanque de mezcla y alimentación</i> .....	53
2.2.8.2. <i>Dimensionado del digestor anaerobio y de su aislamiento</i> .....	54
2.2.8.3. <i>Dimensionado del tanque de almacenamiento</i> .....	54
2.2.8.4. <i>Dimensionado del separador sólido-líquido</i> .....	54
2.2.8.5. <i>Dimensionado del gasómetro</i> .....	55
2.2.8.6. <i>Dimensionado del triturador</i> .....	55
<b>2.2.9. Metodología para la evaluación de la viabilidad económica de plantas de biometanización industriales .....</b>	<b>55</b>
2.2.9.1. <i>Costes de instalación</i> .....	56
2.2.9.2. <i>Inversión total</i> .....	56
2.2.9.3. <i>Gasto anual</i> .....	56

2.2.9.4. <i>Ingreso anual</i> .....	56
2.2.9.5. <i>Beneficios anuales</i> .....	57
2.2.9.6. <i>Parámetros económicos</i> .....	57
<b>2.2.10. Metodología seguida para la optimización de los protocolos de qPCR SYBR Green</b> .....	<b>58</b>
2.2.10.1. <i>Cepas de arqueas productoras de metano</i> .....	58
2.2.10.2. <i>Extracción de ADN</i> .....	59
2.2.10.3. <i>Diseño de Primers</i> .....	59
2.2.10.4. <i>Optimización de las condiciones de PCR en tiempo real</i> .....	60
2.2.10.5. <i>Curvas estándar, sensibilidad y especificidad</i> .....	61
2.2.10.6. <i>Reproducibilidad y repetibilidad</i> .....	62
2.2.10.7. <i>Aplicabilidad del método qPCR desarrollado</i> .....	63
2.2.10.8. <i>Análisis estadístico</i> .....	63
<b>Capítulo 3. DESCRIPCIÓN DE LAS PUBLICACIONES</b> .....	<b>65</b>
<b>3.1. Waste valorization as an example of circular Economy in Extremadura (Spain)</b> .....	<b>67</b>
3.1.1. <b>Datos editoriales</b> .....	67
3.1.2. <b>Indicios de calidad</b> .....	67
3.1.3. <b>Resumen</b> .....	67
3.1.4. <b>Resultados</b> .....	68
<b>3.2. Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura (Spain)</b> .....	<b>71</b>
3.2.1. <b>Datos editoriales</b> .....	71
3.2.2. <b>Indicios de calidad</b> .....	71
3.2.3. <b>Resumen</b> .....	72
3.2.4. <b>Resultados</b> .....	72
<b>3.3. Charcoal as a bacteriological adherent for biomethanation of organic wastes</b> .....	<b>75</b>

3.3.1. Datos editoriales.....	76
3.3.2. Indicios de calidad .....	76
3.3.3. Resumen .....	76
3.3.4. Resultados .....	77
3.4. Development of real-time polymerase chain reaction methods for the quantification of <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanosarcina</i> and <i>Methanobacterium</i> in anaerobic digestion.....	80
3.4.1. Datos editoriales.....	80
3.4.2. Indicios de calidad .....	80
3.4.3. Resumen .....	80
3.4.4. Resultados .....	81
Capítulo 4. DISCUSIÓN.....	89
Capítulo 5. CONCLUSIONES .....	95
5.1. Conclusiones generales.....	97
5.2. Conclusiones específicas.....	99
5.3. Líneas futuras de trabajo.....	104
Capítulo 6. REFERENCIAS .....	107
6.1. Referencias utilizadas en la Tesis Doctoral .....	109
6.2. Referencias utilizadas en los artículos científicos .....	121
Capítulo 7. RELACIÓN DE PUBLICACIONES.....	129
7.1. Artículos indexados en Journal Citation Reports .....	131
7.2. Artículo enviado para publicación en JCR.....	132
7.3. Capítulo de libro publicado en editorial <i>Springer</i> .....	132
7.4. Otros capítulos de libro.....	133
7.5. Comunicaciones presentadas a congresos internacionales .....	133
7.6. Pósteres presentados a congresos Internacionales .....	134
7.7. Comunicaciones presentadas a congresos Nacionales.....	134
ANEXOS.....	137



## ÍNDICE DE TABLAS

---

### Capítulo 1

**Tabla 1.** Relación de artículos científicos del compendio de publicaciones ..... 7

**Tabla 1.2.** Parámetros del agua residual de mataderos avícolas. Fuente: Ref. [34]. ..... 19

### Capítulo 3

**Tabla 3.1.** Caracterización de la materia prima residual utilizada en este trabajo..... 69

**Tabla 3.2.** Viabilidad económica de la planta DA..... 70

**Tabla 3.3.** Preparación de los materiales porosos antes de la biometanización ..... 73

**Tabla 3.4.** Caracterización fisicoquímica del sustrato 80 % suero de queso/20 % estiércol de oveja ..... 73

**Tabla 3.5.** Parámetros característicos de los dos experimentos de DA prolongados (12 TRH). 74

**Tabla 3.6.** Viabilidad económica de la planta de DA..... 75

**Tabla 3.7.** Área superficial, volúmenes de poros y densidad del carbón vegetal de encina..... 79

**Tabla 3.8.** Secuencia de nucleótidos de los primers diseñados para los ensayos SYBR Green qPCR ..... 82

**Tabla 3.9.** Resultados de los diferentes ensayos de qPCR con los primers diseñados ..... 83

**Tabla 3.10.** Resultados obtenidos en el ensayo para determinar la especificidad de los protocolos de PCR en tiempo real optimizados para cuantificar específicamente Methanoculleus, Methanobacterium y Methanosarcina..... 85

**Tabla 3.11.** Eficiencia de amplificación y  $R^2$  obtenida a partir de curvas estándar de arqueas productoras de metano por PCR en tiempo real..... 86

**Tabla 3.12.** Prueba de repetibilidad realizada por el mismo operario en el mismo equipo..... 86

**Tabla 3.13.** Resultados obtenidos en los ensayos de inhibición para probar el efecto del sustrato en la cuantificación mediante los ensayos de qPCR desarrollados en este estudio..... 87

**Tabla 3.14.** Resultados de la aplicabilidad de los métodos de PCR en tiempo real (qPCR) desarrollados para la cuantificación del género productor de metano en un lodo digerido procedente de la biometanización de residuos orgánicos de la industria del tomate ..... 88

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

### Capítulo 1

<b>Figura 1.1.</b> Diagrama de flujo del proceso productivo del queso de oveja .....	13
<b>Figura 1.2.</b> Fotografía de un estiércol de oveja de Extremadura.....	15
<b>Figura 1.3.</b> Fotografía del suero lácteo generado en Arteserena S.L. ....	16
<b>Figura 1.4.</b> Diagrama de flujo del proceso de un matadero de aves en Cáceres. Extremadura..	17
<b>Figura 1.5.</b> Diagrama de circularidad de una planta piloto de biometanización híbrida para la industria lácteo-ganadera.....	22
<b>Figura 1.6.</b> Fotografía de la planta piloto de biometanización híbrida. Ubicación: Campos de Prácticas de la Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura .....	23
<b>Figura 1.7.</b> Diagrama de flujo de una planta piloto de biometanización híbrida .....	24
<b>Figura 1.8.</b> Proceso de la Digestión Anaerobia. Fuente: Ref. [57].....	25
<b>Figura 1.9.</b> Diagramas esquemáticos de los ensayos: (A) SYBR Green y (B) TaqMan durante los procedimientos PCR de desnaturalización, recocido y extensión. Fuente: Ref. [94] .....	33

### Capítulo 2

<b>Figura 2.1.</b> a) Fotografía de un reactor semicontinuo a escala de laboratorio sumergido en un baño térmico; b) Esquema de un reactor semicontinuo .....	39
<b>Figura 2.2.</b> Configuración del reactor desarrollada para introducir los materiales porosos.....	41
<b>Figura 2.3.</b> Equipo de destilación Kjeldahl .....	48
<b>Figura 2.4.</b> Esquema resumen de los pasos seguidos para la optimización de los tres métodos de qPCR .....	58
<b>Figura 2.5.</b> Sistema de qPCR StepOne™ (Applied Biosystem) .....	60

### Capítulo 3

<b>Figura 3.1.</b> Evolución de la producción de biogás (TRH=13 días).....	69
<b>Figura 3.2.</b> Caracterización morfológica del carbón vegetal. Imágenes tomadas en MEB.....	77
<b>Figura 3.3.</b> La espectroscopia de rayos X de dispersión de energía.....	78
<b>Figura 3.4.</b> Isoterma de adsorción de nitrógeno del carbón vegetal de encina.....	78

## Resumen

El crecimiento demográfico y el desarrollo económico en todo el mundo aumentan el consumo de energía (principalmente de combustibles fósiles), así como la generación de residuos. Las enormes cantidades de subproductos orgánicos que se generan en las industrias lácteo-ganaderas y avícolas, y su inadecuada gestión, las hacen ser unas de las grandes responsables de las emisiones de gases de efecto invernadero liberados al medio ambiente.

La Digestión anaerobia (DA) o la biometanización es una tecnología muy prometedora por su capacidad para degradar gran parte de este tipo de materia orgánica y transformarla en dos subproductos de valor añadido, biogás (energía renovable) y un efluente digerido rico en nutrientes, que puede actuar como materia prima para la fabricación de fertilizantes (compost). Si previamente este efluente se decanta, es posible recuperar alrededor del 60 % del agua del residuo inicial, que puede usarse para riego de cultivos cuyo fruto no entre en contacto con ella, cerrando el ciclo natural de dicho subproducto (Economía Circular).

Optimizar la valoración energética proporcionada por esta tecnología es de vital importancia para asegurar la viabilidad económica del proceso a escala industrial.

El objetivo de la Tesis Doctoral es fomentar la Economía Circular (EC), incrementar la competitividad económica de estas industrias, así como reducir los impactos medioambientales asociados a su actividad productiva. Para ello, se han desarrollado e implementado innovaciones que maximizan el rendimiento energético, económico y medioambiental, asegurando, además, la estabilidad del proceso anaerobio.

En este sentido se ha determinado la proporción de cada subproducto y las condiciones de operación que favorecen el proceso biológico. Además, se ha desarrollado un tratamiento que permite mejorar más de un 20 % el rendimiento energético del proceso gracias a la adición de un material poroso, el carbón vegetal obtenido a partir de madera de encina, que actúa como adherente bacteriano, es decir, impide la salida del reactor (digestor) de los microorganismos responsables de la producción de metano (energía).

## Resumen

Este incremento en la producción de metano hace que un proyecto industrial de biometanización sea económicamente viable, lo que favorece la implantación de esta tecnología en el contexto de una EC.

Por otro lado, la detección y cuantificación de los microorganismos que intervienen en el proceso de DA es esencial para conocer la dinámica, la composición, el metabolismo o la actividad del proceso anaeróbico. Así pues, otra contribución de la Tesis Doctoral ha sido el desarrollo con éxito de tres métodos de qPCR basados en SYBR Green que permiten la detección y cuantificación rápida y confiable de los miembros más relevantes de las comunidades metanogénicas de digestores anaerobios, es decir, *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina*. Estos métodos han demostrado que son rápidos, eficientes, sensibles y reproducibles lo que permite optimizar y controlar parte del proceso biotecnológico.

**Abstract**

Both population and economic growth across the world increase energy consumption (fossil fuels, mainly), as well as waste generation. The enormous quantities of organic by products derivatives from dairy, livestock, and poultry industries are one of the main responsible to greenhouse gas emission sources that are released into the environment due to inadequate management.

Anaerobic digestion (AD) or biomethanation is a very promising technology because of its ability to degrade significant proportions of this kind of organic matter and to transform it into two value-added by-products: biogas (renewable energy) and a nutrient-rich digested effluent which can act as a raw material for the manufacture of fertilisers (compost). If this digested effluent is previously decanted, it is possible to recover around 60 % of the water from the initial waste, which can be used to irrigate crops whose fruit does not come into contact with it, thus closing the natural cycle of this by-product (Circular Economy).

Optimising the energy valuation provided by this technology is of paramount importance to assure the economic viability of the process at the industrial level.

The doctoral thesis aims to promote the Circular Economy (CE), increase competitiveness among these industries, as well as to reduce the environmental impacts associated with their productive activity. For that purpose, innovations have been developed and implemented to maximise the energetic, economic and environmental performance and to assure the stability of the anaerobic process.

Accordingly, the proportion of each by-product and the operating conditions that favour the biological process have been determined. In addition, a treatment has been developed to allow an improvement of an average of 20 % of the energetic performance of the process, thanks to the addition of a porous material—charcoal obtained from holm oak wood—that acts as a bacterial adherent, i.e., it prevents the responsible microorganisms of methane (energy) generation from scaping from the reactor (digester).

## Abstract

This increase in methane production makes an industrial project of biomethanation economically feasible, which favours this technology implementation in the context of a CE.

On the other hand, the detection and quantification of the micro-organisms involved in the AD process is essential to understand the dynamics, composition, metabolism or activity of the anaerobic system. Thus, another contribution of this Doctoral Thesis has been the successful development of three qPCR methods based on SYBR Green that allow rapid and reliable detection of the most relevant members of the methanogenic communities of anaerobic digesters, i.e., *Methanoculleus*, *Methanobacterium*, and *Methanosarcina*. These protocols have been proven to be fast, efficient, sensitive, and reproducible, which allows optimisation and control of part of the biotechnological process.

## **Preámbulo**

Entre la oferta de Programas de Doctorado recogidos en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, modificado por los Real Decreto 534/2013, de 12 de julio, Real Decreto 43/2015, de 2 de febrero, y Real Decreto 195/2016, de 13 de mayo, esta Tesis Doctoral se encuadra en el programa “Modelización y Experimentación en Ciencia y Tecnología”, ya que incluye investigación aplicada en el campo de la Física.

La elaboración de esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo bajo los criterios establecidos por el artículo 33 “Tesis doctorales presentadas como compendio de publicaciones” y por el artículo 43 “Mención Internacional”, de la Resolución de 14 de diciembre de 2021 (DOE de 28 de diciembre de 2021), que aprueba la Normativa de Doctorado de la Universidad de Extremadura. En dicha Resolución se exponen los requisitos necesarios para la publicación de la Tesis Doctoral por compendio de publicaciones y los requisitos para que el título de Doctor pueda incluir la mención de Doctorado Internacional.





## **Coherencia e importancia unitaria de la Tesis Doctoral**

La presente Tesis Doctoral se compone de un total de cuatro artículos científicos que tienen un objetivo general común: la optimización de la Digestión Anaerobia de los subproductos de la industria agroalimentaria para maximizar el rendimiento energético, económico y medioambiental del proceso en el contexto de una Economía Circular.

A partir de estos artículos científicos se cumplen con todos los objetivos plasmados en el Capítulo 2. Estos estudios se enmarcan en una misma línea de investigación: el uso de tratamientos físico-químico-biológicos para maximizar la valorización energética, económica y medioambiental de los subproductos del sector agroalimentario extremeño; más concretamente, las publicaciones tienen una línea común: promocionar el uso y la biodegradación de los subproductos que se generan en las industrias queseras y avícolas mediante la tecnología de la DA para mejorar la sostenibilidad productiva de dichas empresas. Para ello, se han implementado varios tratamientos de bajo coste que, no solo mejoran los rendimientos energéticos, sino que monitorizan la estabilidad del proceso y los hace más atractivos desde el punto de vista económico para las industrias del sector.

Todas las revistas en las que se han publicado los artículos están indexadas en la *Web of Science* (WOS) del *Institute for Scientific Information* (ISI) y dentro de los recursos de investigación del *Journal Citation Reports* (JCR), concretamente en la base de datos de *Science Citation Index* (SCI). De los cuatro artículos que componen el compendio de la Tesis Doctoral, tres se encuentran en el primer cuartil y también están incluidas en el primer decil y uno en el tercer cuartil. El título de los artículos que conforman el compendio se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Relación de artículos científicos del compendio de publicaciones

<b>Identificación</b>	<b>Título</b>
Artículo 1	Waste valorization as an example of circular Economy in Extremadura (Spain).
Artículo 2	Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura (Spain).
Artículo 3	Charcoal as a bacteriological adherent for biomethanation of organic wastes.
Artículo 4	Development of real-time polymerase chain reaction methods for the quantification of <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanosarcina</i> and <i>Methanobacterium</i> in anaerobic digestion.

La Tesis Doctoral se ha organizado en cuatro Capítulos, cuyos contenidos son los siguientes:

En el Capítulo 1 se destaca la importancia que presentan las industrias agroalimentarias desde el punto de vista económico y medioambiental en la actualidad en Extremadura. Se definen los subproductos que se generan en cada una de ellas y se detallan los métodos de gestión que se emplean actualmente, relacionándolos con la problemática medioambiental asociada. En este capítulo, también se propone como alternativa para gestionar de forma adecuada todos los subproductos orgánicos la tecnología de Digestión Anaerobia y se realiza un análisis exhaustivo de las principales investigaciones relacionadas con la mejora del rendimiento energético y de la estabilidad de la DA debido al empleo de tratamientos físico-químico-biológicos.

En el Capítulo 2 se muestra el objetivo general de la Tesis Doctoral, los objetivos específicos planteados y se exponen los materiales y la metodología empelada en este trabajo.

En el Capítulo 3 se presentan las cuatro publicaciones que conforman el compendio de artículos de la Tesis Doctoral, mostrando los indicios de calidad de las publicaciones, un resumen de cada una y los principales resultados obtenidos.

En el Capítulo 4 se discuten los resultados obtenidos en la presente investigación, estableciendo las principales contribuciones y el alcance de los resultados.

En el Capítulo 5 se exponen las conclusiones de la Tesis Doctoral y se presentan las líneas de trabajo futuras derivadas de la investigación, destacando la utilidad del conocimiento generado para la comunidad científica.

En el Capítulo 6 se presentan las referencias bibliográficas y finalmente, en el capítulo 7 se muestran los artículos científicos, los capítulos de libros y las comunicaciones presentadas y pósteres derivados de la Tesis Doctoral.

Los resultados desarrollados en la presente Tesis Doctoral establecen una línea de investigación aplicada muy ambiciosa, pero a la vez muy prometedora y novedosa, ya que aborda, dentro de un modelo de Economía Circular, el aprovechamiento conjunto de varios tipos de subproductos que se generan abundantemente en muchos países del mundo (y que suelen estar mal gestionados) para aumentar el rendimiento energético del proceso de DA y así promocionar la implantación de plantas industriales de biometanización, y, por otro lado, monitorizar y cuantificar la microbiota principal que interviene en el proceso para controlar su estabilidad.



# **Capítulo 1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1. La industria agroalimentaria y sus subproductos**

El sector agroalimentario ha ido ganando cada vez más atención en los últimos años. Datos recientes han indicado que para 2050, se espera que la población mundial aumente a 9.700 millones [1], lo que implica que la demanda de alimentos aumentará en un 70 % [2] y con ello, se generará una mayor cantidad de desechos que presentará una grave amenaza para el medio ambiente, así como a las condiciones sociales, económicas y de salud de las personas [3].

Debido a esta alarmante situación, se han puesto en marcha numerosas iniciativas conjuntas entre los estados miembros de la Unión Europea (UE), como el Pacto Verde, [4], la Estrategia Farm to Fork (De la Granja a la Mesa) [5] y la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, que incluye 17 objetivos de desarrollo sostenible (ODS) [6,7] creados para reducir los impactos ambientales en la producción de alimentos, con el fin de asegurar una cadena productiva constante y sostenible [8].

La industria agroalimentaria es la principal actividad de la industria manufacturera europea, representando el 14,2 % de su facturación total y un valor superior al billón de euros. Cuenta con unas 289.000 empresas y es la principal fuente de empleo de la Unión Europea, más del 10 % de población trabaja en la industria alimentaria [9].

Por otro lado, la industria agroalimentaria española ocupa el cuarto puesto en valor de ventas mundial tras, Francia, Alemania e Italia, y representa actualmente el 12,8 % del Valor Añadido Bruto (VAB) de este sector de la economía [10]. Esta industria tiene un gran peso en la economía de Extremadura, en una región con una población que ronda el millón de habitantes, tanto la agricultura como la ganadería proporcionan la base para un sector industrial cimentado en la transformación de estos productos. La mayoría de dichas empresas, 9 de cada 10 empresas, son Pymes con menos de 10 empleados [11].

Los impactos ambientales de la industria agroalimentaria están impulsados en gran medida, entre otras, por las industrias lácteo-ganaderas y las avícolas.

La producción ganadera representa del 3 al 8 % del consumo total de energía y emite el 14,5 % de las emisiones antropógenas totales de los gases de efecto

invernadero (GEI) en todo el mundo [12], asociado con las emisiones de óxido nitroso ( $N_2O$ ) y metano ( $CH_4$ ) provenientes de la fermentación entérica, actividades de fertilización y almacenamiento de estiércol [13]. A pesar de su relevancia, no se deben ignorar los impactos de este sector sobre otros aspectos ambientales, como la eutrofización, la acidificación y la escasez de agua [14].

Por otro lado, la producción de la industria avícola supone el 8 % de las emisiones de gases de efecto invernadero a nivel mundial, de las cuales un 11 % se debe a la inadecua gestión y almacenamiento de la gallinaza [15]. Los principales gases de GEI son el amoníaco ( $NH_3$ ), óxido nitroso ( $N_2O$ ), metano ( $CH_4$ ) y dióxido de carbono ( $CO_2$ ) que afectan tanto al medioambiente (eutrofización y cambio climático) como a la salud pública.

Conceptos como el de ecoeficiencia, que puede definirse como la capacidad simultánea de lograr resultados económicos aceptables con la menor degradación posible del medio ambiente, se han convertido en un tema de gran relevancia en el mundo científico y político [16].

Por ello, debido al potencial económico, medioambiental y energético que representan estas dos industrias en nuestro país en general, y en nuestra región en particular, la presente tesis se centra en el estudio de cada una de ellas.

### **1.1.1. La Industria láctea y ganadera**

Hoy en día, la leche es uno de los alimentos más producidos en el mundo, siendo un pilar fundamental de la dieta humana [17]. En el contexto de la Unión Europea, España es el séptimo mayor productor de leche de vaca de Europa, tras Alemania, Francia, Reino Unido, Holanda, Italia e Irlanda. La mayor potencia en leche de oveja, solo superados por Grecia, y la segunda en leche de cabra, después de Francia [18].

Los últimos datos publicados por el Fondo de Garantía Agraria de España [19] muestran que la industria láctea española procesa más de 7 millones de  $m^3$  de leche.

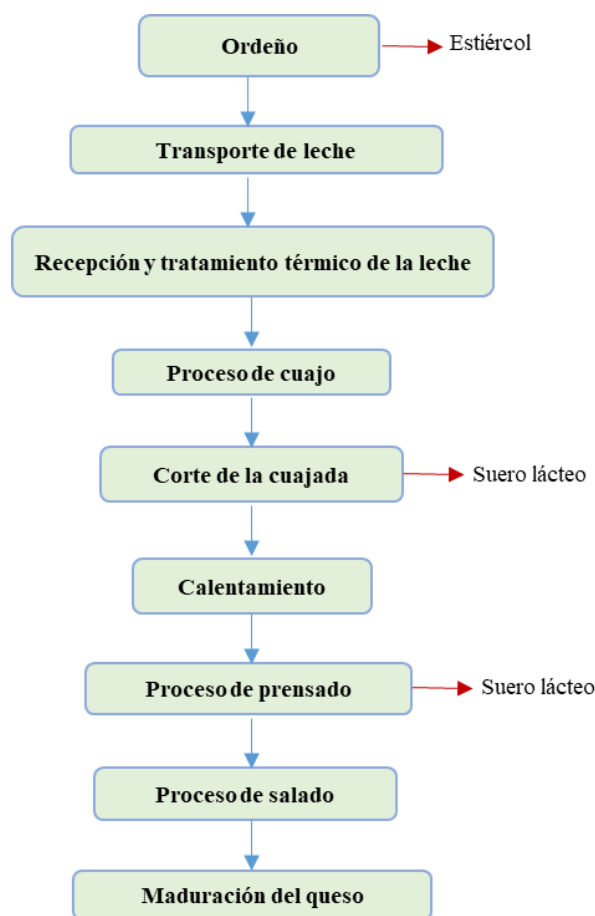
El queso es el segundo derivado lácteo más consumido en nuestro país con 347 millones de kilos al año, solo por detrás de la categoría de yogures y otras leches fermentadas.



La producción de queso en España se sitúa en torno a las 400.000 toneladas, con especial presencia de los quesos de oveja y de cabra.

Si nos referimos al queso de oveja, la producción de leche representa el 15 % del total nacional, con más de medio millón de toneladas que, convertidas en queso, suponen el 35 % del total europeo, con un valor de unos 450 millones de euros [20].

Con el objetivo de tener una visión general del proceso y analizar cada una de las etapas que la forman, a continuación, se muestra el diagrama de flujo del proceso de elaboración del queso de oveja (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Diagrama de flujo del proceso productivo del queso de oveja

La primera etapa que tiene lugar es el ordeño de las ovejas. Este es un proceso que se realiza de un modo totalmente mecanizado, para asegurarse que el manejo sea totalmente higiénico y la leche que se obtenga se encuentre libre de impurezas.

Se necesitan unas 20 ovejas para obtener los 5 o 6 litros requeridos para elaborar un queso de 1 kilogramo [21]. La leche de oveja que se obtiene en las explotaciones ganaderas, se mantiene refrigerada en tanques a 4° C; después, ésta se transporta en camiones cisternas isoterms.

La tercera fase es la recepción de la leche y posterior tratamiento térmico. Aquí, se realiza un control de la calidad de la materia prima de la leche, tanto a nivel microbiológico, como químico y físico. Se eliminan cualquier impureza sólida que pueda contener. El proceso de coagulación de la leche consiste básicamente en la coagulación de las enzimas. O lo que es lo mismo, la leche se cuaja, para lo cual se utiliza un cuajo de origen animal (estómago de rumiantes lactantes) o vegetal (flor del cardo). Para cada tipo de queso de oveja es importante no solo la cantidad de ácido láctico que se forme, sino también la etapa del proceso donde la forme. La formación del coágulo con la leche cruda será más fuerte perdiendo menos materia seca en el suero. La temperatura y el tiempo del cuajado es factor determinante del tipo de queso de oveja a elaborar. A continuación, se procede al corte de la cuajada, que consiste en cortar la leche con cuchillas para favorecer la salida del suero retenido en la masa (desuerado). Dicho corte fracciona la cuajada en granos de tamaños variables según el tipo de queso de oveja. Durante la etapa de calentamiento, la leche es calentada a 30-40 °C. Esta etapa es fundamental en la textura final del queso, y es que cuanto menos tiempo dure el calentamiento, más blando será el queso resultante. Este proceso garantiza la inocuidad del queso de oveja. Otra de las etapas donde se genera suero lácteo es el prensado, en la que la cuajada, cortada en finos granos, se extrae de la cuba de trabajo y se introduce en cada uno de los moldes de manera manual. Cuando finalice esta etapa, la forma del queso será definitiva.

Una vez que se hayan sacado los quesos de los moldes, se realiza el procedimiento de salado, que es el último paso en la elaboración de los mismos. Se trata de extender la sal sobre el queso, o de sumergir esta pieza en una salmuera para favorecer la formación de la corteza evitando que se desarrolle excesivamente la flora microbiana y a la vez concediendo un sabor propio al queso de oveja. Finalmente, durante la fase de maduración es cuando el queso adquiere su sabor y aroma definitivo. En función de la duración del proceso de madurado, podemos obtener quesos frescos, semicurados o curados.

Como se puede observar (Figura 1.1), la elaboración del queso conlleva la generación de varios tipos de subproductos, el estiércol de oveja y el suero lácteo.

- **El estiércol de oveja** suele llevar una componente importante de paja (u otro componente lignocelulósico) que sirve como cama para recoger las deyecciones de este tipo de ganado (Figura 1.2). Aunque la composición agroquímica puede variar en función de lo comentado anteriormente, suele estar compuesto por un 2,09 % de nitrógeno, 0,36 % de fósforo y 0,66 % de potasio. El contenido de materia orgánica suele estar comprendido entre un 32,96 % y un 45,6 % y el pH entre 7,43 y 8,5 [22]. El estiércol además está formado por oligoelementos como el Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (Fe), y Manganeso (Mn) [23].



**Figura 1.2.** Fotografía de un estiércol de oveja de Extremadura

- **El suero lácteo o lactosuero**, es un líquido translúcido y amarillento (Figura 1.3) obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína [24]. Se estima que por cada kilogramo de queso se producen 9 kg de lactosuero, esto representa cerca del 85-90 % del volumen de la leche y contiene aproximadamente el 55 % de sus nutrientes [25]. Entre los más abundantes están la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales [26].

Este gran contenido de nutrientes genera aproximadamente 40 g de demanda biológica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y entre 50-70 g de demanda química de oxígeno (DQO) por cada litro de lactosuero líquido.

Además, cerca del 90 % de esta carga es aportada por el contenido de lactosa, la cual posee un tipo de enlace entre sus azúcares que hace que muchos microorganismos no sean capaces de degradarla [27].



**Figura 1.3.** Fotografía del suero lácteo generado en Arteserena S.L.

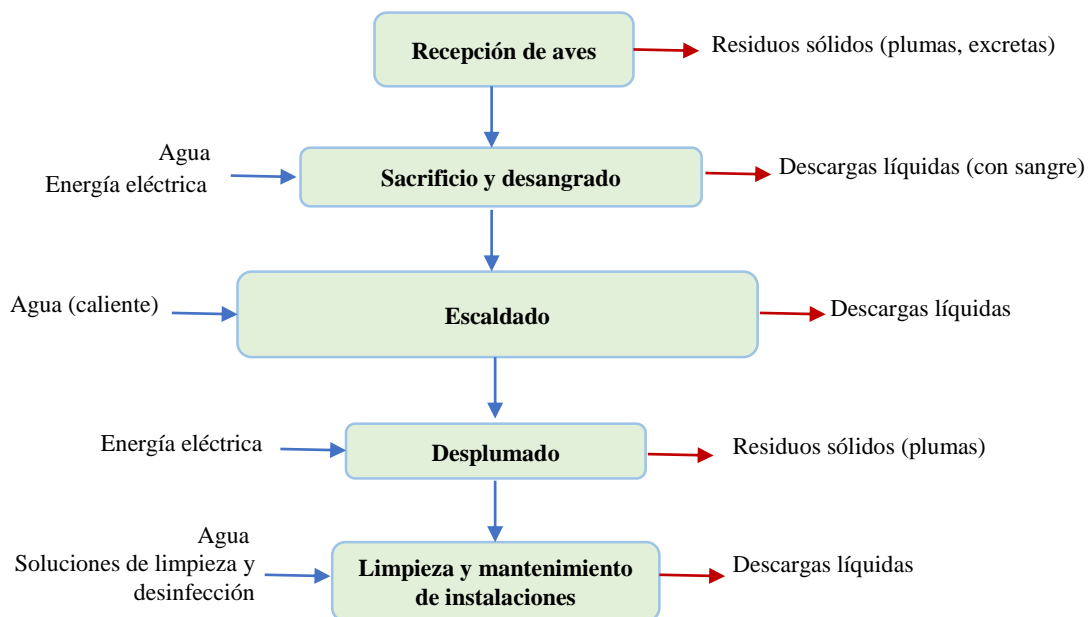
### **1.1.2. La Industria avícola**

El sector avícola es el segundo mayor productor mundial de carne con un 33 %, tan sólo superado por el porcino (37 %). En España, la industria avícola es una de las que mayor crecimiento ha experimentado en los últimos años, ocupando el cuarto lugar en producción de huevos a nivel europeo por detrás de Alemania, Francia e Italia [28, 29].

Actualmente, en España, semanalmente se sacrifican 5,4 millones de aves para el consumo humano, cuyo tonelaje aproximado es de 10 millones. En Extremadura, el sector avícola también constituye una parte importante del sector agroalimentario.

Las cifras de sacrificio de ganado en la región (en número de cabezas avícolas) suponen un 5,28 % sobre los totales nacionales [30].

Las operaciones fundamentales de un matadero de aves se exponen en la Figura 1.4 y pueden agruparse en las siguientes fases: Recepción de aves, sacrificio y desangrado, escaldado, desplumado y limpieza y mantenimiento de instalaciones, las cuales se describen con mayor detalle a continuación.



**Figura 1.4.** Diagrama de flujo del proceso de un matadero de aves en Cáceres. Extremadura

En primer lugar, las aves a su ingreso en el matadero se someten a una inspección ante-mortem, luego de la cual se espera un máximo de dos horas hasta que disminuya su nivel de estrés para lograr un mejor proceso de desangrado. Durante este lapso, los niveles de temperatura y humedad se mantienen controlados para garantizar el bienestar del animal antes del sacrificio.

Los animales cuya inspección indique un posible riesgo para su consumo, se sacrifican fuera de la línea normal de faenamiento donde se les hace un seguimiento post-mortem.

Una vez relajadas, las aves se sujetan cabeza abajo por las patas, y en una línea transportadora se conducen al proceso de aturdimiento sumergiendo su cabeza en un canal de agua con electricidad de voltaje reducido (ajustado en función del tamaño de las aves). El intervalo de tiempo entre la suspensión y el aturdimiento debe ser lo más corto posible (inferior a un minuto). Para el proceso de desangrado las aves se degüellan sin desprender su cabeza y la sangre se recolecta en el canal de desangramiento o en recipientes exclusivos para ese fin. A continuación, las aves se sumergen durante 3 minutos en agua caliente, a una temperatura de entre 50 °C y 60 °C, a fin de dilatar los folículos de la piel y facilitar la extracción de las plumas.

La extracción de las plumas puede efectuarse de dos formas: una, retirándolas de forma manual y recolectándolas en recipientes y el otro método es automático, a través de una desplumadora con cepillos que desprende las plumas y las arroja a placas recolectoras desde donde se transportan hacia un contenedor. Una vez desplumado, es necesario lavar el cuerpo del ave faenada para disminuir la carga bacteriana superficial. Las cabezas y patas, consideradas subproductos, se cortan posteriormente y se destinan para consumo humano, retirando aquellas partes no comestibles por medio de calor o tratamientos mecánicos (ej. extracción piel, uñas).

Al finalizar el proceso, es necesario efectuar la limpieza y desinfección de las diferentes áreas, equipos y herramientas utilizados, para garantizar así su inocuidad. Los residuos sólidos se recolectan y almacenan en áreas específicas para su disposición final (entrega a recolectores o gestores de basuras).

Los efluentes, dependiendo de su carga contaminante, se redirigen a una planta de tratamiento de aguas residuales. La tecnología de funcionamiento de la planta puede ser de diversa índole, sea con trampa de grasas (para separar sólidos flotantes), sedimentador (separación de sólidos en suspensión), tratamientos biológicos (para reducir los niveles de la materia orgánica soluble o nutrientes, entre otros compuestos) y cloración (para desinfección del agua) [31].

Los principales subproductos que se generan en los mataderos de aves son: la sangre, las aguas residuales y el fango que sale de la depuradora (Figura 1.4).

- **La sangre de pollo** es un fluido corporal del ave y se considera una víscera o despojo. Es rica en nutrientes (hierro) y tiene una elevada carga orgánica, en concreto, una DQO de 375 gO<sub>2</sub>/L. El total de sangre por animal puede suponer entre un 3-5 % del total del peso del animal en el caso de las aves [32].

Si la sangre se recoge en condiciones higiénicas y se almacena adecuadamente, puede considerarse como subproducto utilizable en otras industrias (alimentaria, farmacéutica, cosmética, etc.). Sin embargo, la mayoría de los mataderos carecen de la infraestructura adecuada para recoger la sangre categorizada como higiénica, para uso alimentario.

- **Las aguas residuales** de un matadero avícola van a estar compuestas por restos de materias primas, contenido intestinal, excrementos, cantidades de desinfectantes y detergentes. Las características principales de estas aguas residuales son el elevado aporte de nitrógeno, una alta carga tanto orgánica como de sólidos y un elevado contenido de grasa derivada de los restos de sangre, proteínas, microorganismos, fragmentos de plumas, contenido intestinal y excrementos. Además, posee amonio, urea y fosfatos [33] (Tabla 1).

**Tabla 1.2.** Parámetros del agua residual de mataderos avícolas. Fuente: Ref. [34]

<b>Parámetros (unidades)</b>	<b>Resultado</b>
<b>DBO<sub>5</sub> (kg/t canal)</b>	2,46-43
<b>DQO (kg/t canal)</b>	4-41
<b>Nitrógeno (g/t canal)</b>	560-4652
<b>Fósforo (g/t canal)</b>	26,2-700
<b>Sólidos en suspensión (g/t canal)</b>	48-700

- **Los Fangos activos:** Son los lodos activados que se obtienen tras los tratamientos aerobios, es decir, los lodos que se adquieren una vez terminado el tratamiento biológico y tras realizar la decantación. Se suelen caracterizar por contener una gran materia orgánica [33].

## **1.2. Métodos de gestión y su problemática ambiental actual**

### **1.2.1. Gestión de los subproductos de quesería-ganadería**

En la actualidad, el procedimiento más utilizado para el tratamiento del estiércol ovino es la aplicación directa a campos de cultivo. En épocas anteriores, el medio ambiente era capaz de soportar la descarga de los estiércoles porque los sistemas de producción no eran tan intensivos, pero hoy en día es necesario implantar sistemas de tratamiento y gestión antes de su vertido al medio ambiente [35].

El estiércol de oveja es uno de los mejores materiales residuales para obtener abono para las plantas, sin embargo, es aconsejable dejarlo madurar o compostarlo porque si se deposita directamente al cultivo puede desestabilizarlo, quemarlo o acidificarlo. Otro de los motivos por los que se desaconseja la aplicación directa de este subproducto es por la gran cantidad de semillas adventicias que contienen. Muchas de estas semillas atraviesan intactas el sistema digestivo de estos pequeños rumiantes pudiendo germinar en los cultivos [36].

Por ello, para incrementar su calidad como enmendante agrícola debería someterse a algún tipo de tratamiento biológico, ya que la introducción de materia orgánica no mineralizada en el suelo ralentiza su incorporación y puede contaminar los recursos hídricos por procesos de escorrentía [37].

El suero lácteo generado por las queserías se utiliza por lo general para la alimentación animal. Este procedimiento genera gastos de transporte y no aporta ningún tipo de beneficio para la industria quesera [38].

El suero de queso es una fuente de componentes valiosos (especialmente azúcar y proteínas solubles) pero representa una exposición negativa que puede impactar profundamente tanto económica como ambientalmente (eutrofización de las aguas) debido a su alta demanda química de oxígeno (50-70 g/L) y demanda biológica de oxígeno (40-60 g/L) [39]. Las alternativas más comunes para el procesamiento del lactosuero son la fabricación de bebidas probióticas fermentadas, piensos, el concentrado de proteína de suero (CPS) y aislado de proteína de suero (APS) [40, 41].

Sin embargo, debido al importante crecimiento de la producción de queso y productos lácteos coagulados, la utilización del suero de queso se ha convertido en un reto y se necesitan nuevas tecnologías para aumentar la competitividad de estas empresas.

### **1.2.2. Gestión de los subproductos de un matadero de aves**

Los subproductos (sangre, plumas, grasas, excrementos, etc.) de mataderos de aves son un serio problema para los mataderos, tanto a nivel económico como a nivel medioambiental (contaminación de suelos, acuíferos y/o emisiones) [42].



Actualmente, los residuos de las plumas no son aprovechados adecuadamente y son dispuestos en el vertedero junto con otros residuos lo cual contribuye a generar focos infecciosos, así como una generalización de contaminación del suelo, impactando además en la calidad del aire.

La sangre que se genera durante el procesamiento de las aves, puede tener beneficio económico en función de su calidad higiénica y de la distancia al centro de valorización. Debido a la ausencia de tecnología en la mayoría de mataderos avícolas, la sangre se lleva a la depuradora, o bien a otro tratamiento para su destrucción.

Las aguas residuales generadas durante el procesamiento de lavado se someten a un proceso de depuración en el propio matadero antes de ser vertidas a la red de alcantarillado. Este tratamiento suele consistir en un filtrado y posteriormente el lodo obtenido se trata con floculantes para incrementar su densidad [43].

Todas estas acciones implican un coste económico para los mataderos, además del coste medioambiental, que desincentivan por tanto a los propios procesos de gestión [44-46].

Ente este contexto, sería conveniente proponer otras tecnologías capaces de gestionar correctamente estos subproductos orgánicos y aportar valor añadido a las industrias como puede ser el caso del compostaje o del de digestión anaerobia [47].

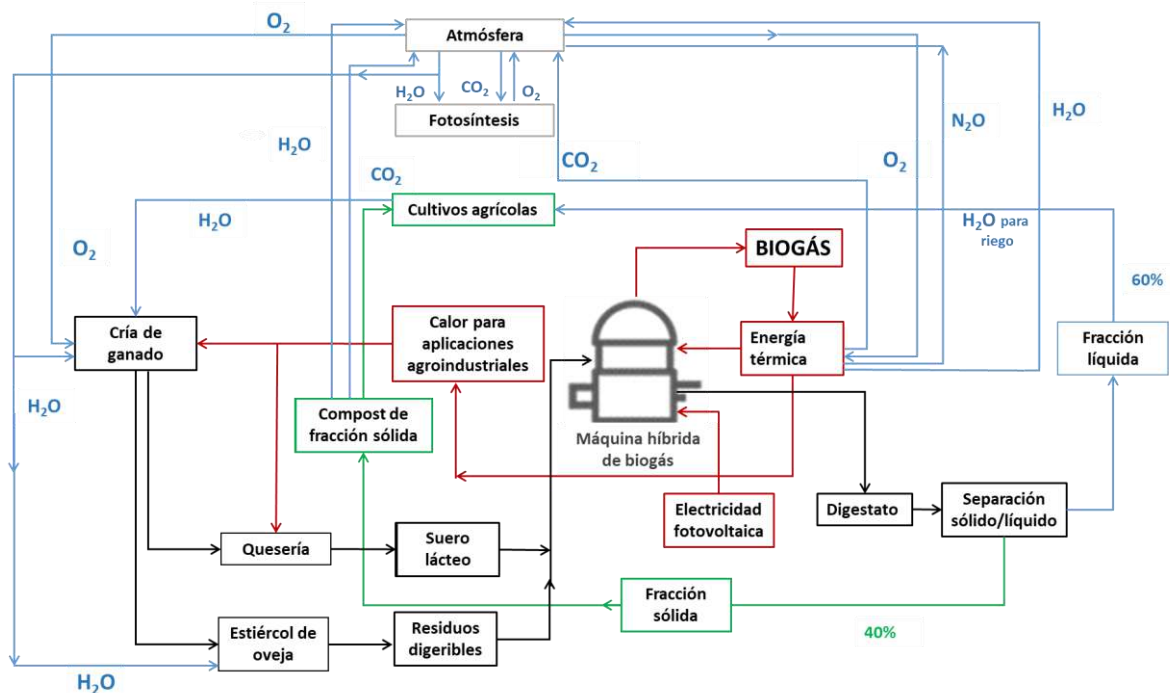
Los subproductos agroindustriales de estudio, ya sean *in situ* o tras realizar una mezcla de varios de ellos, se caracterizan por presentar un alto contenido en materia orgánica y en humedad.

El crecimiento demográfico e industrial y la concentración de la población en grandes ciudades hace que la generación de biomasa residual sea tan abundante y tan localizada, que la capacidad de autodegradación del medio resulta insuficiente y hace necesario aplicar distintas técnicas de tratamiento a estos residuos antes de su vertido al medio natural, ya que en caso contrario, se generarían múltiples problemas ambientales, principalmente en el agua, en el suelo y en la atmósfera, así como problemas sanitarios.

### 1.3. Tecnología de tratamiento. Digestión Anaerobia

El término "tecnologías limpias basadas en la bioeconomía circular" ha atraído la atención mundial en los últimos años, y ahora desempeña un papel importante para superar los retos como la creciente generación de biorresiduos, la escasez de recursos y el cambio climático. Esto está en consonancia con la creación de un medio ambiente sostenible. En cuanto a las tecnologías basadas en la bioeconomía circular, se considera que la mejor técnica disponible para el tratamiento y valorización de los subproductos agroindustriales es la digestión anaerobia ya que no solo contribuye a la sostenibilidad del medioambiente, sino también a la generación de nuevas fuentes de bioenergía contribuyendo con la Bioeconomía Circular [48-50].

La circularidad de un proceso de biometanización se puede representar a través de la Figura 1.5. En ella se muestran diferentes flujos entrantes y salientes de materia y energía entre una planta de biogás, alimentada por una mezcla de residuos de la industria quesera y de estiércol de oveja, y el medio ambiente. Las líneas azules representan el flujo de gases en la atmósfera, así como la corriente de agua líquida. Las líneas negras muestran el flujo de residuos. Las de color verde manifiestan los flujos de biomasa (incluidos los correspondientes al digestato tratado). Finalmente, las líneas rojas se refieren a los flujos de energía.



**Figura 1.5.** Diagrama de circularidad de una planta piloto de biometanización híbrida para la industria lácteo-ganadera

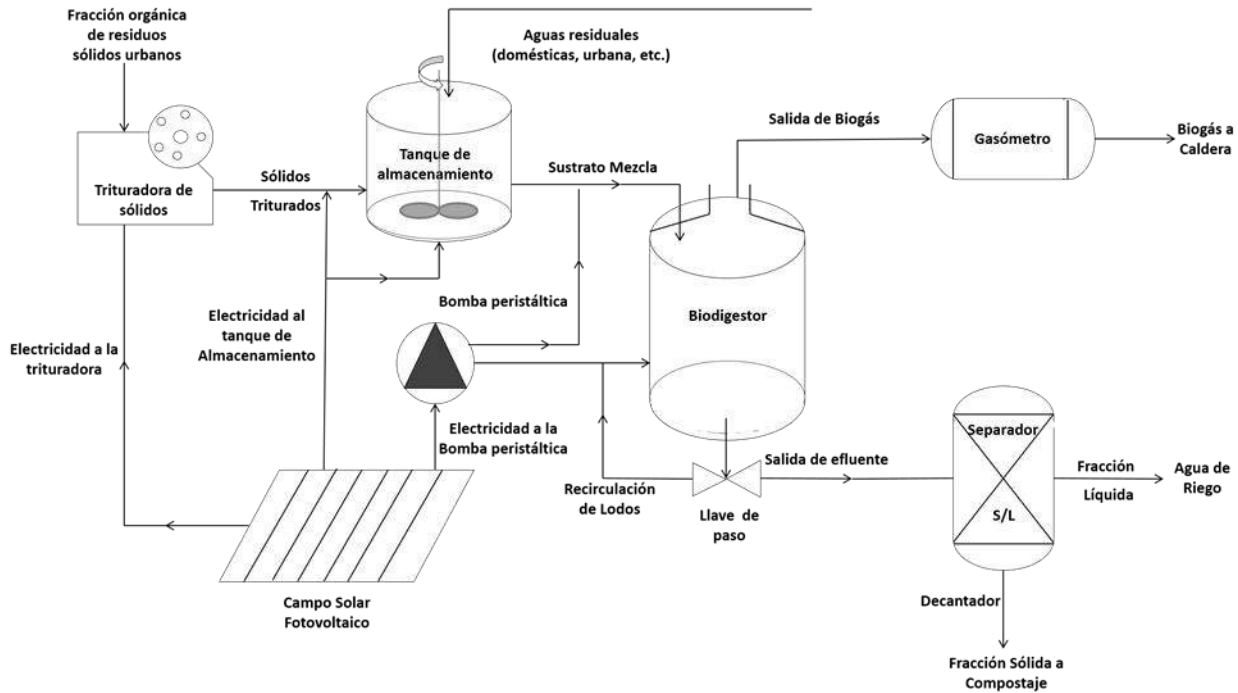
Además de la circularidad del propio proceso, la circularidad de una planta de biogás también es posible. Recientemente, nuestro grupo de investigación, ha diseñado y construido una planta pre-industrial de biogás híbrida con energía solar fotovoltaica, que está ubicada en la Escuela de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Extremadura (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Fotografía de la planta piloto de biometanización híbrida. Ubicación: Campos de Prácticas de la Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura, España

El fin de dicha planta es llevar a cabo ensayos de biometanización de residuos biomásicos húmedos y establecer un procedimiento de cálculo objetivo, metódico, sistemático y científico del Grado de Circularidad (GC) del proyecto industrial global (biogás y compostaje), basado en el concepto de Huella de Carbono (HC) de los procesos involucrados. De este modo se cierra el ciclo completo del carbono, es decir, se estudia todo el proceso completo, desde el acopio de las materias primas hasta la gestión última de los residuos (reciclaje u otros), también conocido, como “desde la cuna a la tumba” (Figuras 1.6 y 1.7).

En cuanto a la tecnología de digestión anaeróbica o biometanización, se puede definir como un proceso biológico complejo en el que, en ausencia de oxígeno, y por la acción de diversos grupos bacterianos que actúan de manera conjunta y coordinada, se produce la degradación de la materia orgánica presente en los subproductos agroalimentarios y se transforma en dos productos de alto valor añadido: Biogás y un efluente ya tratado denominado digestato [51].



**Figura 1.7.** Diagrama de flujo de una planta piloto de biometanización híbrida

El biogás está formado mayoritariamente por metano (entre el 50-70 %) y dióxido de carbono (entre un 20-40 %), por tanto, es un gas combustible. Su almacenamiento es fácil y asequible, lo que le permite ser una fuente de energía renovable fácilmente gestionable. Es posible utilizar el biogás de manera continua o bien almacenarlo para ser consumido en los momentos en los que se necesite más energía que la que pueden suministrar otras fuentes o éstas no estén disponibles. Esto es una ventaja de la biometanización frente a otras renovables como la solar o la eólica [47].

El biogás por su elevado contenido en metano, presenta las mismas aplicaciones que el gas natural. De hecho, se pueden adaptar los equipos que operan con gas natural para que lo hagan también con biogás [52,53].

1. A partir de biogás podemos producir energía térmica mediante su combustión en calderas.
2. Es posible generar electricidad y calor en motores de cogeneración.
3. Si se le somete a un proceso de purificación exhaustivo (eliminación de dióxido de carbono, oxígeno, sulfuro de hidrógeno...) es posible obtener biometano, que puede inyectarse a la red de gas natural o ser utilizado como combustible para automoción.

4. Y este biometano también se puede reformar para obtener hidrógeno verde [54].

Por otra parte, el digestato es una mezcla de productos minerales (nitrógeno, fósforo, potasio...) y otros compuestos de difícil degradación biológica, que bien de manera directa o tras ser sometido a una serie de tratamientos, puede ser utilizado, directamente, como enmendante agrícola o como materia prima para la obtención de compost de calidad.

Si se separan las fases sólida y líquida de dicho efluente se puede obtener un 40 % en peso de compost (de la fase sólida) y un 60 % en peso de agua para riego (de la fase líquida).

Los productos finales obtenidos del proceso de digestión anaerobia son el resultado de una serie de fenómenos bioquímicos interdependientes muy complejos. Para su estudio, se simplifican en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis y metanogénesis (Figura 1.8). Los tres primeros pasos son llevados a cabo por un gran consorcio de bacterias, mientras que grupos especializados de arqueas productoras de metano (metanógenos) son responsables del último paso [55,56].

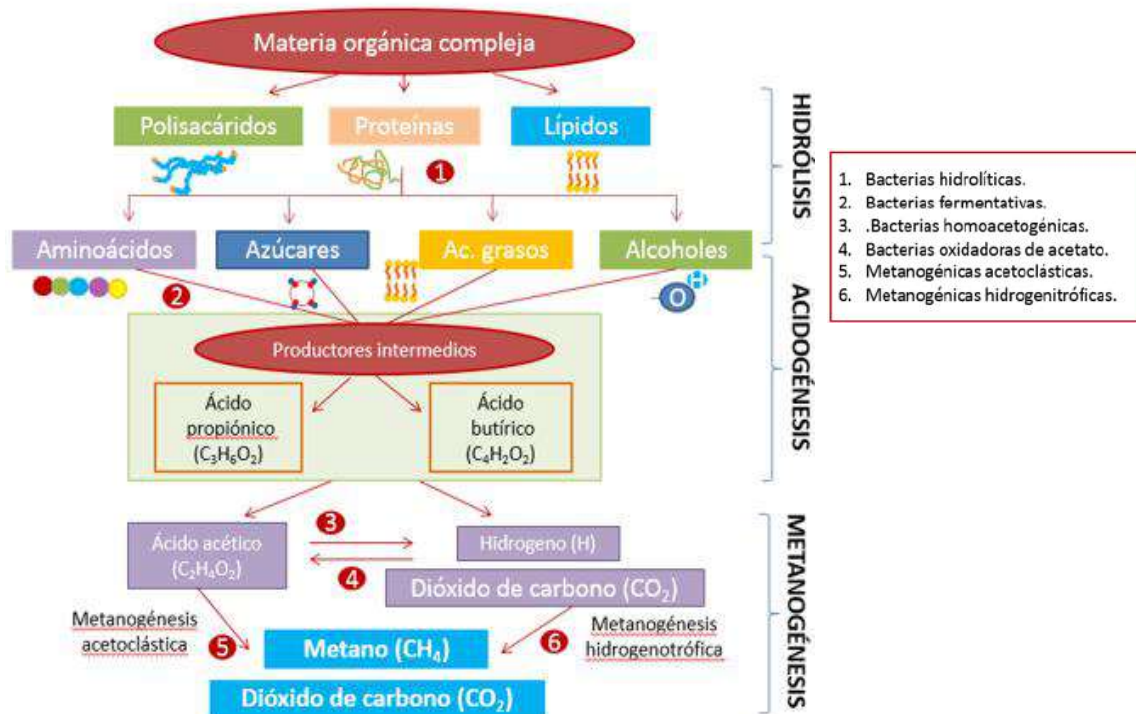


Figura 1.8. Proceso de la Digestión Anaerobia. Fuente: Ref. [57]

La mayoría de los trabajos recogidos en la bibliografía se centran en la última fase, la metanogénesis, ya que suele ser el paso que limita la velocidad de la reacción, después de una buena hidrólisis producida al reducir el tamaño de partículas de los sustratos (trituration).

La metanogénesis es el paso más vulnerable al pH y a la acumulación de ácidos orgánicos de cadena corta que afectan a la estabilidad de todo el proceso. Además, esta fase es la más sensible a la temperatura y a los productos químicos tóxicos [58].

Los metanógenos se clasifican como acetoclásticos o hidrogenotróficos y pertenecen al reino de *Euryarchaeota* en el dominio de *Archaea*. Se caracterizan por su capacidad de producir metano en condiciones anaeróbicas [59] y filogenéticamente los metanógenos se dividen en cinco órdenes, los *Methanobacteriales*, los *Methanococcales*, los *Methanosarcinales*, los *Methanopyrales* y los *Methanomicrobiales* [60].

*Methanobacteriales*, *Methanococcales* y *Methanomicrobiales* pertenecen a los órdenes hidrogenotróficos. Las *Methanosarcinales* pueden desarrollarse a través de las dos rutas, es decir, pueden ser acetoclásticas o hidrogenotróficas. Sin embargo, las *Methanopyrales* no se van a determinar en los digestores anaerobios mesófilos ya que estas solo se desarrollan en condiciones hipertermófilas (altas temperaturas, mayores de 70 °C) [61].

Aunque la composición exacta de la biocenosis metanogénica variable parece depender de la composición del sustrato y de los parámetros del proceso, como la temperatura [62] y la concentración de ácidos grasos volátiles [63], ciertos taxones microbianos han sido identificados repetidamente. De hecho, con frecuencia se ha indicado la presencia de especies de los géneros hidrogenotróficos *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales* [64-66].

Las especies *Methanosarcinas* parecen tener una importancia crucial en el proceso de DA. *Methanosarcina sp.* es, en comparación con otros metanógenos, los que presentan bastante resistencia ante diferentes alteraciones. Toleran concentraciones muy altas de amoníaco total [67,68].

Además, son capaces de utilizar tanto la vía acetoclástica como la vía de la metanogénesis hidrogenotrófica, lo que las hace más tolerantes a inhibidores específicos de la vía acetoclástica, como el fluoroacetato y el fluoruro de metilo, en comparación con *Methanosaeta sp.* [69].

El género *Methanobacterium*, también se encuentra con frecuencia en hábitats anaerobios [70,71]. Los miembros de *Methanobacterium* son capaces de crecer a valores de pH entre 4,7 y 9,9 y a temperaturas que oscilan entre 6 °C y 50 °C.

Por tanto, por la bibliografía encontrada, parece ser que dichas tres especies son las más predominantes en los digestores anaerobios mesófilos (temperaturas moderadas).

Hasta ahora, el proceso de DA sólo está controlado por parámetros ambientales como la temperatura y la humedad y por parámetros físico-químicos como la agitación, el Tiempo de Residencia hidráulico (TRH), el pH, los ácidos grasos volátiles (AGV), la alcalinidad, la concentración de nutrientes y la relación de Carbono/Nitrógeno (C/N) [47].

La mayoría de los trabajos publicados relacionan determinados parámetros físico-químicos con algunas especies metanogénicas. Por ejemplo, en Jiang et al. (2019) se estudió el comportamiento sobre la metanogénesis frente al efecto del cloruro amónico, butirato sódico, propionato sódico y los metales pesados [72] y en el estudio realizado por Wang et al. (2015) se mostró el efecto del Amoníaco sobre los metanógenos hidrogenotróficos y las bacterias sintróficas oxidantes de acetato [73].

El conocimiento detallado de la estructura de la comunidad microbiana responsable de la degradación de la biomasa y de la formación de metano, así como de su desarrollo durante el proceso de digestión, es esencial para asegurar la estabilización y posterior optimización del proceso de digestión anaerobia.

## **1.4. Tratamientos para optimizar el proceso de DA**

Pese a que la tecnología está validada a escala industrial, puesto que está ampliamente desarrollada en Europa, y se ha demostrado su eficacia en la valorización energética de subproductos orgánicos húmedos, ni en España ni en Extremadura se ha implantado de manera generalizada. De hecho, en Extremadura no existe ninguna planta de biogás en operación que gestione únicamente subproductos agroindustriales.

Teniendo en cuenta la situación del sector energético en España (que no incentiva la generación de energías renovables), para asegurar la rentabilidad de la implantación de la biometanización a escala industrial es imprescindible desarrollar innovaciones que maximicen el rendimiento energético del proceso y reduzcan en lo posible los costes de construcción.

Por este motivo, en esta Tesis Doctoral, se han analizado, desarrollado e implantado determinados tratamientos físico-químico-biológicos en el proceso de DA para hacer más atractiva económicamente a dicha tecnología.

### **1.4.1. Tratamientos físico-químicos**

Existen diferentes estrategias para mejorar el rendimiento de la digestión anaerobia, lograr una mayor producción de energía y mantener la estabilidad del proceso.

Uno de ellos es reducir el tamaño de partícula de los subproductos, ya que cuanto menor sea su tamaño, mayor será el área superficial para la acción de las bacterias hidrolíticas. Se ha demostrado experimentalmente que cuanto menor sea el tamaño de partículas en el sustrato mayor es el rendimiento del proceso [47, 74].

Por otro lado, en los últimos años, se ha visto incrementado el uso de materiales porosos para inmovilizar a las bacterias anaerobias en el interior del digestor. Si se incrementa la concentración de bacterias activas, la producción de biogás y, por tanto, el rendimiento energético de la biometanización aumenta proporcionalmente.



Algunos materiales que se han utilizado para este fin son el carbón activado, la zeolita [75], la bentonita, la lana mineral, el poliuretano, el poliacrilato, el polietileno e incluso la paja como portador de biopelículas [76]. En todos los casos, la distribución del tamaño de poro (porosidad) y el tamaño de poro del medio de soporte son factores determinantes ya que estos poros deben tener un tamaño adecuado para la colonización por parte de la población de bacterias metanogénicas (cuyo tamaño es de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  por célula bacteriana). La cantidad, forma y disposición del material dentro del reactor también son importantes ya que se ha demostrado que afectan a la población de bacterias fijadas [77].

Otros estudios, demuestran que adicionar biocarbones porosos en el interior del digestor anaerobio, favorece el enriquecimiento y crecimiento de microorganismos anaerobios sobre la superficie del material poroso [78,79], porque los biocarbones tienen una fuerte capacidad de adsorción, además de eliminar compuestos tóxicos para los microbios, son conductores de la electricidad y, a su vez, actúan como conductores de electrones para promover la transferencia directa de electrones entre especies (Direct Interspecies Electron Transfer, DIET por sus siglas en inglés) entre las bacterias sintróficas y las arqueas metanogénicas, aumentando así la producción de metano [80-82].

El problema común de todos estos productos que aumentan la superficie disponible para la adhesión bacteriana son que sus costos son prohibitivamente altos y tienen otras aplicaciones más rentables en el mercado, lo que dificulta su aplicación en plantas de DA a escala industrial.

Una alternativa para superar esta limitación es inmovilizar bacterias anaerobias usando materiales porosos de bajo coste o subproductos industriales de biomasa seca. Este desarrollo permitirá aumentar la eficiencia energética de la biometanización a un precio inferior al de los procesos que se han propuesto anteriormente.

Los materiales que se han estudiado en esta Tesis son:

1. La almendra (*Prunus dulcis*). - Su cultivo presenta una gran importancia económica y ambiental en los países mediterráneos, ya que es uno de los frutos secos más consumido en el mundo y el árbol puede crecer en la linde de terrenos con pendientes pronunciadas.

Cuando el fruto se procesa industrialmente para obtener las semillas comestibles, se elimina el hueso o endocarpio, comúnmente llamado "cáscara", y si tenemos en cuenta que el rendimiento medio de la materia aprovechable de la almendra es del 26-32 %, la cáscara supone el 68-74 % del peso total. En 2019 se cultivaron en España 586.990 hectáreas de almendros, lo que se tradujo en 340.421 toneladas de almendras con cáscara y al menos 231.000 toneladas de cáscara [83].

2. La nuez. - Es otro de los frutos secos más consumidos en el mundo. China y Estados Unidos son los mayores productores de nueces del mundo, pero España ha incrementado notablemente su superficie cultivada en los últimos años.

Así en 2019 contaba con 8.178 ha productivas, que dieron lugar a la producción de 17.542 toneladas de nueces con cáscara [84].

El rendimiento de la nuez es aproximadamente del 55 %, lo que significa que el 45 % de su peso es cáscara. Así, se puede afirmar que en 2019 España produjo unas 8.000 toneladas de cáscara de nuez [84].

3. Fibra de kenaf (*Hibiscus cannabinus*). - Es una planta herbácea anual dicotiledónea de la familia de las *Malvaceae*. Se cultiva tanto en regiones tropicales como subtropicales, aunque crece mejor en los trópicos ya que es un cultivo muy sensible a las heladas. Sus fibras han sido utilizadas durante siglos en Asia y África y se cultivan en países como India, Pakistán y China.

La planta de kenaf contiene fibras moderadamente largas en la parte externa del tallo y fibras cortas en el núcleo. La longitud de las fibras más largas es de alrededor de 2,5 mm, mientras que la de las fibras del centro son del orden de 0,6 mm [85]. Ambas son adecuadas para la fabricación de papel y otros productos, siendo las fibras largas especialmente adecuadas para la fabricación de papeles de calidad especial.

El comercio mundial de kenaf cobra cada día mayor importancia, pues ha pasado de ser un cultivo puramente textil (producción de sacos para envasar productos agrícolas y de la industria) a un cultivo con amplia variedad de aplicaciones industriales. Entre las propiedades de sus fibras destaca la porosidad, la resistencia y la elasticidad.

4. El Carbón vegetal. - Es un material combustible sólido, quebradizo y poroso con un alto contenido de carbono (alrededor del 98 %). Su poder calorífico es elevado y oscila entre 6.900- 8.360 kcal/kg, en función de la materia prima de partida.

En Extremadura, el carbón vegetal se produce de forma artesanal mediante la pirólisis de los residuos leñosos generados en la poda de encinas. La encina es un árbol que constituye el principal componente vegetal del ecosistema denominado “dehesa” representativo de esta región española. El carbón vegetal tiene una gran porosidad y una alta capacidad de adsorción [86].

La selección de los materiales comentados anteriormente se ha realizado teniendo en cuenta la disponibilidad en España y su coste, las características que deben cumplir para ser considerados buenos materiales para la fijación bacteriana (tamaño de poro, distribución del poro, estabilidad, etc.) y las investigaciones analizadas en la revisión bibliográfica.

#### **1.4.2. Tratamiento biológico**

Para identificar y cuantificar a la principal microbiota que interviene en el proceso de DA, es necesario aplicar métodos moleculares rápidos y sensibles con el objetivo final de optimizar y controlar el proceso biotecnológico [87].

La mayoría de los métodos para la identificación rápida y sistemática de procariontes se han desarrollado principalmente para bacterias [88-90].

Tras una búsqueda bibliográfica exhaustiva, existen pocas referencias respecto a la optimización de métodos para detectar y cuantificar grupos microbianos específicos responsables de la digestión anaerobia, como son *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales* [91]. Por lo tanto, la presente Tesis Doctoral permitirá cubrir la brecha de conocimiento existente en la bibliografía científica para facilitar la operatividad del proceso de DA.

La detección y cuantificación mediante PCR cuantitativa (qPCR) es una metodología apropiada en microbiología para detectar variaciones dentro de las comunidades microbianas. La qPCR permite la detección y cuantificación rápida, reproducible y sensible de poblaciones microbianas específicas de una muestra ambiental [92-94].

A diferencia de los métodos convencionales basados en PCR, como la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización, también referida DGGE y los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (T-RFLP), el método de qPCR no solo detecta la presencia de las secuencias objetivo, sino que también cuantifica sus números absolutos [95].

Los ensayos para PCR en tiempo real TaqMan y SYBR Green son dos técnicas de qPCR utilizadas con frecuencia. TaqMan utiliza una sonda de oligonucleótidos monocatenarios fluorogénicos que se une solo a la secuencia de ADN entre los dos primers de PCR (Figura 1.9B). Por lo tanto, solo un producto de PCR específico puede generar una señal fluorescente en TaqMan PCR.

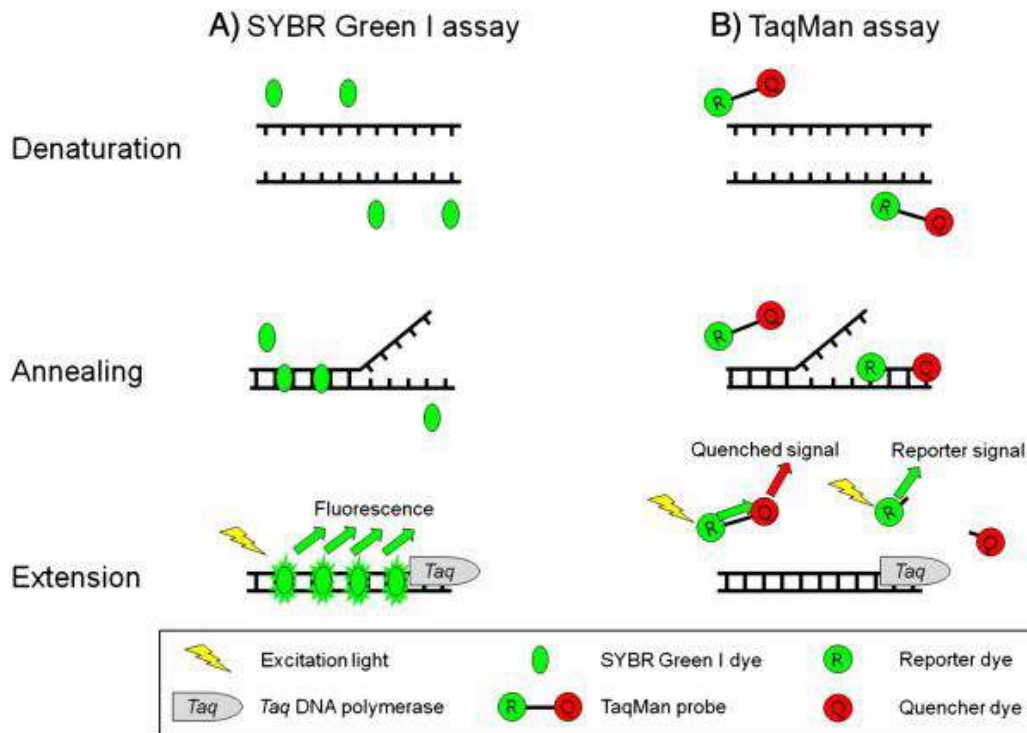
El principio de la sonda TaqMan se basa en la actividad de exonucleasa 5'–3' de la polimerasa Taq para escindir una sonda de doble marca durante la hibridación con la secuencia diana complementaria y la detección basada en fluoróforos.

La señal de fluorescencia resultante permite mediciones cuantitativas con una alta especificidad de detección.

El colorante SYBR Green detecta productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante la unión a ADN bicatenario formado durante la PCR.

SYBR Green qPCR se usa ampliamente debido a que se puede controlar la amplificación de cualquier secuencia de ADN bicatenario y no necesita sonda, por lo que se reducen los costes de funcionamiento y configuración de ensayos, siempre que sus primers de PCR estén bien diseñados y su reacción esté bien caracterizada (Figura 1.9A).

A diferencia de las sondas fluorescentes TaqMan, una desventaja del ensayo SYBR Green es que el tinte no es específico, lo que puede generar señales positivas falsas si hay productos no específicos o dímeros de primers presentes en el ensayo. El otro inconveniente del ensayo SYBR Green es que la longitud del amplicón también afecta la intensidad de la amplificación. Sin embargo, las sondas fluorescentes TaqMan son sustancialmente más costosas que los sistemas basados en SYBR Green y, a veces, más difíciles de optimizar [96,97].



**Figura 1.9.** Diagramas esquemáticos de los ensayos: (A) SYBR Green y (B) TaqMan durante los procedimientos PCR de desnaturalización, recocido y extensión. Fuente: Ref. [94]

Aunque los ensayos de qPCR se utilizan cada vez más en la ecología microbiana, la aplicación de esta metodología en el estudio de la DA es muy limitada o está desactualizada [92, 98].

En particular, los estudios principalmente se han referido a la cuantificación de *Archaea* metanogénicas en otros ecosistemas [99-101]. Solo, en Lee et al. (2011) se estudió el efecto del tiempo de retención de sólidos sobre la metanogénesis en DA [102].

En esta Tesis se han desarrollado varios protocolos utilizando la qPCR basada en SYBR Green para detectar y cuantificar la principal población microbiana que interviene en la última etapa del proceso de digestión anaerobia, la fase metanogénica y así tener controlada la estabilidad del proceso.



## **Capítulo 2. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA**





## 2.1. Objetivos

### 2.1.1. Objetivo general

La presente Tesis Doctoral analiza y desarrolla tratamientos sostenibles de carácter físico-químico-biológico que pueden implementarse en el proceso de biometanización de los subproductos de la industria agroalimentaria extremeña, complementándose con otras líneas de trabajo ya desarrolladas por el Grupo de Investigación DTERMA (Desarrollo Tecnológico sobre Energías Renovables y Medio Ambiente) de la Universidad de Extremadura, con el fin de aumentar la funcionalidad, la fiabilidad y el rendimiento energético del uso de esta técnica en el sector agroindustrial. Por tanto, el objetivo general de esta investigación es optimizar el proceso de biometanización para maximizar su rendimiento energético, económico y medioambiental, y como consecuencia, hacer competitivas en el mercado las plantas de biometanización, adaptadas al residuo particular de cada industria agroalimentaria y siguiendo un modelo basado en la Economía Verde y Circular.

### 2.1.2. Objetivos específicos

Para alcanzar este objetivo principal, la Tesis Doctoral se divide en ocho objetivos específicos (OE), reflejando en mayor detalle el alcance de la investigación.

Objetivo específico 1 (OE1). - Identificar, cuantificar y caracterizar desde el punto de vista físico-químico, los principales residuos generados por la industria quesera-ganadera y los mataderos de aves.

Objetivo específico 2 (OE2). - Realizar experiencias de codigestión anaerobia con los residuos disponibles en cada una de las industrias en estudio, modificando la carga orgánica administrada en diferentes condiciones de operación y aplicando diversos tratamientos para determinar las condiciones de biometanización más favorables energéticamente para cada residuo analizado.

Objetivo específico 3 (OE3). - Incrementar el rendimiento energético de la biometanización, adicionando en el interior del digestor una serie de materiales porosos de bajo coste, obtenidos, principalmente, de otros residuos agrícolas.

Objetivo específico 4 (OE4). - Cuantificar y analizar la viabilidad energética, económica y medioambiental de la digestión anaerobia de los residuos generados en las industrias agroalimentarias estudiadas.

Objetivo específico 5 (OE5). - Analizar y evaluar el papel que desempeña la adicción de los materiales porosos seleccionados en la biometanización.

Objetivo específico 6 (OE6)..- Desarrollar protocolos qPCR basados en SYBR Green que permitan la detección y cuantificación de los miembros más relevantes de las comunidades metanogénicas de digestores anaerobios, es decir, *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina*.

Objetivo específico 7 (OE7). - Evaluar la especificidad, la sensibilidad, la reproducibilidad y la repetibilidad de cada uno de los tres métodos de qPCR optimizados.

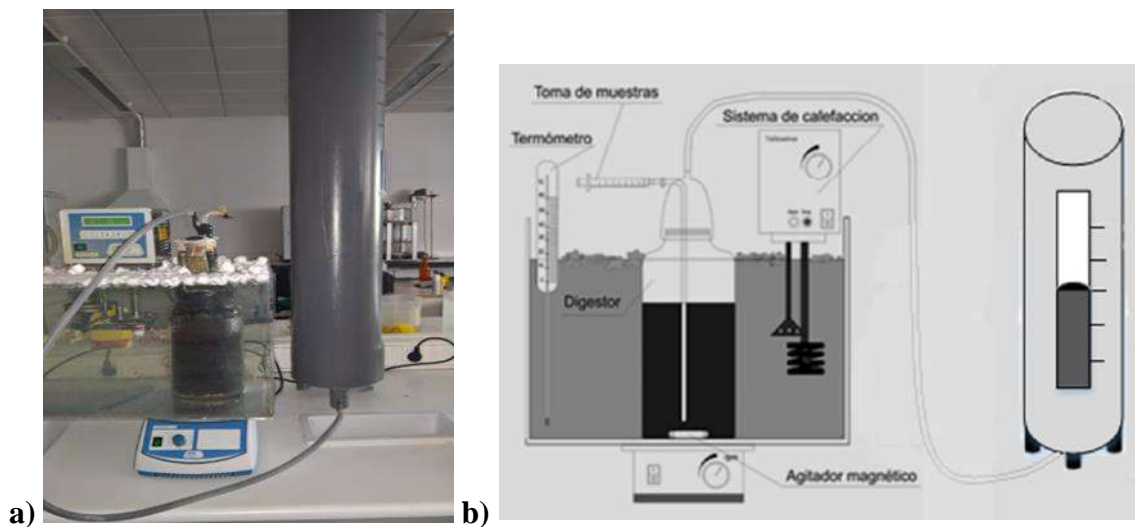
Objetivo específico 8 (OE8). - Aplicar los tres métodos optimizados de qPCR utilizando una muestra de un digestor anaerobio mesófilo a escala de laboratorio.

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1. Dispositivo experimental. Digestor anaerobio semicontinuo

Las experiencias de biometanización de esta Tesis Doctoral, se han desarrollado en un digestor anaerobio en modo semicontinuo (Figura 2.1).

El digestor semicontinuo está constituido por un tarro de vidrio de 2 litros de capacidad, unido a una tapadera móvil que presenta un orificio al cual se acopla una pieza que dispone de dos salidas. A través de una de ellas, se extrae el lodo digerido y se introduce el sustrato en el interior del reactor y la otra permite evacuar el biogás producido y está conectada a una campana gasométrica donde se acumula. El medio de reacción se mantiene a 38 °C (régimen mesófilo) sumergiendo el reactor en un baño de agua calentada mediante una resistencia eléctrica y el contenido del reactor se homogeneiza utilizando un agitador magnético y un imán [103].



**Figura 2.1.** a) Fotografía de un reactor semicontinuo a escala de laboratorio sumergido en un baño térmico; b) Esquema de un reactor semicontinuo

### 2.2.2. Preparación de los sustratos

En primer lugar, para la preparación de cada uno de los sustratos (residuos que sirven de alimento al biodigestor) se han tenido en cuenta las proporciones de cada subproducto que se generan en condiciones reales de operación en la industria en estudio, con el objetivo de que los resultados obtenidos permitan diseñar proyectos de construcción de plantas de digestión anaerobia a escala industrial.

Debido a la firmeza científica que existe sobre la mejora del rendimiento del proceso al disminuir el tamaño de partícula de los subproductos [104,105], todos los sustratos que presenten componentes en estado sólido se han sometido a un pretratamiento mecánico de reducción de tamaño para que las bacterias hidrolíticas puedan actuar.

En el caso de la industria quesera, el estiércol de oveja, al ser un subproducto sólido, se le ha sometido a un tratamiento de trituración utilizando una batidora de laboratorio de gran potencia de la marca Waring comercial. El mismo procedimiento, se ha llevado para tratar los fangos de la depuradora y las aguas residuales generadas en los mataderos avícolas.

#### ***2.2.2.1. Residuos de la quesería-ganadería***

Los subproductos del suero lácteo utilizados en las experiencias de biometanización, se tomaron de la empresa ArteSerena S.L., una empresa dedica a la fabricación del queso de la zona que está situada al sureste de Extremadura, en Campanario (Badajoz). El estiércol, 100 % de oveja, se obtuvo de una ganadería situada a 8 km de la fábrica de quesos ArteSerena S.L.

Periódicamente, se recogía suero lácteo en bidones de 5 L y cierta cantidad de estiércol de oveja en bolsas de plástico que se transportaban hasta el laboratorio. Una vez allí, todos los subproductos se guardaban en cantidades más pequeñas y se almacenaban a -4 °C hasta el momento de su uso.

Dado el potencial de contaminación que tiene el suero lácteo, el objetivo de esta investigación ha sido gestionar este subproducto. Por eso, en la mezcla a biodegradar, el porcentaje de suero lácteo es mayor que el de estiércol. Tras testar el potencial energético de diversas mezclas de estiércol de oveja con suero lácteo, la proporción elegida ha sido una mezcla alimento (sustrato) compuesto por un 80 % de suero lácteo y un 20 % de estiércol de oveja. El sustrato ya preparado se conserva en el frigorífico hasta su incorporación a los reactores, para evitar su degradación.

#### ***2.2.2.2. Residuos del matadero avícola***

Los residuos de matadero utilizados en las experiencias de digestión anaerobia se tomaron de la empresa Veravic, un matadero de aves situado al norte de Extremadura, en Cuacos de Yuste (Cáceres).

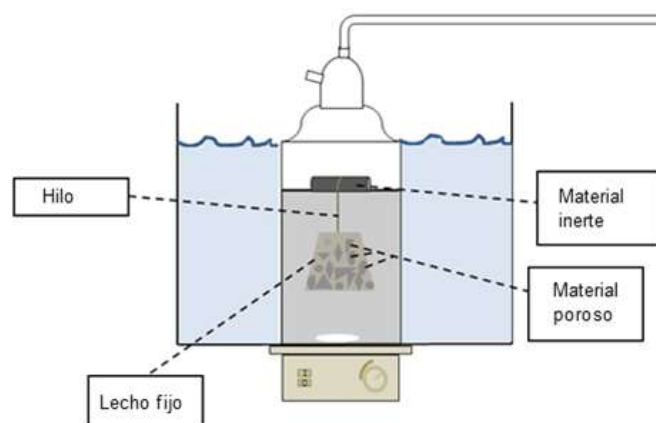
Periódicamente, se recogía cierta cantidad de sangre y de agua de lavado en bidones de 5 L, así como los lodos activos que se transportaban hasta el laboratorio en cajas debidamente cerradas.

Una vez allí, todos los subproductos se guardaban en cantidades más pequeñas y se almacenaban a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de uso, para evitar la degradación. Las proporciones de cada uno de los residuos generados en Veravic se determinaron a fin de hacer una mezcla a escala de laboratorio igual a la mezcla real que se genera en dicho matadero. El resultado fue: 12,3 % de lodos activos, 86,2 % de agua de lavado y 15 % de sangre. Como se ha indicado anteriormente, el sustrato ya preparado se conserva en el frigorífico hasta su incorporación a los reactores para evitar su degradación.

### 2.2.3. Preparación de materiales porosos

Tras la recogida o recepción de estos materiales procedentes del Grupo de Ingeniería de Materiales (INMA) del Departamento de Ingeniería Mecánica, Energética y de los Materiales de la Universidad de Extremadura, en primer lugar, se efectuó una reducción de tamaño y un tamizado de los mismos, seleccionándose la fracción de tamaños de partículas comprendida entre 1 y 2 mm, tamaño superior al tamaño de poro de la malla que contiene en su interior dichos materiales. A esta disposición se la conoce como lecho fijo.

Dado que el material poroso húmedo presenta una densidad superior al lodo anaerobio, éste tendería a ir al fondo del digestor, por lo que se elige el material inerte de densidad inferior al sustrato fluido para que se mantenga a flote, quedando así el material localizado a una altura intermedia fijada por la longitud del hilo. La Figura 2.2 muestra un esquema de la disposición del lecho fijo en el interior del reactor.



**Figura 2.2.** Configuración del reactor desarrollada para introducir los materiales porosos

#### **2.2.4. Puesta en marcha del proceso de digestión anaerobia y metodología experimental**

Los subproductos agroalimentarios que se van a tratar por biometanización carecen de microorganismos adecuados para iniciar el proceso biológico, lo que hace necesario contar con un inóculo ya aclimatado, es decir, con un lodo que contenga el tipo de bacterias que van a intervenir en su biometanización. Para ello, en cada puesta en marcha se añaden a cada reactor 2 L de lodo anaerobio, procedente de otras experiencias en las que se trataron los mismos subproductos [47].

Una vez cargados los reactores con el inóculo se comienza a alimentar una pequeña cantidad de sustrato al día siguiente, lo que permite reactivar a los microorganismos presentes en el lodo anaerobio. La cantidad de sustrato alimentado se incrementa paulatinamente hasta alcanzar el caudal que se ha fijado en cada experiencia, el cual depende del Tiempo de Residencia Hidráulico (TRH) y, por tanto, de la concentración de materia orgánica del sustrato a tratar.

#### **2.2.5. Métodos analíticos**

Con el objetivo de monitorizar el proceso biológico se toman muestras semanales de los digestores experimentales para cuantificar los parámetros físico-químico (pH, DQO, alcalinidad, Ácidos Grasos Volátiles (AGV), concentración de sólidos en suspensión (SS) y volátiles (SV)).

Diariamente se cuantifica la producción de biogás y semanalmente su composición, utilizando el analizador de gases Biogás 5000 de la marca Geotech.

Todos los parámetros se analizaron siguiendo los métodos estándar [47, 106], salvo la demanda química de oxígeno, el cual se determinó utilizando kits Nanocolor® y un espectrofotómetro portátil Macherey-Nagel [47].

Además, al material poroso seleccionado, se le realizó una caracterización textural y morfológica (análisis elemental, isothermas de adsorción, porosimetría de mercurio y el Microscopio electrónico de barrido, SEM).

##### **2.2.5.1. pH**

El pH expresa la concentración del ion hidrógeno en las soluciones acuosas.

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad (2.1)$$

Se utilizó un medidor de pH/mV Crison Basic 20<sup>+</sup> que dispone de un potenciómetro, un electrodo de vidrio para medios difíciles, un electrodo de referencia y un dispositivo para compensar la temperatura. El sistema de electrodos debe calibrarse periódicamente frente a soluciones tampón estándar. Los tampones utilizados en nuestro caso fueron de la marca Crison con pH 7,00; 4,01 y 9,21, para evitar contaminaciones los tampones se renovaron cada 4 semanas.

Los electrodos antes de su uso deben extraerse de la solución de conservación, lavarse y secarse con un papel absorbente. Posteriormente se ponen en contacto los electrodos con la muestra, agitándola suavemente para asegurar su homogeneidad. El pH se determinó a temperatura ambiente, la misma a la que se encontraban los tampones, ya que la medida del pH se ve afectada por la temperatura. Una vez realizada la determinación, se lavaron los electrodos con agua destilada, se secaron y se pusieron en contacto con la solución de conservación, para mantenerlos siempre húmedo.

***2.2.5.2. Sólidos totales, volátiles y minerales, tanto en suspensión como disueltos.***

Se definen los sólidos totales como los residuos de material que quedan en el recipiente después de la evaporación de una muestra y su secado en estufa a temperatura definida.

Los sólidos totales incluyen los sólidos totales suspendidos, o porción de sólidos totales retenidos por un filtro y los sólidos disueltos totales, o porción que atraviesa el filtro. En las determinaciones de sólidos realizadas en las experiencias de digestión anaerobia se han separado los sólidos en suspensión de los disueltos no por filtración sino por centrifugación.

Por otra parte, dentro de los sólidos totales, en suspensión y disueltos se puede discernir entre sólidos minerales, que son los que permanecen en el recipiente tras someterlo a ignición durante un tiempo determinado y a una temperatura específica y los sólidos volátiles que se pierden en el proceso de ignición.

Para la determinación de sólidos se tomaron 5 mL de muestra, se centrifugaron a 3.600 r.p.m. durante 10 minutos en una centrifugadora P. Selecta Mixtasel-BL y se pesaron 2 cápsulas de porcelana en una báscula Cobos precisión AY220 capaz de pesar

hasta 0,1 mg, previamente habían sido secadas en estufa (P. Selecta Digitheat 36L) y enfriadas en un desecador provisto de un desecante con indicador colorimétrico de concentración de humedad.

El líquido sobrenadante procedente de la centrifugación se vertió en una cápsula para determinar los sólidos disueltos y el residuo sólido se depositó en la otra cápsula con el objetivo de cuantificar los sólidos en suspensión. Ambas se introdujeron en la estufa a 105 °C durante 24 horas, se dejaron enfriar en un desecador y se volvieron a pesar.

Seguidamente se calcinaron en una mufla P. Selecta Select-horn a 550 °C durante una hora (se debe elevar el horno a esta temperatura antes de introducir las muestras), se dejaron enfriar primero en el horno hasta una temperatura de 200 °C y después en un desecador. Una vez frías se pesaron de nuevo.

Sea,  $P_1$  el peso de la cápsula vacía (g),  $P_2$  el peso de la cápsula después de la desecación a 105 °C (g),  $P_3$  el peso de la cápsula después de la calcinación a 550 °C (g), y  $V$  el volumen de muestra tomada (mL).

El contenido expresado en g/L de sólidos totales en suspensión o disueltos, según la procedencia de la muestra, se determina como:

$$\text{Sólidos totales } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{(P_2 - P_1)1000}{V} \quad (2.2)$$

El contenido expresado en g/L de sólidos minerales en suspensión o disueltos se determina como:

$$\text{Sólidos minerales } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{(P_3 - P_1)1000}{V} \quad (2.3)$$

La diferencia entre los sólidos totales y los minerales se consideran sólidos volátiles [105,106].

### **2.2.5.3. Ácidos grasos volátiles**

La acidez volátil o AGV representan el conjunto de ácidos grasos solubles en agua, que tienen una temperatura de ebullición relativamente baja (entre 100-170 °C) y que por tanto pueden ser destilados a presión atmosférica.



En este grupo se incluyen los ácidos orgánicos de cadena corta: fórmico, acético, propiónico y butírico, entre otros. El procedimiento clásico para su determinación consiste en realizar una destilación previa con arrastre de vapor, a presión atmosférica, seguido de una volumetría ácido-base del destilado recogido.

Para llevar a cabo la determinación se tomaron 5 mL de muestra y se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrifugadora P. Selecta Mixtasel-BL. Al sobrenadante se le añadió ácido sulfúrico al 10 % en peso hasta alcanzar un valor de pH alrededor de 3,5, con el fin de que los compuestos de carácter ácido se encuentren en su forma protonada y neutra (necesaria para ser volátiles). La muestra acidulada se introdujo en un matraz de fondo redondo añadiendo agua destilada para arrastrar toda la muestra que pudiera quedar en el vaso de precipitado. Este matraz se acopló a un destilador, en el cual se realizó la destilación por arrastre de vapor. El destilado se valoró con una disolución de hidróxido sódico 0,1 N hasta viraje de la fenolftaleína a color rosa.

La acidez volátil expresada como gramos de ácido acético por litro viene dada mediante la siguiente expresión:

$$\text{Acidez volátil} \left( \frac{\text{g ácido acético}}{\text{L}} \right) = \frac{VN}{V'f} \quad (2.4)$$

Donde V son los mL de NaOH de concentración N normal añadidos en la valoración, V' el volumen de muestra (mL) y f el factor de recuperación. El factor de recuperación, se define como la fracción de ácido acético recuperada respecto de la cantidad inicial. Se realizaron ensayos previos a esta determinación con disoluciones de concentración conocida de ácido acético obteniéndose un factor de recuperación de 0,9 [106,107].

#### **2.2.5.4. Alcalinidad**

La alcalinidad de un agua es su capacidad para neutralizar ácidos y constituye la suma de todas las bases titulables. Depende principalmente de su contenido en bicarbonatos, carbonatos e hidróxidos y se expresa como gramos de carbonato de calcio por litro.

Se tomaron 5 mL de muestra y se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos en una centrifugadora P. Selecta Mixtasel-BL.

Al sobrenadante se le añadió lentamente una disolución de ácido clorhídrico 0,1 N hasta pH 3,8, que se considera el punto final de la valoración de la alcalinidad para un agua residual compleja.

La alcalinidad expresada como gramos de carbonato cálcico por litro de disolución se determina mediante la expresión:

$$\text{Alcalinidad} \left( \frac{\text{g CaCO}_3}{\text{L}} \right) = \frac{VN 50}{V'} \quad (2.5)$$

Donde V son los mL de HCl de concentración N normal añadidos en la valoración y V' el volumen de muestra analizada en mL [106,107].

#### **2.2.5.5. Demanda Química de Oxígeno, DQO**

La DQO es la cantidad equivalente de oxígeno que consumirían las materias orgánicas e inorgánicas presentes en un agua al ser oxidadas a su mayor estado de oxidación [105]. Se utiliza como oxidante dicromato potásico en exceso, en medio ácido sulfúrico fuerte, en caliente, y en presencia de sulfato de plata, que actúa como catalizador, y de sulfato de mercurio para eliminar la interferencia del ión cloruro. La DQO es la forma por excelencia de medir el grado de contaminación de un agua residual. En las experiencias realizadas se ha determinado la DQO utilizando el método fotométrico, el cual consiste en determinar el ión  $\text{Cr}^{3+}$  (de color verde) formado al oxidarse la materia orgánica y reducirse el ión dicromato [108].

Para determinar la DQO total, se preparan en el laboratorio, los viales que contienen: 0,5 mL de una disolución 0,64 N de dicromato potásico (31,383 g de dicromato potásico, secado previamente en una estufa a 103 °C durante 2 horas, en 1 litro de agua destilada), 1,5 mL de una disolución de sulfato de plata (6,6 g de sulfato de plata en 1 litro de ácido sulfúrico concentrado) y una punta de espátula de sulfato de mercurio.

Una vez listos, se toman 2 mL de la muestra (ó 2 mL de una disolución diluida de la misma), se introducen en el vial y se calienta en el horno termostático Dinko Mod D-65 a 148 °C, durante 2 horas. La medida de la DQO se realiza introduciendo el vial, después de dejarlo enfriar a temperatura ambiente, en el fotómetro PF-12 de Macherey-Nagel seleccionando el método 0-29, que es el que mide DQO en un rango de 100 a 1.500 mg/L a una longitud de onda de 620 nm. El valor indicado por el fotómetro es

directamente el valor de la DQO. Este resultado debe corregirse en el caso de que la muestra original se hubiera diluido para entrar en el rango considerado.

#### **2.2.5.6. Nitrógeno Kjeldahl**

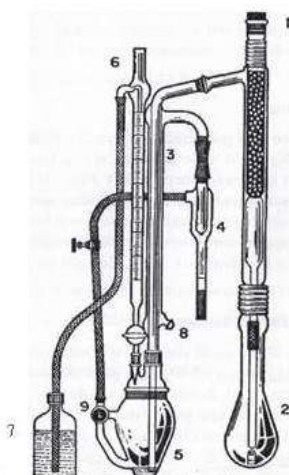
Es importante determinar el contenido en nitrógeno total para poder obtener la relación C/N (COT/N<sub>k</sub>) en el residuo, factor determinante en el proceso de digestión. La determinación del nitrógeno Kjeldahl se da en dos etapas. En la primera se produce la digestión formada por 5 mL de muestra más 0,1 g de una mezcla de 4,76 % de SeO<sub>2</sub>, 19,04 % de SO<sub>4</sub>Cu 5 H<sub>2</sub>O y 76,19 % de SO<sub>4</sub>K<sub>2</sub>, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 3 mL de peróxido de hidrógeno de 110 volúmenes, añadidos cuidadosamente a un matraz Kjeldahl. Este matraz se coloca en una manta calefactora a una determinada temperatura hasta la aparición de humos blancos densos (hasta ver todo el interior del matraz completamente blanco), que indica la descomposición del exceso de ácido sulfúrico. Una vez se haya enfriado el matraz, se diluye el contenido con 25 mL de agua destilada.

A continuación, el matraz Kjeldahl (2) se coloca en el equipo de destilación que consta de un matraz de recogida del amoníaco evaporado y de una valoración “*in situ*” (5). En este matraz se pone la disolución de ácido bórico, para neutralizar el amoníaco, y las gotas del indicador. El matraz Kjeldahl (2) se conecta a la parte inferior de la columna (1). Los vapores de amoníaco desprendidos del matraz Kjeldahl pasan por un tubo interno del refrigerante (3) y se hacen burbujear en el matraz de valoración (5). Para favorecer este proceso, se adiciona una disolución concentrada de hidróxido sódico por la parte superior de la columna (1) y se hace circular agua, que entra por la toma (8), a través de la trompa de vacío (4), por donde sale. Previamente, la llave de tres vías (9) debe estar en la posición que comunique solamente la parte superior del matraz de valoración con la salida que se dirige hacia la trompa de agua.

De esta manera, el vacío provocado hace que entre aire por la parte superior de la columna (1), burbujee en el matraz Kjeldahl (2), pase por el tubo interior del refrigerante (3), borbotee en el matraz de valoración (5) y salga, junto con el agua de suministro, por la trompa de vacío (4).

El matraz de valoración tiene acoplada una bureta (6), con auto enrase de la disolución de ácido clorhídrico de la botella (7), con el objetivo de ir adicionando este reactivo a lo largo de la destilación, manteniendo siempre el indicador en su color rosa.

El amoniaco destilado y recogido sobre el ácido bórico hace virar el indicador de color rosa a verde. Cuando el líquido tome este último color se valora con ácido clorhídrico hasta viraje a color rosa. Este proceso se repetirá sucesivamente, de modo que el amoniaco destilado hará virar el indicador a verde, se añadirán unas gotas de ácido clorhídrico 0,1 N para que cambie a color rosa, y el amoniaco continuará destilando y virando el color a verde, pasando cada vez más tiempo entre cada cambio de color. Se considera el final de la valoración cuando, pasados aproximadamente 10 minutos, el destilado recogido no produce viraje a color verde.



**Figura 2.3.** Equipo de destilación Kjeldahl. Fuente: Ref. [106]

#### **2.2.5.7. Carbono Orgánico Total (COT)**

El COT es un indicador de los compuestos orgánicos, fijos o volátiles, naturales o sintéticos, presentes en las aguas residuales [109]. Para la determinación de carbono orgánico total se utilizó el test NANOCOLOR® de Macherely-Nagel TOC referencia 985099, el cual permite medir concentraciones de COT entre 40 y 600 mg/L.

La determinación de COT se efectúa en dos fases. En primer lugar, se realiza una extracción del carbono inorgánico (CIT) para posteriormente disgregar el carbono orgánico (COT) y determinar el dióxido de carbono existente por la reacción con un indicador.

#### **2.2.5.8. Analizador de Biogás 5000**

En el mercado existen diferentes métodos que aplican distintas tecnologías para la medición del biogás. En la mayoría de las ocasiones, el medidor de biogás debe tener como característica primordial su portabilidad, por ello, en esta tesis doctoral, se ha utilizado el analizador de biogás portátil por infrarrojos ATEX de la marca comercial Geotech.

Este analizador para biogás, mide  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  y la lectura se produce gracias a que una fuente luminosa se encuentra en el foco de un espejo parabólico. La luz emitida, pasa a través de la muestra de gas llegando los cinco filtros: uno para el metano, otro para dióxido de carbono, otro para el oxígeno, otro para el ácido sulfhídrico y un quinto que actúa como referencia.

Detrás de cada uno de los filtros, se encuentra un detector que mide la cantidad de radiación que pasa a través del cada filtro. El sistema compara la diferencia de radiación que pasa a través del filtro de referencia y cada uno de los filtros específicos para cada gas. De esta manera, se obtienen las cantidades en porcentajes de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  presentes en la muestra de gas.

#### **2.2.5.9. Caracterización textural y morfológica del material poroso**

Los análisis texturales y morfológicos que se les ha realizado al material poroso optimizado, se han llevado a cabo en el servicio de apoyo a la investigación de la Universidad de Extremadura, concretamente en el Servicio de Análisis y Caracterización de Sólidos y Superficies (SACS).

##### **1. Análisis elemental**

Para determinar la composición química del material se realizó un análisis elemental con el analizador LECO CHNS-932. El contenido en cenizas se determinó mediante la incineración de una muestra en una mufla de la marca Selecta a  $600\text{ }^\circ\text{C}$  hasta que su masa fue constante, lo que llevó aproximadamente 12 horas.

##### **2. Porosimetría y densidad de mercurio**

Para la porosimetría, se utilizó un porosímetro Quantachrome PoreMaster 60, con  $\sim 0.326\text{ g}$  de muestra en el soporte de vidrio que se evacuó mediante una bomba de aceite antes de llenarlo con mercurio, determinando la densidad de mercurio de la

muestra a partir de conocer el volumen del soporte de vidrio previamente calibrado y la densidad del mercurio líquido a la temperatura de trabajo. La densidad del mercurio se midió en un estereopícnómetro Quantachrome, utilizando ~3 g de muestra.

### 3. *Isotermas de adsorción*

Se determinó la isoterma de adsorción de N<sub>2</sub> a -196 °C sobre 0,118 g de muestra en un aparato Quantachrome Autosorb-1 después de desgasificar la alícuota a 120 °C durante 12 h.

### 4. *Microscopio electrónico de barrido, SEM*

Las imágenes de microscopio electrónico se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo Quanta 3D FEG (FEI Company) que funcionaba en modo de alto vacío bajo una tensión de aceleración que oscilaba entre 0,1 y 30 kV, y un detector Everhart Thornley para electrones secundarios. Se adquirieron varias imágenes SEM de regiones de partículas y granos elegidos al azar para cada muestra a diferentes aumentos.

## **2.2.6. Metodología para la estimación de los beneficios medioambientales de la digestión anaerobia.**

Dado el carácter orgánico de los subproductos generados por la industria agroalimentaria, su depósito en vertederos y posterior descomposición natural, dará lugar a la emisión de gases de efecto invernadero, principalmente dióxido de carbono y metano.

Si en vez de dejar que estos subproductos se descompongan de forma natural, se tratan mediante DA, el metano obtenido sería utilizado como fuente de energía y sólo se emitiría a la atmósfera el dióxido de carbono producido de forma natural en la descomposición de la materia orgánica, más el generado en la combustión del metano para la obtención de energía útil [47].

Para estimar las emisiones de CO<sub>2</sub> equivalentes que podrían evitarse si los residuos agroindustriales fueran tratados mediante digestión anaerobia, se ha seguido una metodología desarrollada por nuestro Grupo de Investigación y muy validada [47].

Con este fin, se debe conocer la generación anual de cada subproducto por las industrias agroalimentarias, así como los rendimientos de biogás y metano obtenidos en las experiencias de biometanización realizadas en el laboratorio.

Además, se deben realizar dos consideraciones: que los volúmenes emisores totales de metano y dióxido de carbono a la atmósfera, si los subproductos se descomponen de manera natural o se depositan en vertedero para su putrefacción son los mismos que produciría la DA. Es decir, se tiene en cuenta que la DA no es más que una aceleración, en condiciones controladas, del proceso de putrefacción natural de la materia orgánica, y que se desprecian el resto de gases traza obtenidos en la DA, considerando únicamente el CO<sub>2</sub> y el metano [110].

Además, según el IPCC 2018, se considera que el potencial de calentamiento global (es decir, la capacidad del gas para atrapar calor en la atmósfera) del metano es 28 veces superior al del dióxido de carbono para los próximos 100 años [111].

Finalmente, la diferencia entre la emisión de dióxido de carbono equivalente que se generaría si todos los residuos se depositaran en vertedero y las emisiones provocadas en el uso de metano como fuente de energía dará lugar a las emisiones evitadas por el tratamiento anaerobio.

El procedimiento de cálculo se describe a continuación:

Las emisiones equivalentes de dióxido de carbono derivadas de la degradación natural son la suma de las Ecuaciones: 2.9 y 2.10.

$$\frac{Nm^3 CH_4}{año} = \text{Residuos generados} \left( \frac{m^3 \text{ sustrato}}{año} \right) \times \text{producción de metano por DA} \left( \frac{Nm^3 CH_4}{m^3 \text{ sustrato}} \right) \quad (2.6)$$

$$\frac{Nm^3 CO_2}{año} = \text{Residuos generados} \left( \frac{m^3 \text{ substrate}}{año} \right) \times \text{producción de CO}_2 \text{ por DA} \left( \frac{Nm^3 \text{ biogás}}{m^3 \text{ sustrato}} \times \% CO_2 \right) \quad (2.7)$$

$$\text{Emisiones de metano} \left( \frac{kg CH_4}{año} \right) = \frac{Nm^3 CH_4}{año} \times \text{densidad de } CH_4 \left( \frac{kg CH_4}{Nm^3 CH_4} \right) \quad (2.8)$$

$$\text{Emisiones de Dióxido de Carbono } \left( \frac{\text{kg CO}_2}{\text{año}} \right) = \frac{\text{Nm}^3 \text{CO}_2}{\text{año}} \text{ densidad de CO}_2 \left( \frac{\text{kg CO}_2}{\text{Nm}^3 \text{CO}_2} \right) \quad (2.9)$$

$$\text{Emisiones de dióxido de carbono equivalentes } \left( \frac{\text{kg}}{\text{año}} \right) = \text{Emisiones de metano} \times 28 \quad (2.10)$$

Las emisiones equivalentes totales de dióxido de carbono derivadas de la digestión anaerobia de un residuo orgánico son la suma de las emisiones de dióxido de carbono generado en la digestión anaerobia y las debidas al uso energético (combustión) del metano (ecuaciones 2.11 y 2.12).

Se ha tenido en cuenta que  $\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 9,8 \text{ kWh/m}^3$  de  $\text{CH}_4$ ; es decir, la combustión de 1 mol de metano genera 1 mol de dióxido de carbono.

$$\text{Emisiones de dióxido de carbono por combustion de metano } \left( \frac{\text{kg}}{\text{año}} \right) = \frac{\text{n}^\circ \text{ moles generados por DA}}{\text{año}} \times \text{Peso molecular del dióxido de carbono} \quad (2.11)$$

$$\text{Emisiones de dióxido de carbono por DA } \left( \frac{\text{kg}}{\text{año}} \right) = \frac{\text{Nm}^3 \text{CO}_2}{\text{año}} \times \text{densidad de CO}_2 \left( \frac{\text{kg CO}_2}{\text{Nm}^3 \text{CO}_2} \right) \quad (2.12)$$

Las emisiones totales de dióxido de carbono equivalentes evitadas son la diferencia entre las emisiones equivalentes de dióxido de carbono derivadas de la degradación natural (que suponemos iguales a las emisiones generadas en la DA) y las emisiones equivalentes de dióxido de carbono derivadas de la combustión del porcentaje de metano del biogás obtenido en la DA.

### 2.2.7. Metodología para la estimación del potencial energético de la biomasa residual húmeda.

Tanto la metodología seguida para estimar el potencial energético como la del dimensionado de las plantas de DA industriales, ha sido la que se desarrolló y validó en la Tesis Doctoral de mi codirectora [47]. La fórmula matemática utilizada para estimar el potencial energético de los residuos agroindustriales extremeños viene dada por la siguiente expresión:

$$\text{Pt(kW)} = ((P_{\text{sustrato}} \times P_{\text{CH}_4} \times P_{\text{CCH}_4}) / n) \times \eta \quad (2.13)$$



Donde  $P_{\text{sustrato}}$  es la cantidad total de sustrato (subproducto) a tratar;  $P_{\text{CH}_4}$  la producción de metano obtenida en los ensayos de DA de laboratorio medida en  $\text{Nm}^3_{\text{CH}_4}/\text{m}^3$  de sustrato (N representa en condiciones normales de presión y temperatura);  $PC_{\text{CH}_4} = 9,80 \text{ kWh} / \text{Nm}^3_{\text{CH}_4}$  es el poder calorífico del metano;  $n = 8000$  es el número anual de horas al año porque se considera que será necesario hacer interrupciones durante aproximadamente el 8% del tiempo por motivos de mantenimiento y  $\eta = 0,85$  la eficiencia térmica de la caldera en la que se quema el biogás.

La energía térmica total,  $E_t$ , que se obtendría quemando el biogás generado durante un año, se calcula mediante la Ec. (2.14):

$$E_t (\text{kWh}) = P_{\text{sustrato}} \times P_{\text{CH}_4} \times PC_{\text{CH}_4} \times \eta \quad (2.14)$$

### **2.2.8. Metodología para el dimensionado de plantas de digestión anaerobia**

En este apartado se describe el procedimiento de dimensionado de los principales componentes presentes en toda planta de digestión anaerobia: tanque de mezcla y alimentación, digestor y su aislamiento, tanque de almacenamiento del efluente digerido, gasómetro y separador sólido-líquido. Así como el triturador para los residuos de estiércol y del matadero de matadero de aves.

#### ***2.2.8.1. Dimensionado del tanque de mezcla y alimentación***

Las dimensiones del tanque de mezcla y alimentación deben presentar un volumen tal que permita almacenar, al menos, todo el sustrato que deba ser tratado diariamente, sin embargo, por cuestiones de seguridad y para facilitar el manejo de la planta de biometanización suele dimensionarse para almacenar al menos el residuo necesario para operar durante 3 días (Ecuación 2.15).

$$V_{\text{tanque de mezcla y alimentación}} (\text{m}^3) = 3 \times \frac{\text{Residuos generados (R)}}{t/24} \quad (2.15)$$

Donde, R es la generación de residuo en  $\text{m}^3/\text{año}$  y t es el tiempo de operación anual de la planta de digestión anaerobia en h/año.

### 2.2.8.2. Dimensionado del digestor anaerobio y de su aislamiento

El volumen útil del digestor anaerobio debe ser tal que permita almacenar el sustrato a tratar diariamente durante el tiempo de residencia hidráulico determinado como óptimo. A este volumen mínimo se le añadirá un 25 % adicional de seguridad para hacer frente a las posibles ampliaciones de la planta.

$$V_{\text{digestor anaerobio}}(\text{m}^3) = \frac{P_{\text{sustrato}} \left( \frac{\text{m}^3}{\text{año}} \right)}{\frac{\text{días}}{\text{año}}} * TRH(\text{días}) * 1.25 \quad (2.16)$$

En general, los digestores anaerobios tienen forma cilíndrica y son estancos al aire y al agua, por lo que un aspecto muy importante a tener en cuenta a la hora de dimensionar el digestor anaerobio es la superficie de aislamiento necesaria de las paredes y la base del reactor.

Por lo tanto, el cálculo del aislamiento de las paredes y el suelo se realiza mediante el área lateral y el área de la base de un cilindro (ecuaciones 2.17 y 2.18).

$$\text{Aislamiento de la pared } (\text{m}^2) = h \times 2\pi \quad (2.17)$$

Donde, h es la altura del digestor (m) y r es el radio del digestor (m).

$$\text{Aislamiento del suelo } (\text{m}^2) = \pi \times r^2 \quad (2.18)$$

Siendo, r es el radio del digestor en metros.

### 2.2.8.3. Dimensionado del tanque de almacenamiento

Tras gestionar los subproductos a través del proceso de digestión anaerobia, se genera un digestato (efluente) que debe almacenarse. El dimensionamiento del tanque de almacenamiento de digestato se calcula para una capacidad de normalmente dos días.

$$V_{\text{tanque de almacenamiento}}(\text{m}^3) = \text{días de almacenamiento} * \frac{\text{Residuos generados } \left( \frac{\text{m}^3}{\text{año}} \right)}{\text{días de operación anual de la planta}} \quad (2.19)$$

### 2.2.8.4. Dimensionado del separador sólido-líquido

El digestato debe separarse en dos fracciones: líquida y sólido. El separador está diseñado para tratar el digestato de 1 día cada 8 horas. Por tanto, el volumen del separador será de:

$$V_{\text{separador}}(\text{m}^3) = \left( \frac{\text{Residuos generados } \left( \frac{\text{m}^3}{\text{año}} \right)}{\text{días de operación anual de la planta}} \right) / \left( \frac{24\text{h}}{8\text{h}} * 1 \text{ día} \right) \quad (2.20)$$

#### **2.2.8.5. Dimensionado del gasómetro**

Un elemento muy importante de una planta de DA es el gasómetro. El gasómetro es un depósito donde se almacena el biogás (biocombustible) generado por el proceso antes de ser utilizado como fuente de energía para el propio consumo de la industria.

Para calcular su volumen, es necesario conocer el rendimiento energético de la reacción. Esto puede hacerse mediante revisión bibliográfica o experimentación en laboratorio. En nuestro caso, se supone una capacidad de almacenamiento será de dos días. De esta forma, el volumen del gasómetro puede estimarse según la Ecuación (2.21).

$$V_{\text{gasómetro}} (\text{m}^3) = \text{producción de biogás por DA} (\text{m}^3\text{Nbiogás /día}) * 2 \text{ días} \quad (2.21)$$

#### **2.2.8.6. Dimensionado del triturador**

El triturador es un equipo esencial en toda planta de digestión anaerobia que trate residuos con un tamaño de partículas elevado y no homogéneo.

El triturador debe presentar un volumen útil igual a la cantidad de residuos sólidos generados diariamente, a este volumen hay que añadirle un 25 % adicional para compensar los incrementos de volumen producidos durante el proceso de triturado. Por tanto, su volumen total se calcula según la Ecuación (2.22).

$$V_{\text{triturador}} (\text{m}^3) = R_s \times 1,25 \quad (2.22)$$

Donde,  $R_s$  es el volumen de residuos sólidos medidos en  $\text{m}^3/\text{día}$ .

### **2.2.9. Metodología para la evaluación de la viabilidad económica de plantas de biometanización industriales**

Uno de los aspectos clave para analizar la viabilidad económica de una planta de biogás es realizar un estudio financiero. Los principales hitos a tener en cuenta son: la inversión inicial, una previsión de los costes fijos y variables y los ingresos obtenidos. Además, hay que tener en cuenta los recursos propios y externos. La metodología seguida para la realización de la viabilidad económica ha sido cedida por la Spin off Metanogenia S.L.

Algunos de los hitos a seguir, se definen a continuación.

#### **2.2.9.1. Costes de instalación**

Incluyen los costes de construcción, los costes de los materiales y equipos de la planta de DA, costes administrativos (autorizaciones y permisos de construcción), y otros costes como elementos de seguridad, estudio de viabilidad económica y asesoramiento industrial y los relativos a la puesta en marcha.

#### **2.2.9.2. Inversión total**

Una vez estimado el capital fijo y circulante, será fundamental disponer de las fuentes de financiación necesarias para aportar este capital. Estas fuentes de financiación pueden ser: autofinanciación y participación en el capital (financiación de préstamos).

En este caso, según el Decreto 169/2016, de 18 de octubre [112], para la construcción de una planta de gestión de este tipo de residuos se dispone de una subvención máxima de 300.000 euros. Además, también se ha considerado que el promotor solicitará un préstamo bancario equivalente al 75 % del coste total de la planta, siendo la aportación propia del promotor del 25 %.

#### **2.2.9.3. Gasto anual**

Los costes anuales de explotación y mantenimiento (recepción, manipulación y control de los residuos de entrada, reparación y sustitución de equipos, gestión administrativa de la planta, etc.) suponen el 1 % del coste total de la planta.

Para la amortización del préstamo bancario, se supone que el préstamo solicitado es a 15 años y tiene un tipo de interés medio de acuerdo al mercado en cada momento. La vida útil de la instalación es de 25 a 30 años.

#### **2.2.9.4. Ingreso anual**

Esta cantidad procede del ahorro anual de combustibles fósiles de la industria. Esta industria utiliza actualmente gasoil, siendo el precio del gasoil en España, el correspondiente al mercado en cada momento [113].

#### **2.2.9.5. Beneficios anuales**

Los beneficios de las plantas de digestión anaerobia provienen de los costes energéticos evitados y los ahorros en el tratamiento de los residuos generados por la industria en consideración. Por tanto, el cálculo de los beneficios anuales de una determinada agroindustria dependerá fundamentalmente del escenario considerado.

Si las necesidades de una empresa son únicamente de energía térmica, sólo se utilizará para este fin el volumen de metano restante tras hacer frente a las necesidades de calor de la planta de digestión anaerobia.

La energía térmica necesaria para mantener al digestor anaerobio a 38 °C se calculó considerando el calor necesario para contrarrestar las pérdidas de calor del digestor anaerobio. Este dato es un valor empírico validado a escala industrial. Si se supone que el rendimiento de la caldera de biogás es del 85%, se puede afirmar que la cantidad de biogás utilizada en el autoconsumo térmico de la planta está en torno al 7-8%. Estas pérdidas varían en función del material aislante del digestor y de la latitud de la instalación, pero está demostrado que este porcentaje es adecuado para España.

Para calcular la demanda mes a mes y poder realizar la media mensual, se han tenido en cuenta las temperaturas medias para cada mes del año del sustrato de entrada a la planta, la temperatura ambiente y la del suelo. Siendo la demanda de calor durante los meses de verano el 36,5 % de la demanda en invierno.

Así, los beneficios económicos se obtienen debido a los costes evitados en el consumo de combustibles fósiles. El cálculo de estos ahorros se realizó considerando un poder calorífico del gasoil de calefacción (gasóleo C) de 35,93 MJ/L [113].

#### **2.2.9.6. Parámetros económicos**

Finalmente, para cuantificar la viabilidad económica de una planta de digestión anaerobia a escala industrial se deben calcular el Periodo de Retorno de la Inversión (PRI), el Valor Actualizado Neto (VAN) y la Tasa Interna de Retorno (TIR).

Estos parámetros permiten comparar los proyectos entre sí y determinar que subproducto o escenario ofrece una mayor rentabilidad.

En el cálculo de estos parámetros se ha considerado un incremento medio del 3 % anual en el precio de la electricidad, en los costes de mantenimiento, transporte y tratamiento de residuos y un aumento medio del precio del gasoil de un 2,3 %.

### 2.2.10. Metodología seguida para la optimización de los protocolos de qPCR SYBR Green

En la figura 2.4, se muestra un esquema general de la metodología empleada para la optimización de los métodos de qPCR.

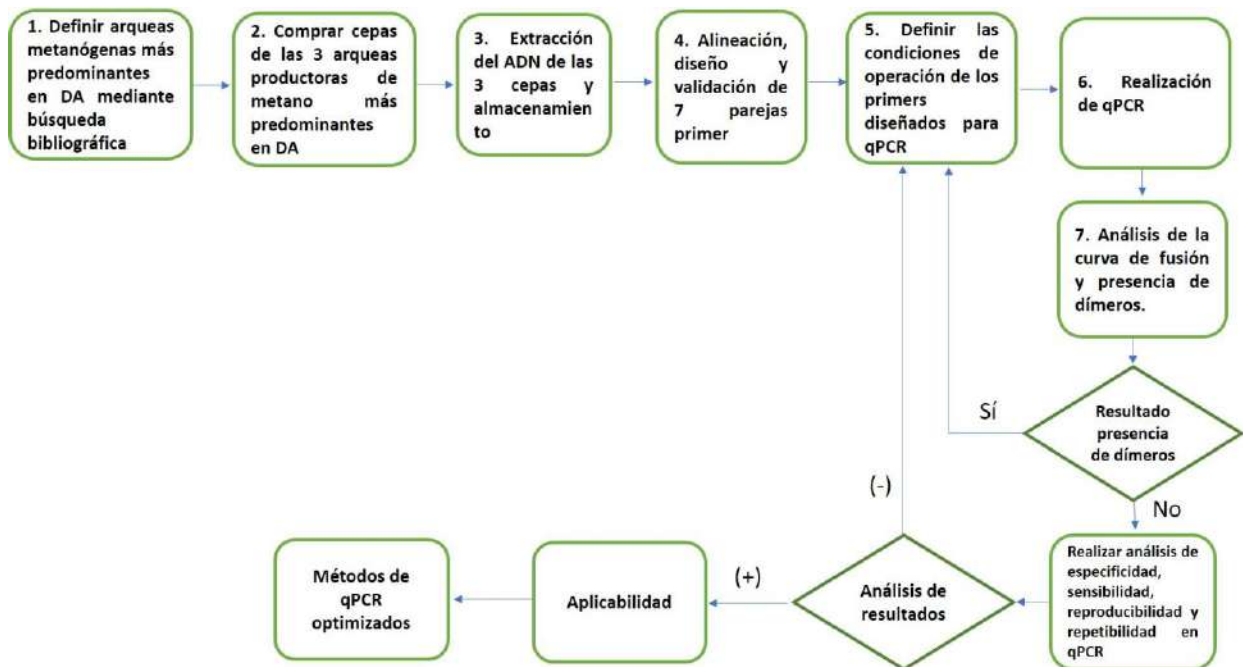


Figura 2.4. Esquema resumen de los pasos seguidos para la optimización de los tres métodos de qPCR

#### 2.2.10.1. Cepas de arqueas productoras de metano

Para la optimización de la qPCR se utilizaron tres cepas tipo *Methanoculleus bourgensis* DSMZ 8220, *Methanobacterium formicicum* DSMZ 1535 y *Methanosarcina barkeri* DSMZ 1538, pertenecientes a la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ).

Las cepas *M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 y *M. barkeri* DSMZ 1538 se adquirieron como cultivo activo y se conservaron a -80 °C en glicerol hasta la extracción del ADN. En trabajos previos realizados por el grupo de investigación DTERMA se han encontrado cepas de las familias *Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae* y *Methanosarcinaceae* en ensayos de cultivo tradicional con muestras de las experiencias de digestores anaerobios de laboratorio y se han caracterizado mediante técnicas moleculares convencionales.

#### **2.2.10.2. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó con el kit de extracción de ADN microbiano NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se eluyó en 50 µL de tampón de elución BE y se almacenó a -20 °C hasta su utilización. La pureza y concentración del ADN extraído de cada cepa se midió con un espectrómetro (espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) utilizando la relación  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$ . Finalmente, se calculó el número teórico de copias del gen al que corresponde para cada tamaño estándar.

#### **2.2.10.3. Diseño de Primers**

Para el desarrollo de la metodología de qPCR en primer lugar se diseñaron varios pares de primers para detectar y cuantificar específicamente las bacterias *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina* de forma individual. Para ello, se utilizaron secuencias parciales del 16S ARNr de *Methanoculleus* (AB065297, M59142.1, NR\_042786.1), *Methanobacterium* (AY386124, AF169245, MT889736.1, EU333914.2, CP002772.1, CP002551.1, CP0006933.1) y *Methanosarcina* (M59137, CP009512.1, CP032683.1, CP042908.1, M59144.1) recuperados del Proyecto de la base de datos ribosómicos (RDP-II), los cuales, fueron editados y alineados por el recurso Clustal Omega del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL) [114].

La alineación mostró regiones conservadas entre las secuencias utilizadas, que se emplearon para diseñar los respectivos pares de primers utilizando el software Primer3Plus [115, 116].

Después de diseñar los primers de qPCR, se realizó una validación "in-silico" para confirmar la especificidad de los primers alineando las secuencias de los primers con las secuencias publicadas de 16S ARNr de las cepas de referencia de los tres géneros objetivo usando BLAST [117].

Los primers fueron purificados mediante HPLC y fabricados por Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Madrid, España).

Los requisitos que se llevaron a cabo para diseñar los primers en este trabajo fueron los siguientes: el porcentaje de bases G + C se ajustó para que estuviera entre el 40 % y el 70 %. Se excluyeron los primers con una fuerte posibilidad de autocomplementariedad o de formación de dímeros; Se rechazaron los primers con más de dos bases degeneradas.

#### **2.2.10.4. Optimización de las condiciones de PCR en tiempo real**

Para la amplificación y detección de la qPCR se utilizó el sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) (Figura 2.5).

La qPCR se preparó por triplicado con 12,5 µL de mezcla de reacción en placas de reacción ópticas de 96 pocillos MicroAmp y se sellaron con cubiertas adhesivas ópticas (Applied Biosystems).



**Figura 2.5.** Sistema de qPCR StepOne™ (Applied Biosystem)

También se incluyeron en las ejecuciones tres réplicas de una muestra de control negativo (NTC), es decir, sin ADN.

Todos los pares de primers diseñados se evaluaron en varios protocolos SYBR Green para optimizar la mezcla y las condiciones de la qPCR.



Brevemente, las mezclas de reacción para la amplificación de cada gen consistieron en 6,25 µL de Master Mix 2x (NZYTech, Lisboa, Portugal), 2,5 µL de plantilla de ADN (aproximadamente  $10^4$  números de copias de gen) y diferentes concentraciones de cada primer. Para ello, se utilizaron las cepas diana *M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 y *M. barkeri* DSMZ 1538.

Para optimizar la concentración del primer, se probaron 7 concentraciones diferentes, es decir, 300, 150, 75, 50, 25, 10 y 5 nM. Para optimizar las condiciones de qPCR, se ensayaron diferentes temperaturas y tiempos de hibridación que oscilaron entre 58 y 62 °C y entre 30 s y 1 min.

Las condiciones óptimas de SYBR Green qPCR para probar la eficacia de los primers fueron, en todos los casos, un solo paso de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min, seguido del análisis de la curva de fusión de los productos de PCR, que consiste en una rampa lenta entre 60 y 95 °C incrementando de 0,3 °C durante 15 s.

Después del ciclo de PCR final, se realizaron análisis de la curva de fusión de los productos de la PCR y se verificaron los valores de las temperaturas de fusión para garantizar la confiabilidad de los resultados y la especificidad de los primers.

El valor del ciclo de cuantificación (Cq), correspondiente al número de ciclo de PCR en el que se detectó fluorescencia por encima del umbral, se calculó automáticamente mediante el software StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **2.2.10.5. Curvas estándar, sensibilidad y especificidad**

Se desarrollaron curvas estándar para las tres especies metanogénicas utilizando como solución madre el ADN cuantificado de las cepas *M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 y *M. barkeri* DSMZ 1538.

Las soluciones madres se diluyeron en serie por un factor de 10, y una alícuota de cada dilución, con concentraciones que oscilaban entre  $5 \times 10^5$  y 5 números de copias de genes para cada cepa de referencia, se utilizó como estándar durante cada configuración de la reacción de qPCR. Las curvas estándar individuales con cada una de las tres especies productoras de metano se realizaron por triplicado.

Los criterios considerados para la confiabilidad de los métodos diseñados fueron el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y la eficiencia de amplificación calculada a partir de la fórmula  $E = 10^{-1/S} - 1$  (S es la pendiente del ajuste lineal) [118,119].

También se determinó el límite de detección (LDD) de los protocolos qPCR; que corresponde a la concentración estándar más baja de ADN molde que produjo al menos un 95 % de réplicas positivas en un ensayo de dilución.

La especificidad de los tres pares de primers se analizó en una cantidad fija del número de copias del gen ( $10^4$  números de copias del 16S ARNr).

Para realizar las pruebas de especificidad se utilizaron las tres cepas de referencia (*M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 y *M. barkeri* DSMZ 1538) y doce cepas pertenecientes a especies comúnmente encontradas en lodos (*Escherichia coli* CECT 4267, *Enterobacter cloacae* S46, *Citrobacter freundii*, *Advenella*, *Alkaliphilu hydrothermalis*, *Alkaliphilus sp.*, *Clostridium disporicum*, *Acinetobacter sp.*, *Lactobacillus paracasei*, *Latilactobacillus sp.*, *Alkaliphilus sp.*, *Alkaliphilus sp.*).

Además, para evaluar la especificidad de los primers diseñados para el ensayo SYBR Green, se calculó automáticamente la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y se comparó con la deducida de la secuencia del fragmento esperado [120].

#### **2.2.10.6. Reproducibilidad y repetibilidad**

Se define repetibilidad como la precisión determinada en condiciones en las que el mismo operador utiliza los mismos métodos y equipos para realizar mediciones en muestras idénticas y la reproducibilidad está definida como la precisión determinada en condiciones en las que se utilizan los mismos métodos, pero diferentes equipos o intervienen distintos operadores [120].

Para las pruebas de repetibilidad, tres muestras fueron tratadas por el mismo operador y analizadas en el mismo equipo (StepOne™ Real-Time PCR System). En relación con los ensayos de reproducibilidad, tres muestras fueron tratadas por el mismo operador con dos sistemas qPCR diferentes (StepOne™ Real-Time PCR System y 7300 Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.) ubicados en la Universidad de Extremadura, y cinco muestras fueron tratadas por dos operadores diferentes y analizadas en el mismo laboratorio y con el mismo equipo.

Los valores de C<sub>q</sub> para las muestras se obtuvieron a partir de curvas estándar construidas previamente. En cada experimento se incluyeron tres muestras de controles negativos.

#### **2.2.10.7. Aplicabilidad del método qPCR desarrollado**

La aplicabilidad de los protocolos qPCR optimizados para detectar y cuantificar las tres especies productoras de metano se probó utilizando diferentes muestras de un lodo digerido de un digester mesófilo a escala de laboratorio (capacidad del reactor 2 L).

Para ello se liofilizaron 10 mL de lodos (Lyobeta, Azbil Telstar Technologies SLU) y para la extracción de ADN se utilizaron 0,18 g de lodos liofilizados mediante un kit NucleoSpin DNA Stool (Macherey-Nagel). La presencia de las tres especies productoras de metano diferentes se cuantificó con el sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems) en condiciones optimizadas.

Posteriormente, se obtuvieron los valores medios de C<sub>q</sub> de los tres géneros en estudio y con las curvas de calibración construidas se obtuvo el número de copias del gen de cada género.

Además, se calculó el porcentaje de presencia de cada género en las muestras asumiendo que el 100% de la población microbiana de los lodos estaba compuesta únicamente por los géneros *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina*. Finalmente, para asegurar la veracidad de los resultados, se realizó un ensayo de inhibición mezclando cantidades de ADN de cada uno de los tres microorganismos diana y cantidades de ADN extraídas del residuo orgánico, ADN no diana (100/0; 75/25; 50/50; 25/75; 0/100).

#### **2.2.10.8. Análisis estadístico**

Para el tratamiento estadístico se utilizó el software IBM SPSS Statistic versión 20 (IBM, EE.UU.). Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional para determinar diferencias significativas dentro los grupos y entre ellos en los ensayos de repetibilidad (días, operadores) y reproducibilidad. Finalmente, se aplicó la prueba de Tukey para comparar los valores medios. La significación estadística se estableció en  $p \leq 0,05$ .



## **Capítulo 3. DESCRIPCIÓN DE LAS PUBLICACIONES**



A continuación, se detallan los artículos científicos que conforman el compendio de publicaciones de la presente Tesis Doctoral, indicando los datos editoriales, los indicios de calidad, un resumen de cada artículo científico y exponiendo los principales resultados obtenidos.

### 3.1. Waste valorization as an example of circular Economy in Extremadura (Spain)

#### [Waste valorization as an example of circular Economy in Extremadura \(Spain\)](#) (ANEXO I)

##### 3.1.1. Datos editoriales

<b>Título</b>	Waste valorization as an example of circular Economy in Extremadura (Spain)			
<b>Autores</b>	F. Cuadros Blázquez, A. González González, C. Sánchez Sánchez*, V. Díaz Rodríguez, F. Cuadros Salcedo			
<b>Revista</b>	Journal of Cleaner Production	<b>Año</b>	2018	
<b>Volumen</b>	181	<b>Página</b>	136-144	<b>Editorial</b>
<b>DOI</b>	10.1016/j.jclepro.2018.01.228		<b>ISSN</b>	1879-1786
			Elsevier	

##### 3.1.2. Indicios de calidad

<b>Fuente de impacto</b>	WOS (JCR)	<b>Índice de impacto</b>	6,395
<b>Categoría</b>	Green & sustainable science & technology	<b>Cuartil</b>	Q1
<b>Posición de la revista en la categoría</b>	6	<b>Número de revistas en la categoría</b>	35
<b>Citas en Web of Science</b>	12	<b>Citas en Scopus</b>	12
<b>Citas en Scholar</b>	17	<b>Citas en Researchgate</b>	19

##### 3.1.3. Resumen

La reducción de los impactos ambientales causados por la inadecuada gestión de los subproductos generados en la industria agroalimentaria, es una de las actividades más críticas del sector. Esta investigación, demuestra la posibilidad de implementar una tecnología limpia y renovable que permite obtener rentabilidad de los residuos altamente contaminantes de la industria avícola.

El proceso de digestión anaeróbica (DA) puede reducir significativamente la demanda química de oxígeno (DQO) general, y la DQO del digestato dentro de los límites legales mediante un proceso de separación de sus fases líquida y sólida.

La fase líquida resultante cumple con la normativa en materia de vertido a la red de alcantarillado o como riego de cultivos sin contacto directo con los frutos. La fase sólida puede someterse a compostaje, obteniendo una enmienda agrícola de buena calidad. Los materiales utilizados en la construcción de la planta de DA industrial (acero, hierro, hormigón, pinturas, poliuretano, y plásticos de PVC y HDPE) son fácilmente reutilizables o reciclables si se siguen unos protocolos estándares una vez que la planta DA ha llegado al final de su vida útil (25 a 30 años).

El estudio de viabilidad económica de la planta industrial, basada en los resultados anteriores, mostró que los parámetros económicos, como el período de retorno de la inversión (PRI), el valor presente neto (VAN) y la tasa interna de retorno (TIR), son favorables. En concreto, con el uso de esta tecnología se consigue un PRI de 7 años y una TIR del 14 %.

Que la planta sea económicamente viable demuestra que el empleo de materiales convencionales no representa un ahorro económico significativo frente al empleo de materiales que cuentan con protocolos estandarizados para su reciclaje, con la consiguiente reducción de impactos negativos sobre el medio ambiente.

#### **3.1.4. Resultados**

Tras la realización de una caracterización físico-química de los subproductos que se generan en la industria avícola (Tabla 3.1), se determinó que la composición del sustrato óptima debía estar formada por un 1,5 % de sangre, 86,2 % de aguas residuales y 12,3 % de lodos activados.



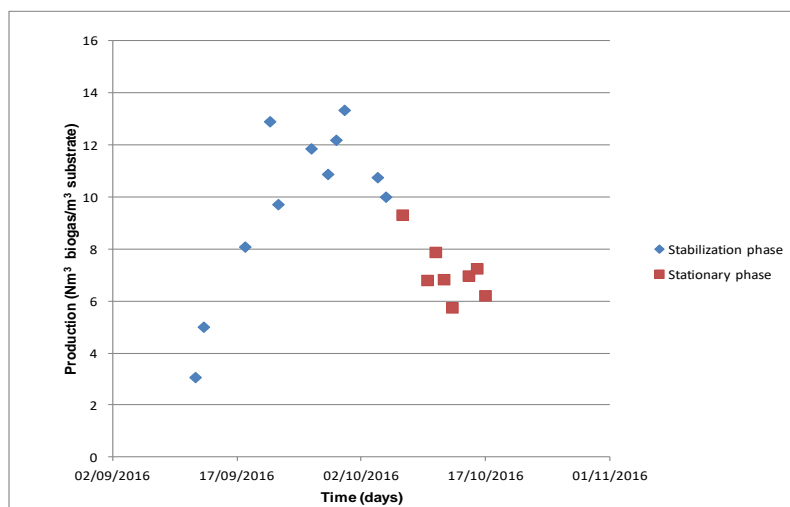
**Tabla 3.1.** Caracterización de la materia prima residual utilizada en este trabajo

	Sustrato	
	Valor Medio	Desviación Estándar
<b>pH</b>	6,50	0,22
<b>AGV (g CH<sub>3</sub>COOH/L)</b>	1,51	0,81
<b>Alcalinidad (g CaCO<sub>3</sub>/L)</b>	1,23	0,38
<b>DQO total (g O<sub>2</sub>/L)</b>	21,56	0,42
<b>Nitrógeno kjeldah (g/L)</b>	1,01	0,26
<b>SST (g/L)</b>	5,10	2,21
<b>SMS (g/L)</b>	0,22	0,11
<b>SDT (g/L)</b>	5,95	4,64
<b>SVS (g/L)</b>	5,10	1,56
<b>SDM (g/L)</b>	0,23	0,16
<b>SVD (g/L)</b>	5,73	4,62

*Siendo: SST, sólidos totales en suspensión; SMS, sólidos minerales en suspensión; SDT, sólidos totales disueltos; SDM, sólidos minerales disueltos; AGV, ácidos grasos volátiles; SVS, sólidos volátiles en suspensión; SVD, sólidos volátiles disueltos.*

Tras varios ensayos de DA en el laboratorio en condiciones mesófilas, se determinó que el caudal y el TRH óptimo que permite mantener la estabilidad de proceso y obtener el mayor rendimiento energético es de 0,160 L/día y de 13 días, respectivamente.

En la Figura 3.1, se observa la evolución de la producción de biogás en la que se distinguen dos etapas, la primera es la fase de estabilización de la reacción bioquímica en la que hay una fluctuación brusca de la producción de biogás y tras 2 TRH esta fluctuación disminuye entrando en una fase estacionaria con una producción media de  $11,89 \pm 4,53 \text{ m}^3\text{N biogás/m}^3$  de sustrato y un porcentaje de metano del  $58,37 \pm 14,10 \%$ .



**Figura 3.1.** Evolución de la producción de biogás (TRH=13 días)

Una vez conocido el potencial energético de estos subproductos, y sabiendo la producción anual de subproductos que se generan en el matadero de aves, se cuantificó el efecto medioambiental positivo debido a la reducción de gases de efecto invernadero al utilizar el metano generado en la DA como fuente de energía térmica. El resultado dio lugar a una reducción de CO<sub>2</sub> equivalente a la atmósfera de unas 7,25 veces.

Además, en esta investigación se realizó el dimensionamiento de una planta real de biogás para tratar los subproductos que se generan en un matadero concreto situado en Extremadura y se realizó un análisis de viabilidad económica. Los resultados mostrados en la tabla 3.2 concluyen que la construcción de este tipo de plantas es viable desde el punto de vista económico ya que se obtiene un TIR del 14 %, un VAN de 2.894.685 € y un PRI de 7 años.

**Tabla 3.2.** Viabilidad económica de la planta DA

<b>Datos</b>	<b>Sustrato a procesar (m<sup>3</sup>/año)</b>	158.340
	<b>Producción de metano (m<sup>3</sup> metano/m<sup>3</sup> sustrato)</b>	6,94
	<b>Producción de biogás (m<sup>3</sup> biogás/m<sup>3</sup> sustrato)</b>	11,89
<b>Producción</b>	<b>Potencia térmica (kW)</b>	1.144
	<b>Energía Total (kWh)</b>	9.153.922
	<b>Energía consumida por la planta (kWh)</b>	6.817.487
	<b>Energía Neta disponible (kWh)</b>	2.336.435
<b>Coste planta de biogás</b>	<b>Coste total de instalación (€)</b>	1.154.941
<b>Costes anuales</b>	<b>Costes de operación y mantenimiento (€)</b>	11.078
	<b>Amortización (€)</b>	13.518
	<b>Gastos totales anuales (€)</b>	24.596
<b>Ingresos totales</b>	<b>Ahorro anual de energía térmica (€)</b>	227.077
	<b>Ingresos anuales (€)</b>	202.481
<b>Ratios económicos</b>	<b>PRI (años)</b>	7
	<b>VAN (€)</b>	2.894.685
	<b>TIR (%)</b>	14%

Finalmente, se realizó un análisis de los materiales y componentes convencionales que se utilizan para la construcción de una planta de DA, frente a los que tienen protocolos estandarizados de reciclaje una vez que la planta llega al final de su vida útil.

Se observó que utilizando estos últimos materiales que corresponden con una filosofía de Economía Circular, la viabilidad económica de la planta sigue siendo positiva (Tabla 3.2) con la consiguiente reducción de los impactos ambientales negativos (gasto energético y emisiones de CO<sub>2</sub>).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son útiles para la sociedad porque permite reducir el impacto ambiental asociado de las actividades llevadas a cabo en un matadero de aves, usando la tecnología de DA.

### 3.2. Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura (Spain)

#### [Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura \(Spain\) \(ANEXO II\)](#)

##### 3.2.1. Datos editoriales

<b>Título</b>	Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura (Spain).			
<b>Autores</b>	Consolación Sánchez-Sánchez*, Almudena González-González, Francisco Cuadros-Salcedo, Francisco Cuadros-Blázquez			
<b>Revista</b>	Journal of Cleaner Production	<b>Año</b>	2018	
<b>Volumen</b>	198	<b>Página</b>	1165-1172	<b>Editorial</b> Elsevier
<b>DOI</b>	10.1016/j.jclepro.2018.07.079		<b>ISSN</b>	1879-1786

##### 3.2.2. Indicios de calidad

<b>Fuente de impacto</b>	WOS (JCR)	<b>Índice de impacto</b>	6,395
<b>Categoría</b>	Green & sustainable science & technology	<b>Cuartil</b>	Q1
<b>Posición de la revista en la categoría</b>	6	<b>Número de revistas en la categoría</b>	35
<b>Citas en Web of Science</b>	6	<b>Citas en Scopus</b>	5
<b>Citas en Scholar</b>	9	<b>Citas en Researchgate</b>	7

### **3.2.3. Resumen**

Esta investigación presenta el efecto de cuatro materiales porosos en la producción de biogás a partir de la codigestión anaeróbica de una mezcla de estiércol de oveja (20 % en peso) y suero de queso (80 % en peso).

Los materiales porosos se fabrican a medida a partir del reciclaje de desechos agrícolas y forestales: cáscaras de almendras, cáscaras de nueces, fibras de kenaf y carbón vegetal; por tanto, el coste de fabricación es bajo.

Para su utilización en la biometanización, los materiales porosos se someten a un proceso de trituración y tamización y luego se introducen en el biorreactor en forma de lecho fijo con el fin de disponer de una mayor superficie para la adhesión bacteriana y así aumentar la población microbiana en el medio de reacción. El objetivo final es maximizar el rendimiento energético del proceso.

Los resultados muestran que la mayor producción de biogás a largo plazo (para tiempos de reacción superiores a 168 días) se obtiene cuando se utiliza el carbón vegetal como material poroso. El aumento en la producción de metano fue de 27,82 % en comparación con la biometanización de la mezcla sin ningún material poroso (experimento de control) y se produjo una reducción del 50 % en la demanda química de oxígeno (DQO).

También se realizó un estudio de viabilidad económica de la aplicación de carbón vegetal como material de adhesión bacteriana para la posible construcción de una planta industrial real situada en Extremadura para generar energía térmica y se obtuvieron parámetros económicos muy favorables. En particular, con el uso de carbón vegetal se logra un PRI de 8 años y una TIR del 10 %.

### **3.2.4. Resultados**

Se definieron cuatro tipos de materiales porosos con características favorables para introducirlos en la biometanización de suero lácteo y estiércol de oveja.

Se analizaron y prepararon los cuatro materiales porosos y se determinó la cantidad de material a utilizar en la biometanización, siguiendo el objetivo de maximizar la producción de energía minimizando el coste del tratamiento (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Preparación de los materiales porosos antes de la biometanización

<b>Condiciones experimentales de los materiales porosos</b>	
Pretratamiento mecánico de trituración y cribado	850 $\mu\text{m}$
Cantidad de material poroso ( $\text{kg/m}^3$ sustrato)	1
Tiempo medio de permanencia del material poroso en el interior del digestor (meses)	6

Para conocer la composición de sustrato a tratar, se realizó un primer ensayo en el que se fijó la composición del mismo con un 80 % de suero lácteo y un 20 % de estiércol de oveja, con un TRH de 14 días y una temperatura de 38 °C.

Durante todo el tiempo de experimentación se realizó un seguimiento de las características físico-químicas del sustrato. Los valores medios de los parámetros analizados se muestran en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Caracterización fisicoquímica del sustrato 80 % suero de queso/20 % estiércol de oveja

<b>Suero de queso (80 %) / Estiércol de oveja (20 %)</b>	
pH	6,83 $\pm$ 0,50
AGV (g $\text{CH}_3\text{COOH/L}$ )	0,82 $\pm$ 0,14
Alcalinidad (g $\text{CaCO}_3\text{/L}$ )	3,47 $\pm$ 2,37
STS (g/L)	54,91 $\pm$ 23,70
STD (g/L)	47,53 $\pm$ 24,17
DQO (g/L)	108,87 $\pm$ 27,74
$\text{N}_k$ (g/L)	2,52 $\pm$ 0,29
COT (g/L)	29,69 $\pm$ 0,88
C/N	11,78
Sulfatos (g/L)	15,515 $\pm$ 0,58

*Siendo: SST, sólidos totales en suspensión; SDT, sólidos totales disueltos;  $\text{N}_k$ , nitrógeno Kjeldahl; COT, carbono orgánico total; C/N, relación carbono-nitrógeno; otras abreviaturas están definidas en el texto*

A continuación, se realizaron en paralelo cinco experiencias de biometanización en el laboratorio durante más de 168 días: un experimento de control, en el que no se utilizó ningún material poroso, y otros cuatro más, cada uno con un material poroso diferente utilizado para aumentar la superficie de fijación bacteriana.

Durante los primeros 4 TRH, 3 de las 5 experiencias presentaron signos de inhibición, estas fueron: el experimento control, el experimento con cáscara de almendras y el de cáscara de nuez. Sin embargo, los ensayos de biometanización que contenían fibras de kenaf y carbón vegetal resultaron estables y con una producción de biogás muy similar. Por tanto, para seleccionar cual es el material poroso óptimo en la biometanización con suero lácteo y estiércol de oveja, se volvieron a realizar en paralelo 3 experiencias: la experiencia control, la experiencia con fibras de kenaf y con carbón vegetal.

Al final de la experimentación, el ensayo que contenía fibras de kenaf presentó signos de inhibición, por tanto, el único ensayo que no presentó signos de inhibición y que produjo un aumento en la producción de metano fue el carbón vegetal. Además, en estas condiciones de tratamiento, el carbón vegetal hace posible incrementar la producción de metano en un 27,8 % (Tabla 3.5), así como la estabilidad de la biometanización, ya que no ha sufrido inhibiciones.

**Tabla 3.5.** Parámetros característicos de los dos experimentos de DA prolongados (12 TRH)

Experimentos	m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> / m <sup>3</sup> sustrato (medidas a 25 °C y presión atmosférica)	% CH <sub>4</sub>	pH	DQO (g O <sub>2</sub> /L)	Reducción de DQO	Aumento de producción CH <sub>4</sub> con respecto al ensayo control
Control	20,12	64 %	7,67	62,12	52 %	-
Fibras Kenaf	13,04	60 %	7,21	65,38	47 %	-35,19 %
Carbón vegetal	25,53	72 %	7,68	61,76	50 %	27,82 %

Otro de los resultados que se obtuvo fue que, aproximadamente a los 6 meses tras la puesta en marcha del ensayo con carbón vegetal, fue necesario reemplazar el material, ya que se observó un descenso significativo en la producción de biogás. Tras cambiar el carbón vegetal se recuperó la producción de biogás y su contenido en metano, lo que permite concluir que es necesario renovar el material de fijación al menos cada 6 meses si se quiere mantener su eficacia (Tabla 3.3).

Finalmente, dado que uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral es maximizar la producción de biogás para hacer atractivas las plantas de DA desde el punto de vista económico, se realizó un estudio de viabilidad económica, teniendo en cuenta el coste que supone adicionar carbón vegetal a una planta de biogás y se obtuvo que el uso del carbón vegetal como material poroso para aumentar el rendimiento energético es viable económicamente (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6.** Viabilidad económica de la planta de DA

<b>Viabilidad económica de la planta preindustrial de DA</b>		
<b>Datos de partida</b>	Energía térmica generada (MWh/año)	1678
	Calefacción necesaria en el digestor (MWh/año)	521
	Energía térmica útil (MWh/año)	1157
	Potencia térmica de la caldera (MW)	0,210
<b>Coste de instalación (€)</b>		350 000
<b>Gasto anual</b>	Mantenimiento de la planta (€)	9800
	Electricidad (€)	8075
	Préstamo bancario (€)	35 627
	Transporte (€)	279
	Costes totales (€)	54 480
<b>Beneficio anual</b>	Ahorro de energía térmica (€)	94 974
	Ingresos totales (€)	94 974
<b>Beneficio anual (€)</b>		40 494
<b>Van total a los 15 años (3%)</b>		253 625
<b>TIR</b>		10%
<b>Periodo de retorno de la inversión (PRI) (años)</b>		8

Por tanto, se puede afirmar que la incorporación de carbón vegetal de encina, como material de adhesión bacteriana en los digestores anaerobios que traten suero lácteo y estiércol de oveja, es viable económicamente.

### **3.3. Charcoal as a bacteriological adherent for biomethanation of organic wastes**

[Charcoal as a bacteriological adherent for biomethanation of organic wastes \(ANEXO III\)](#)

### 3.3.1. Datos editoriales

<b>Título</b>	Charcoal as a bacteriological adherent for biomethanation of organic wastes			
<b>Autores</b>	Consolación Sánchez-Sánchez*, Almudena González-González, Francisco Cuadros-Salcedo, Vicente Gómez-Serrano and Francisco Cuadros-Blázquez			
Revista	Energy	Año	2019	
<b>Volumen</b>	179	Página	336-342	Editorial
<b>DOI</b>	10.1016/j.energy.2019.04.192		ISSN	1873-6785
			Editorial	Elsevier

### 3.3.2. Indicis de calidad

<b>Fuente de impacto</b>	WOS (JCR)	<b>Índice de impacto</b>	6,082
<b>Categoría</b>	Thermodynamics	<b>Cuartil</b>	Q1
<b>Posición de la revista en la categoría</b>	3	<b>Número de revistas en la categoría</b>	61
<b>Citas en Web of Science</b>	2	<b>Citas en Scopus</b>	1
<b>Citas en Scholar</b>	2	<b>Citas en Researchgate</b>	2

### 3.3.3. Resumen

Una vez se ha determinado que el carbón vegetal de encina es el material poroso más adecuado para la adhesión de bacterias anaerobias asociadas al tratamiento de estiércol de oveja con suero lácteo, se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica sobre las características esenciales que debe contener el carbón vegetal para maximizar el rendimiento energético de la biometanización.

Por este motivo, en esta publicación, se caracterizan y analizan las propiedades del carbón vegetal que producen una mejora en el rendimiento de la reacción anaerobia. Además, se realizaron nuevamente dos ensayos de larga duración de DA en el laboratorio: un experimento de control, en el que no se utilizó ningún material poroso, y otro en el que se introdujo 1g de carbón vegetal/L de digestor.

Los resultados muestran un aumento de la producción de metano del 27,05 % y una reducción del contenido de H<sub>2</sub>S en el biogás del 34,7 %, sobre los obtenidos en el experimento de control.



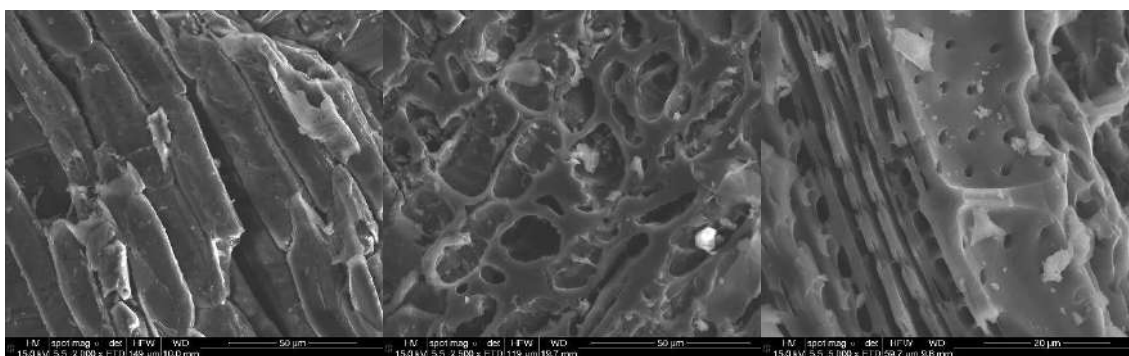
Estas marcadas mejoras del proceso de biometanización son atribuibles al contenido de metales altamente electropositivos como potasio y calcio en el carbón vegetal que, por reacciones químicas, pueden aumentar el pH del medio y así favorecer los procesos de metanogénesis y reducción de sulfatos.

El carbón vegetal actuaría como adherente bacteriológico promoviendo la biometanización de los materiales de desecho orgánicos utilizados en este trabajo.

### 3.3.4. Resultados

La mayoría de los resultados que se muestran en esta publicación son referentes a las características del carbón vegetal.

La microcopia electrónica de barrido mostró que, morfológicamente, las partículas de carbón vegetal se caracterizan por presentar superficies muy irregulares, con fisuras, grietas y surcos. Dado que el carbón vegetal se fabricó mediante el proceso termoquímico de pirólisis, es probable que estas características morfológicas se generaran por la liberación de gases y por el contacto de estos gases con el carbón. También se observaron partículas blancas policristalinas, prueba de la presencia de materia inorgánica en la superficie del carbón vegetal (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Caracterización morfológica del carbón vegetal. Imágenes tomadas en MEB

Un análisis espectroscópico de rayos X de dispersión de energía (EDX) arrojó los datos sobre el % en peso y % en átomos para los cuatro elementos químicos más abundantes (Figura 3.3).

Se observó que el contenido de oxígeno fue significativamente más alto por espectroscopia EDX (22,24 % en peso) que por análisis elemental (14,82 % en peso). Esto puede deberse a que el producto de la pirolisis aún caliente, haya entrado en contacto con el aire y haya dado lugar a un proceso de oxidación.

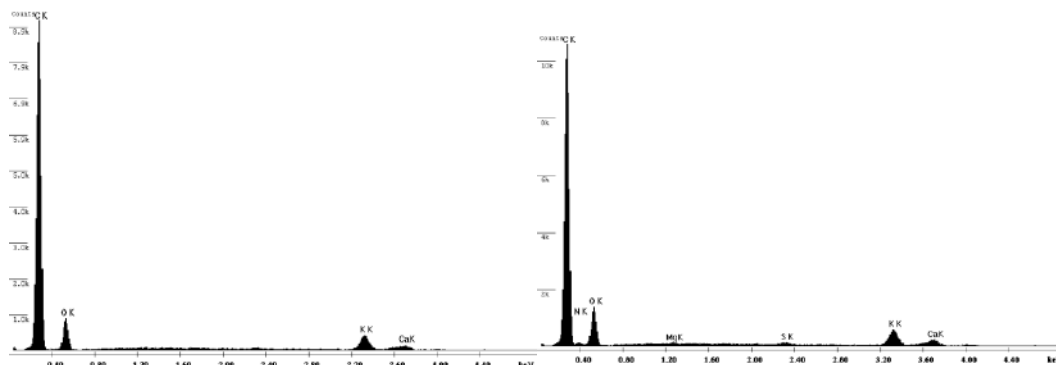


Figura 3.3. La espectroscopia de rayos X de dispersión de energía

En cuanto a las características texturales del carbón vegetal se obtuvo una isoterma de adsorción en la que se muestra pequeños valores de adsorción que aumentan constantemente desde el rango de presión relativa ( $p/p^0$ ) 0,0 hasta 1,0. Además no muestra el típico punto de inflexión (punto B) que indica la terminación de una monocapa en la adsorción de nitrógeno para sólidos no porosos. Por tanto, la adsorción de nitrógeno en las partículas de carbón vegetal no está controlada por el mecanismo de monocapa/multicapa, sino por la difusión del adsorbato a través de la restringida porosidad del adsorbente (Figura 3.4).

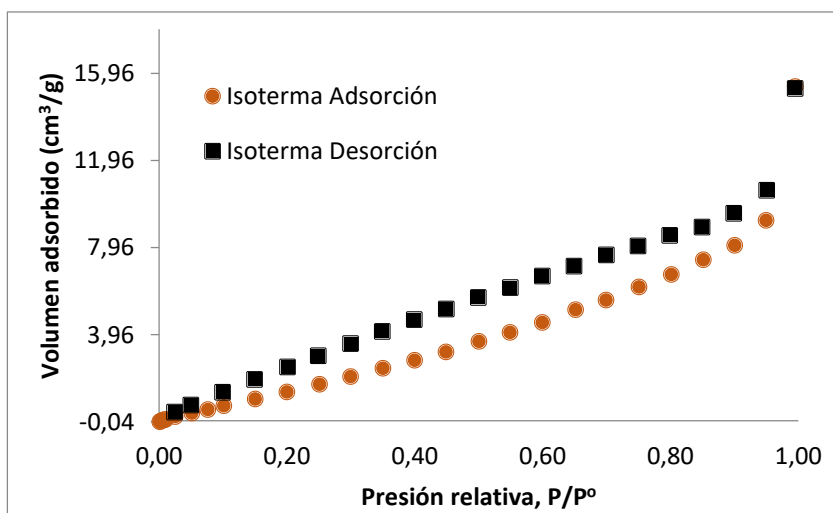


Figura 3.4. Isotherma de adsorción de nitrógeno del carbón vegetal de encina

Finalmente, la porosimetría de mercurio indicó que el carbón vegetal no contiene prácticamente microporos, ya que el volumen de macroporos (diámetros superiores a 50 nm) supone el 90 % del total de porosidad de la muestra (Tabla 3.7).

La distribución del tamaño de los macroporos es bastante homogénea, siendo el radio de la mayoría de los poros mayor a  $10^5 \text{ \AA}$

**Tabla 3.7.** Área superficial, volúmenes de poros y densidad del carbón vegetal de encina

Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Volumen microporos (cm <sup>3</sup> /g)	Volumen mesoporos (cm <sup>3</sup> /g)	Volumen macroporos (cm <sup>3</sup> /g)	Total poros (cm <sup>3</sup> /g)	Densidad helio (g/cm <sup>3</sup> )	Densidad mercurio (g/cm <sup>3</sup> )
11,8	0,001	0,009	0,074	0,084	1,44	1,55

Con respecto a los resultados obtenidos en la biometanización, se obtuvo una mayor producción de biogás cuando se adicionó carbón vegetal al digestor, con un aumento de un 13 % en la producción. Esto puede estar relacionado con el contenido de metales altamente electropositivos como potasio (K) y calcio (Ca) del carbón vegetal los cuales, por reacciones químicas, pueden aumentar el pH del medio y así favorecer los procesos de metanogénesis y reducción de sulfatos, actuando el carbón como un adherente bacteriológico en la digestión anaerobia.

Finalmente, la mejora en el rendimiento energético de la reacción puede ser un factor determinante a la hora de cualquier análisis de viabilidad económica, ya que puede significar que un proyecto de biometanización que, en principio, no es rentable económicamente, llegue a serlo si se añade una cierta cantidad de carbón al contenido del digestor.

### 3.4. Development of real-time polymerase chain reaction methods for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina* and *Methanobacterium* in anaerobic digestion.

#### [Development of real-time polymerase chain reaction methods for the quantification of \*Methanoculleus\*, \*Methanosarcina\* and \*Methanobacterium\* in anaerobic digestion \(ANEXO IV\)](#)

##### 3.4.1. Datos editoriales

<b>Título</b>	Development of real-time polymerase chain reaction methods for the quantification of <i>Methanoculleus</i> , <i>Methanosarcina</i> and <i>Methanobacterium</i> in anaerobic digestion				
<b>Autores</b>	Consolación Sánchez-Sánchez, Mercedes Aranda-Medina, Alicia Rodríguez*, Alejandro Hernández, María G. Córdoba, Francisco Cuadros-Blázquez, Santiago Ruiz-Moyano				
<b>Revista</b>	Journal of Microbiological Methods	<b>Año</b>	2022		
<b>Volumen</b>	199	<b>Página</b>	106529	<b>Editorial</b>	Elsevier
<b>DOI</b>	10.1016/j.mimet.2022.106529		<b>ISSN</b>	1872-8359	

##### 3.4.2. Indicis de calidad

<b>Fuente de impacto</b>	WOS (JCR)	<b>Índice de impacto</b>	2,622
<b>Categoría</b>	Biochemical research methods	<b>Cuartil</b>	Q3
<b>Posición de la revista en la categoría</b>	58	<b>Número de revistas en la categoría</b>	79
<b>Citas en Web of Science</b>	3	<b>Citas en Scopus</b>	3
<b>Citas en Scholar</b>	3	<b>Citas en Researchgate</b>	3

##### 3.4.3. Resumen

Otro de los tratamientos desarrollados para impulsar la tecnología de DA ha sido el conocimiento, a nivel molecular, de la dinámica de las comunidades microbianas, específicamente la comunidad metanogénica.

La detección y la cuantificación de la principal población microbiana que interviene en la última etapa del proceso de biometanización (metanogénesis) es uno de los grandes objetivos que se persiguen puesto que son las responsables de producir el metano.

Por ello, en el presente estudio, se seleccionaron tres de siete pares de cebadores que se diseñaron y se probaron con diferentes concentraciones y condiciones para detectar la especie *Methanosarcina*, *Methanoculleus* y *Methanobacterium* por PCR en tiempo real basado en el sistema de SYBR Green.

La funcionalidad de los métodos desarrollados quedó demostrada por la alta relación lineal de las curvas estándar, y la especificidad de cada cebador se verificó empíricamente analizando ADN aislado de cepas productoras y no productoras de metano. Estos ensayos también mostraron una buena repetibilidad y reproducibilidad, lo que indica la solidez de los métodos.

Los cebadores descritos se utilizaron con éxito para detectar y cuantificar las comunidades metanogénicas de 10 muestras de una codigestión anaeróbica. El género *Methanosarcina* fue el grupo metanogénico dominante.

#### **3.4.4. Resultados**

Se diseñaron siete parejas de primers utilizando el software Primer3Plus para detectar y cuantificar específicamente las bacterias *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina* de forma individual (Tabla 3.8). Para ello, se utilizaron secuencias parciales del 16S ARNr recuperados del Proyecto de la base de datos ribosómicos (RDP-II), los cuales, fueron editadas y alineadas por el recurso Clustal Omega del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL). Después, se realizó una validación “*in-silico*” para confirmar la especificidad de los primers alineando las secuencias de los primers con las secuencias publicadas de 16S ARNr de las cepas de referencia de los tres géneros objetivo.

**Tabla 3.8.** Secuencia de nucleótidos de los primers diseñados para los ensayos SYBR Green qPCR

Cepa	Nombre primer	Secuencia (5' - 3')	Posición	Tamaño Amplicón
<i>Methanoculleus bourgensis</i> DSMZ 8220	Mmic-F1	TCTGAGACACGAATCCAGGC	214 <sup>a</sup>	78
	Mmic-R1	GTTCCCTTATCACGGTTGCC	272 <sup>a</sup>	
	Mmic-F2	CTCTTGGGAAATCTGGCAGC	494 <sup>a</sup>	68
	Mmic-R2	TCTCCCGTTCTTAGATTGC	446 <sup>a</sup>	
	Mmic-F3	AGGCGTCTAAGAGATACTGGC	509 <sup>a</sup>	59
	Mmic-R3	GAAGTACCCCTCACCTCTCC	475 <sup>a</sup>	
	Mmic-F4	CGAAAACCTTTACAATGCGGGC	254 <sup>a</sup>	79
	Mmic-R4	GTTTTAGACACCCAGACAGCC	312 <sup>a</sup>	
<i>Methanobacterium formicum</i> DSMZ 1535	Mbact-F	GACCCACGCCCTTAGTTACC	874973 <sup>b</sup>	71
	Mbact-R	GTTTATCACTGGCGGTCCCC	875024 <sup>b</sup>	
<i>Methanosarcina barkeri</i> DSMZ 1538	Msar-F	GGCGCGAAAACCTTTACAATGC	39753 <sup>c</sup>	193
	Msar-R	AGACCAATAATCACGATCACC	39925 <sup>c</sup>	
	Msy-F	CCTGAATCGCTGAGAGGAGG	1351622 <sup>c</sup>	128
	Msy-R	CAGAGTACCCATCATCCCGG	1351730 <sup>c</sup>	

Primer Forward, directo (F); Primer reverse, inverso (R)

<sup>a</sup> Las posiciones concuerdan con la secuencia publicada *Methanoculleus bourgensis* MS2 (Acceso a GeneBank no. NR\_042786.1).

<sup>b</sup> Las posiciones concuerdan con la secuencia publicada *Methanobacterium paludis* cepa SWAN1 (Acceso a GeneBank no. CP002772).

<sup>c</sup> Las posiciones concuerdan con la secuencia publicada *Methanosarcina mazei* S-6 (Acceso a GeneBank no. CP009512.1).

A continuación, se seleccionaron las mejores parejas de primers para cada género productor de metano. Esta selección, se basó principalmente en el análisis de las curvas de fusión y en la ausencia de dímeros (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9.** Resultados de los diferentes ensayos de qPCR con los primers diseñados

Género	Pareja de primers <sup>a</sup>	Concentración del Primer (nM)	Dímeros del Primer	Número de amplicones	Tm ± DE (°C) <sup>a</sup>	Cq ± SD <sup>a</sup>
<i>Methanoculleus</i>	Mmic -F1/R1	300	Si	0	71,41± 1,27	> 40
	Mmic -F1/R1	150	Si	3	81,55± 0,01	> 40
	Mmic -F1/R1	75	Si	2	81,55± 0,00	> 40
	Mmic -F1/R1	150/75	Si	2	77,38± 7,38	> 40
	Mmic -F1/R1	75/150	Si	2	81,93± 0,11	> 40
	Mmic -F1/R1	50	Si	2	81,92± 0,11	> 40
	Mmic -F1/R1	75	Si	2	82,14± 0,00	> 40
	<b>Mmic -F2/R2</b>	<b>300</b>	<b>No</b>	<b>1</b>	<b>84,90± 0,18</b>	<b>15,42± 0,79</b>
	Mmic -F3/R3	300	No	1	78,25± 0,42	> 40
<i>Methanobacterium</i>	Mmic -F4/ R4	300	Si	2	90,19± 0,01	> 40
	<b>Mbac-F/R</b>	<b>300</b>	<b>No</b>	<b>1</b>	<b>83,80± 0,21</b>	<b>12,07± 0,07</b>
	Mbac-F/R	150	Si	3	83,27± 6,85	> 40
	Msar-F/R	300	Si	3	85,41± 0,39	> 40
	Msar-F/R	150	Si	3	85,86± 10,05	> 40
<i>Methanosarcina</i>	<b>Msy-F/R</b>	<b>300</b>	<b>No</b>	<b>1</b>	<b>84,48± 0,14</b>	<b>12,90± 0,40</b>
	Msy-F/R	150	Si	0	72,35± 6,63	>40

<sup>a</sup>El primer directo (F), el primer inverso (R), la temperatura de fusión (Tm) y el número de ciclo de umbral (Cq) se determinaron mediante ensayos de qPCR con el conjunto correspondiente por triplicado. Los valores calculados se expresaron como promedio ± desviación estándar (DE). El par de primers seleccionados y las concentraciones se destacan en negrita.

El análisis de las curvas de disociación mostró un solo amplicón y la ausencia de dímeros en el caso de los pares de primers de Mmic -F2/R2, Mmic -F3/R3, Mbac-F/R y Msy-F/R con una concentración de 300 nM cada uno.

Las condiciones óptimas de operación fueron determinadas para cada pareja de primers (1 ciclo a 95 °C por 10 min y 40 ciclos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min) y se obtuvieron tres productos de PCR con tamaños esperados de 123, 73 y 62 pares de base (pb) utilizando los protocolos específicos para detectar *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina*, respectivamente.

El éxito en el desarrollo de protocolos de qPCR depende de la idoneidad de los primers diseñados, por ello, la especificidad de los primers fue probada utilizando ADN de las cepas productoras de metano (*M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 y *M. barkeri* DSZM 1538) y ADN de doce cepas pertenecientes a especies que comúnmente se pueden encontrar en los lodos codigestados de tomate (Tabla 3.10).

Los resultados obtenidos mediante la utilización de la metodología SYBR Green en las cepas *M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 y *M. barkeri* DSZM 1538 fueron productos específicos con valores de Tm de  $84,90 \pm 0,11$  °C,  $83,80 \pm 0,35$  °C y  $84,50 \pm 0,01$  °C respectivamente (Tabla 3.10). El análisis del punto de fusión mostró que los valores de Tm de las cepas restantes diferían de los específicos. En cuanto a los valores de Cq obtenidos con los métodos qPCR desarrollados, *M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 y *M. barkeri* DSZM 1538 mostraron valores de Cq de  $12,05 \pm 0,44$ ,  $12,35 \pm 0,70$  y  $13,34 \pm 0,31$ , respectivamente (Tabla 3.10).



**Tabla 3.10.** Resultados obtenidos en el ensayo para determinar la especificidad de los protocolos de PCR en tiempo real optimizados para cuantificar específicamente *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina*

Cepas	Método para la detección de <i>Methanoculleus</i>		Método para la detección de <i>Methanobacterium</i>		Método para la detección de <i>Methanosarcina</i>	
	Cq ± DE	Tm ± DE (°C)	Cq ± DE	Tm ± DE (°C)	Cq ± DE <sup>e</sup>	Tm ± DE (°C)
<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220 <sup>a</sup>	<b>12,05 ± 0,44<sup>e*</sup></b>	<b>84,90 ± 0,11</b>	23,77 ± 3,35	90,20 ± 0,21	17,12 ± 0,98	81,19 ± 0,58
<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535 <sup>a</sup>	> valor de Cq NTC	76,72 ± 0,11	<b>12,35 ± 0,70*</b>	<b>83,80 ± 0,35</b>	11,38 ± 2,99	85,96 ± 0,53
<i>M. barkeri</i> DSZM 1538 <sup>a</sup>	> valor de Cq NTC	85,96 ± 0,11	> valor de Cq NTC	82,83 ± 0,11	<b>13,34 ± 0,31*</b>	<b>84,50 ± 0,01</b>
<i>Escherichia coli</i> CECT 4267 <sup>b</sup>	25,00 ± 0,06	82,50 ± 0,12	27,16 ± 0,06	82,91 ± 4,21	> valor de Cq NTC	83,95 ± 1,47
<i>Enterobacter cloacae</i> S46 <sup>c</sup>	> valor de Cq NTC	90,05 ± 0,02	22,66 ± 0,77	87,07 ± 0,00	> valor de Cq NTC	90,13 ± 0,10
<i>Citrobacter freundii</i> <sup>a</sup>	24,81 ± 0,30	87,46 ± 0,32	27,41 ± 0,23	88,05 ± 0,11	23,53 ± 0,10	88,49 ± 0,53
<i>Advenella</i> <sup>d</sup>	> valor de Cq NTC	76,72 ± 0,11	> valor de Cq NTC	77,84 ± 1,69	> valor de Cq NTC	84,77 ± 0,10
<i>Alkaliphilu hydrothermalis</i> <sup>d</sup>	> valor de Cq NTC	85,59 ± 0,00	> valor de Cq NTC	86,78 ± 0,11	> valor de Cq NTC	79,70 ± 0,11
<i>Alkaliphilus sp.</i> <sup>d</sup>	> valor de Cq NTC	79,26 ± 0,11	> valor de Cq NTC	89,83 ± 0,10	> valor de Cq NTC	82,46 ± 3,16
<i>Clostridium disporicum</i> <sup>d</sup>	> valor de Cq NTC	90,06 ± 0,21	> valor de Cq NTC	74,49 ± 7,70	> valor de Cq NTC	80,45 ± 5,37
<i>Alkaliphilus sp.</i> <sup>d</sup>	> valor de Cq NTC	75,98 ± 0,32	> valor de Cq NTC	81,49 ± 0,32	> valor de Cq NTC	79,40 ± 0,10
<i>Alkaliphilus sp.</i> <sup>d</sup>	> valor de Cq NTC	79,48 ± 0,00	27,02 ± 0,17	81,04 ± 0,10	17,63 ± 1,74	82,38 ± 3,47
<i>Acinetobacter sp.</i> <sup>d</sup>	> valor de Cq NTC	78,44 ± 2,11	25,37 ± 0,12	81,12 ± 0,11	17,52 ± 0,30	86,48 ± 2,11
<i>Lactobacillus paracasei</i> <sup>d</sup>	> valor de Cq NTC	81,94 ± 0,32	> valor de Cq NTC	80,45 ± 1,80	26,33 ± 0,29	85,84 ± 0,20
<i>Latilactobacillus sp.</i> <sup>d</sup>	> valor de Cq NTC	79,93 ± 0,63	> valor de Cq NTC	79,63 ± 0,04	27,73 ± 1,23	85,07 ± 0,74

El valor Cq del control sin placa (NTC) se estableció en 31-32 ciclos.

\*Valor de Cq específico de la cepa con cada método de detección diseñado.

<sup>a</sup>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Wolfenbüttel, Germany).

<sup>b</sup>Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Valencia, España).

<sup>c</sup> Colección del grupo de Investigación en Microbiología y Calidad Alimentaria (CAMIALI; Badajoz, España).

<sup>d</sup> Cepas aisladas de residuos orgánicos de la industria del tomate.

<sup>e</sup> Los datos representan la media del ciclo de cuantificación (Cq) ± desviación estándar (DE) de los 3 experimentos independientes, cada uno de ellos compuesto por muestras triplicadas. Los valores de Cq y Tm en negrita significan que el producto de PCR amplificado era específico.

Además, también se evaluó la eficiencia de amplificación siendo del 81, 96 y 106 %, para la especie *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina*, respectivamente. Y los valores de R<sup>2</sup> de todas las curvas estándar fueron superiores a 0,99 (Tabla 3.11), lo que indica una buena optimización de las reacciones de qPCR.

**Tabla 3.11.** Eficiencia de amplificación y R<sup>2</sup> obtenida a partir de curvas estándar de arqueas productoras de metano por PCR en tiempo real

Designación de género	Cepa de referencia	Eficiencia (%)	R <sup>2</sup>	Pendiente
<i>Methanoculleus</i>	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220	81 %	0.9921	-3.88
<i>Methanobacterium</i>	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535	96 %	0.9985	-3.43
<i>Methanosarcina</i>	<i>M. barkeri</i> DSMZ 1538	106 %	0.9907	-3.19

Otro de los análisis para realizar la validación completa de los protocolos de qPCR fue realizar pruebas de repetibilidad y reproducibilidad. En ambos casos, se obtuvieron valores de Cq similares (p < 0,05) lo que indica una alta repetibilidad y reproducibilidad de los métodos optimizados (Tabla 3.12).

**Tabla 3.12.** Prueba de repetibilidad realizada por el mismo operario en el mismo equipo

Repetición	Cepa de Referencia		
	<i>M. barkeri</i> DSMZ 1538	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535
1	20,48± 0,07	12,65± 0,10	13,02± 0,16
2	20,43± 0,08	12,73± 0,07	13,01± 0,08
3	20,45± 0,07	12,62± 0,09	13,07± 0,11

Los datos representan el número de ciclo de cuantificación promedio (Cq) ± desviación estándar (DE) que se determinó mediante los ensayos de qPCR específicos con el conjunto correspondiente por triplicado.

Finalmente, se realizó un ensayo de inhibición para asegurar la veracidad de los resultados y demostrar la aplicabilidad de los métodos de qPCR. En la Tabla 3.13, se puede observar como cada una de las cepas de referencia amplificó de forma específica con cada pareja de primers, a pesar de la presencia de ADN no diana (residuo orgánico) en las diferentes proporciones probadas de ADN diana/ADN no diana.

Además, independientemente de la presencia o ausencia de ADN no diana, no hubo diferencias significativas entre los valores de Cq.

**Tabla 3.13.** Resultados obtenidos en los ensayos de inhibición para probar el efecto del sustrato en la cuantificación mediante los ensayos de qPCR desarrollados en este estudio

Pareja de primers	Relación cepa objetivo/ Sustrato (residuos orgánicos de la industria del tomate)	Valores medios de la reacción SYBR Green (Cq ± DE)	Tm ± DE (°C)
Msy-F/R	<i>M. barkeri</i> DSZM 1538 (100:0)	17,00 ± 0,12	84,99 ± 0,18
	<i>M. barkeri</i> DSZM1538: Residuo orgánico (75:25)	17,69 ± 0,09	84,99 ± 0,01
	<i>M. barkeri</i> DSZM1538: Residuo orgánico (50:50)	18,49 ± 0,12	84,69 ± 0,32
	<i>M. barkeri</i> DSZM1538: Residuo orgánico (25:75)	19,63 ± 0,08	84,69 ± 0,01
	Residuo orgánico de la industria del tomate(0:100)	23,78 ± 0,13	89,61 ± 0,01
Mbac-F/R	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535 (100:0)	16,37 ± 0,13	83,65 ± 0,01
	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535: Residuo orgánico (75:25)	16,96 ± 0,13	83,50 ± 0,01
	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535: Residuo orgánico (50:50)	17,42 ± 0,24	83,50 ± 0,01
	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535: Residuo orgánico (25:75)	18,51 ± 0,21	83,50 ± 0,01
	Residuo orgánico de la industria del tomate(0:100)	20,90 ± 0,10	79,18 ± 0,11
Mmic-F2/R2	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220 (100:0)	17,70 ± 0,28	80,07 ± 0,01
	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220: Residuo orgánico (75:25)	18,02 ± 0,09	80,07 ± 0,11
	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220: Residuo orgánico (50:50)	18,85 ± 0,09	79,92 ± 0,01
	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220: Residuo orgánico (25:75)	20,04 ± 0,02	79,92 ± 0,01
	Residuo orgánico de la industria del tomate(0:100)	27,32 ± 0,15	88,71 ± 0,01

La aplicabilidad se realizó con lodos de laboratorio mesófilos y se obtuvo que la representación de la especie *Methanosarcia* fue un 99 % superior frente a la *Methanobacterium* y *Methanoculleus*, que presentaron una población relativa del 0,3 y 0,4 %, respectivamente (Tabla 3.14).

**Tabla 3.14.** Resultados de la aplicabilidad de los métodos de PCR en tiempo real (qPCR) desarrollados para la cuantificación del género productor de metano en un lodo digerido procedente de la biometanización de residuos orgánicos de la industria del tomate

Género	Pareja de primers	Valores medios de la reacción		Copias	
		SYBR Green Cq±SD <sup>a</sup>	T <sub>m</sub> (°C)	Porcentaje de la población (%)	gen/mL del efluente del reactor
<i>Methanoculleus</i>	Mmic-F2/R2	21,37 ± 1,05	84,89 ± 0,29	0,20	2.2 x 10 <sup>5</sup>
<i>Methanobacterium</i>	Mbact-F/R	18,42 ± 2,04	83,43 ± 0,32	0,30	3.2 x 10 <sup>5</sup>
<i>Methanosarcina</i>	Msy-F/R	11,96 ± 0,40	85,31 ± 0,11	99,5	2.1 x 10 <sup>9</sup>

<sup>a</sup>Los datos representan el número de ciclos de umbral promedio (Cq) ± desviación estándar (DE) y la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) ± DE que se determinó mediante los ensayos específicos de qPCR con el conjunto correspondiente por triplicado.

El desarrollo de estos métodos representa un avance importante para el seguimiento del proceso de DA, ya que proporciona una visión rápida y sensible de las principales comunidades microbianas involucradas en los reactores anaeróbicos mesófilos.

## **Capítulo 4. DISCUSIÓN**



Las industrias agroalimentarias son uno de los sectores principales de las industrias manufactureras del mundo. La industria agroalimentaria consume alrededor del 30 % de la demanda mundial de energía y es una de las grandes responsables de las fuentes de emisión de los gases de efecto invernadero liberados al medio ambiente [121]. En este contexto, se hace necesario implementar tecnologías como la DA capaces de reducir las emisiones de GEI y generar una nueva fuente de energía limpia y de residuo cero [122].

La necesidad se ha incrementado en los últimos años en el sector agroalimentario y en la economía mundial, debido al aumento de los subproductos orgánicos generados y la subida del precio de la energía provocada por la guerra de Rusia contra Ucrania, factores que ponen en riesgo la competitividad del sector [123]. De esta forma, desarrollar tratamientos que permitan mejorar los rendimientos de la tecnología de DA es muy valioso porque va a hacer más atractiva dicha tecnología desde el punto de vista económico promocionando así su implantación [124].

Las estrategias más comunes que se suelen seguir para mejorar el rendimiento de la digestión anaerobia, lograr una mayor producción de energía y mantener la estabilidad del proceso, han sido, hasta ahora, la optimización de los parámetros de funcionamiento, el pretratamiento de la materia prima, la codigestión anaerobia y la suplementación [125]. Sin embargo, esta Tesis Doctoral pretende ir más allá y fomentar, además, el empleo de otros tratamientos físico-químico-biológicos para maximizar el rendimiento energético y asegurar la estabilidad del proceso de biometanización a largo plazo.

La disponibilidad presupuestaria no es ilimitada, así pues, deben priorizarse aquellas acciones que garanticen en primer lugar la estabilidad del proceso [126]. La monitorización mediante la caracterización físico-química de los digestatos genera información muy útil sobre el estado actual del proceso, pero la dinámica exacta, la composición, el metabolismo o la actividad del sistema anaeróbico es aún un misterio por revelar [127,128].

Por ello, el conocimiento de la composición de la biocenosis metanogénica a nivel microbiológico suele considerarse esencial [129].

La metodología molecular más desarrollada en el mercado y por tanto más económica es la PCR cuantitativa (qPCR) SYBR Green y permite la detección y cuantificación rápida, reproducible y sensible de poblaciones microbianas específicas de una muestra ambiental [130-132].

Desarrollar protocolos capaces de cuantificar e identificar las especies más predominantes que intervienen en el proceso de biometanización mediante qPCR puede suponer una ventaja económica al intervenir, de forma inmediata, cuando se observe que el proceso está sufriendo una inhibición y evitar que se tenga que vaciar una planta de biometanización industrial o realizar diluciones [133].

Por otro lado, uno de los grandes desarrollos investigados para hacer más atractiva la tecnología en el sector agroindustrial es la adicción de materiales porosos para inmovilizar a las bacterias anaerobias en el interior del reactor y así mejorar el rendimiento de biogás; pero la mayor parte de ellos son productos caros y/o tienen otras aplicaciones en el mercado más rentables económicamente [134].

Lo ideal es utilizar y optimizar otros co-sustratos porosos que sean de bajo coste o provengan de residuos agrícolas, forestales, residuos de vertederos, de la construcción, residuos materiales poliméricos, etc., para maximizar el rendimiento energético *in situ* de la DA [135].

El carbón vegetal o biocarbón es un producto sólido que se obtienen en condiciones de falta o ausencia de oxígeno y que se aplica cada vez más en el proceso de DA debido a sus diversas propiedades [136,137]. Se caracteriza por ser rico en carbono, contener una estructura porosa, una alta área superficial, grupos funcionales y un carácter hidrofóbico [138-140]. La estabilidad de la DA suele deberse al alto contenido en metales alcalinos y alcalinotérreos que contiene el carbón vegetal, como el Ca y el K, que mejora la capacidad amortiguadora del proceso [141].

Los estudios sobre la coexistencia de la etapa metanogénica y la reducción de iones sulfato con sustratos orgánicos han demostrado que dichos iones estimulan la reducción de sulfato [142] porque las tasas de metanogénesis son dos órdenes de magnitud más bajas que las de la reducción de sulfato, lo que sugiere una mayor afinidad de las bacterias reductoras con los sustratos disponibles [143].



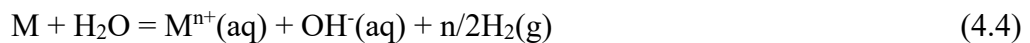
En el presente estudio, de los resultados descritos anteriormente se concluye que la biometanización de residuos orgánicos con carbón vegetal conduce a un pH más alto, un mayor rendimiento y, un aumento en el secuestro de H<sub>2</sub>S, lo que demuestra que el carbón vegetal actúa como un adherente bacteriológico en los procesos de metanogénesis.

El proceso de metanogénesis a menudo se describe simplemente como la conversión de materia orgánica en metano como producto final:



Por lo tanto, el aumento del pH es atribuible a la formación de iones carbonato. Esto implica que las reacciones (4.1) - (4.3) se desplazan hacia la derecha, siendo la reacción (4.1) la que tiende a aumentar el rendimiento. Aunque las bacterias pueden concentrarse en los grandes poros del carbón vegetal para favorecer así su acción biológica, el carbón vegetal usado en este trabajo es un sólido no poroso, ya que su volumen de macroporos (0,074 cm<sup>3</sup>/g) es bajo en comparación con otros adsorbentes de carbón (0,2-0,8 cm<sup>3</sup>/g) [144].

La acción adsorbente del carbón vegetal también puede estar relacionada con su composición química. Las cantidades de materia inorgánica presente en los materiales carbonosos pueden influir significativamente en sus características de adsorción y tener un fuerte efecto catalítico en los procesos de gasificación [145]. Los resultados de la EDX mostraron la presencia de dos elementos altamente electropositivos (K y Ca) en el carbón vegetal. Esto puede suponer un aumento del pH, e influir favorablemente en el proceso de biometanización de acuerdo con las reacciones:



y, por lo tanto



umentando la presencia de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> en el medio de reacción.

La reducción de sulfato puede ocurrir en ausencia de materia orgánica, según las reacciones:



y



La reacción (4.6) implica el consumo de una cantidad sustancial de iones hidrógeno, lo que también debería tender a aumentar el pH. Y la reacción (4.7) influiría en el pH debido a la generación de especies químicas como  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{HCO}_3^-$ , que son de carácter ácido o anfótero [146]. Los donantes de electrones necesarios para la reacción (4.6) pueden ser el K y el Ca presentes en el carbón. Por otro lado,  $\text{HS}^-$  y  $\text{H}_2\text{S}$  disueltos en agua deberían disociarse a  $\text{S}_2^{2-}$ . Con los iones  $\text{M}^{n+}$  antes mencionados, este ion forma sulfuros metálicos como  $\text{K}_2\text{S}$  y  $\text{CaS}$ . El primero es muy soluble en agua, mientras que el segundo sufre hidrólisis para transformarse en  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  [147]. Aunque el  $\text{H}_2\text{S}$  se forma de nuevo, el hecho de que en la mayor parte de la solución las interacciones electrostáticas entre los iones  $\text{S}^{2-}$  y  $\text{HS}^-$ - $\text{M}^{n+}$  sean más fuertes que las existentes entre las moléculas de  $\text{H}_2\text{S}$ - $\text{H}_2\text{O}$ , debería conducir a una mayor absorción de especies de azufre en la mayor parte del medio acuoso y, por tanto, a una menor liberación de  $\text{H}_2\text{S}$  del mismo. Desde el punto de vista termodinámico, esto iría acompañado de una liberación de calor.

Los resultados referidos al tratamiento biológico obtenidos en esta investigación pueden aplicarse a cualquier otra muestra de DA siempre que se siga de forma adecuada el protocolo desarrollado. La actuación del carbón vegetal como adherente bacteriológico en procesos de DA también puede implementarse a otras industrias con características similares, incrementando la utilidad del conocimiento generado.

## **Capítulo 5. CONCLUSIONES**



## 5.1. Conclusiones generales

La presente Tesis Doctoral se alinea con el objetivo principal de la industria agroalimentaria, ya que permite gestionar de manera adecuada para el medioambiente los subproductos orgánicos generados y mejorar el rendimiento económico aprovechando la bioenergía obtenida en sus propios procesos industriales. Concretamente, ha permitido generar un conocimiento importante e inexistente sobre tratamientos físico-químico-biológicos aplicables a la DA de estos subproductos, mejorando la estabilidad y el rendimiento energético del proceso durante períodos de tiempo más prolongados.

Los resultados de la investigación reflejan la necesidad de implantar tecnologías renovables y circulares capaces de gestionar los subproductos orgánicos y que generen valor añadido. Los resultados permiten rentabilizar la tecnología impulsando así su uso y aumentando la sostenibilidad medioambiental de la agroindustria.

Se ha comprobado que la información generada en la investigación no solo permite mejorar el rendimiento energético de la reacción, sino que puede ser un factor determinante a la hora de realizar el análisis de viabilidad económica. Además, el conocimiento y la cuantificación de las especies productoras de metano más predominantes que intervienen en el proceso de DA contribuirá a tener una visión más detallada sobre el estado de estabilidad en el que se encuentran, generando nuevo conocimiento que ayudará al establecimiento óptimo de las condiciones del proceso.

En definitiva, los resultados obtenidos cumplen con los objetivos impuestos inicialmente y se alinean con la línea de investigación de solucionar el problema de gestión de los subproductos de forma sostenible para el medioambiente y para la economía de la industria agroalimentaria extremeña. Además, la calidad de los resultados está avalado por las cuatro publicaciones científicas indexadas en Journal Citation Reports que componen la Tesis por compendio.

-----

This Doctoral Thesis is in line with the main objective of the agri-food industry, as it enables the environmentally appropriate management of the organic by-products generated and improves economic performance by taking advantage of the bioenergy obtained in its own industrial processes. Specifically, it has made it possible to generate important and non-existent knowledge on physico-chemical-biological treatments applicable to the AD of these by-products, improving the stability and energy yield of the process over longer periods of time.

The research results reflect the need to implement renewable and circular technologies capable of managing organic by-products and generating added value. The results allow the technology to be made profitable, thus boosting its use and increasing the environmental sustainability of the agro-industry.

It has been proven that the information generated in the research not only allows improving the energy efficiency of the reaction, but can also be a determining factor when carrying out the economic viability analysis. Furthermore, the knowledge and quantification of the most predominant methane-producing species involved in the AD process will contribute to having a more detailed vision of the state of stability which they are found, generating new knowledge that will help in the optimal establishment of the process conditions.

In conclusion, results meet the objectives initially set and they are aligned with the research of solving the by-product management problem in a sustainable way for the environment and for the economy of the agri-food industry in Extremadura. Furthermore, the quality of the results is endorsed by the four scientific publications indexed in Journal Citation Reports that conform the thesis by compendium.

## 5.2. Conclusiones específicas

En este apartado se presentan las conclusiones obtenidas en cada una de las publicaciones de investigación que componen esta tesis doctoral.

### **PRIMERA PUBLICACIÓN CIENTÍFICA: Waste valorization as an example of circular economy in Extremadura (Spain)**

1. Los mejores rendimientos de la codigestión anaerobia de los subproductos de matadero de aves de Veravic S.L. se obtienen con una carga orgánica de 1,68 kg DQO/m<sup>3</sup> reactor día lo que supone un TRH de 13 días. En estas condiciones es posible alcanzar producciones de biogás de 11,89 Nm<sup>3</sup> biogás/m<sup>3</sup> de sustrato, siendo la fracción de metano del 58,37 %.
2. Esta tasa de producción de metano da lugar a una producción anual de energía térmica que cubre las necesidades anuales de calefacción del matadero.
3. El análisis económico demostró que la construcción de la planta de DA sería económicamente rentable, ya que el PRI es a 7 años, el TIR 14 % y el VAN 2.894.685€.
4. El proyecto también es viable desde el punto de vista medioambiental. En efecto, la reducción de la DQO debida a la biodigestión de estos residuos es del (24,76 ± 21,01) %. La separación posterior de las fracciones líquida y sólida del digestato permite reducir sus respectivos valores de DQO hasta límites compatibles con la legislación medioambiental vigente. Además, los materiales de construcción utilizados en la planta son fácilmente reutilizables o reciclables, lo que demuestra que este caso práctico es un buen ejemplo de Economía Circular.
5. La utilización del biogás generado en la planta de DA proyectada como combustible de autoconsumo evitaría 7 veces las emisiones de CO<sub>2</sub> equivalentes que se producen al degradarse la materia orgánica de forma natural en el ambiente.

**SEGUNDA PUBLICACIÓN CIENTÍFICA: Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura (Spain)**

6. Todas las experiencias de biometanización con los materiales porosos utilizados se mantuvieron durante tiempos de reacción superiores a de 168 días, lo que permite obtener resultados fiables relativos a la biodegradabilidad y al potencial energético de los subproductos. Además de asegurar, con seguridad, que, si no se han producido inhibiciones durante el ensayo, no es probable que éstas se produzcan al operar a escala industrial.
7. El material poroso que mejores rendimientos energéticos demuestra en la DA es el carbón vegetal con un aumento del 27,82 % en la producción de metano en comparación con la experiencia de control.
8. La adición de carbón vegetal mejoró la estabilidad del proceso al aumentar la alcalinidad.
9. El tiempo medio de actividad adherente en el interior del biodigestor del carbón vegetal es de aproximadamente 6 meses, ya que a partir de ese tiempo se observa una disminución en el rendimiento energético (producción de metano) de la reacción.
10. La producción de metano ( $13,04 \text{ m}^3 \text{ NCH}_4/\text{m}^3$  sustrato) da lugar a una producción anual de energía térmica que cubre las necesidades térmicas anuales de la quesería estudiada.
11. El análisis económico demostró que la construcción de la planta de DA sería económicamente rentable, ya que alcanzaría un PRI de 8 años y una TIR del 10 %. Esta buena rentabilidad económica se debe al aumento de la eficiencia energética que proporciona la inmovilización bacteriana asociada al carbón vegetal.
12. Los resultados que aquí se han presentado son muy consistentes ya que se han obtenido a partir de una simulación experimental larga (12 TRH), asegurando que la planta industrial proyectada permanecería en funcionamiento a lo largo del tiempo sin ningún signo de inhibición.



**TERCERA PUBLICACIÓN CIENTÍFICA: Charcoal as a bacteriological adherent for biomethanation of organic wastes**

13. Se produjo un aumento del 13 % en la producción de biogás en comparación con el experimento de control (sin material poroso).
14. El aumento del pH es atribuible a la formación de iones carbonato debido a que el material de carbón vegetal estudiado es un sólido no poroso.
15. La reducción de H<sub>2</sub>S puede deberse a interacciones electrostáticas entre los iones S<sub>2</sub> y HS<sup>-</sup>-Mn<sup>+</sup> y las moléculas de H<sub>2</sub>S-H<sub>2</sub>O cuya polaridad conduce a una mayor absorción de las especies de azufre.
16. El carbón vegetal añadido a la mezcla de biometanización estudiada actúa como adsorbente en los procesos de metanogénesis y reducción de sulfatos.

**CUARTA PUBLICACIÓN CIENTÍFICA: Development of real-time PCR methods for the quantification of Methanoculleus, Methanosarcina and Methanobacterium in anaerobic digestion**

17. Esta investigación desarrolló con éxito tres métodos que permiten la cuantificación rápida y confiable de las arqueas *Methanosarcinas*, *Methanoculleus* y *Methanobacterium* en la evaluación de la calidad del lodo y monitorización de los digestores anaeróbicos.
18. Entre las siete parejas de primers diseñados, se seleccionaron tres parejas (uno para cada género en estudio) para optimizar tres protocolos específicos de qPCR y detectar y cuantificar estos tres géneros productores de metano en digestores anaerobios.
19. Los tres métodos optimizados de qPCR mostraron una alta eficiencia y correlación lineal. Además, los métodos de qPCR fueron específicos, sensibles, repetitivos y reproducibles.
20. El ensayo de inhibición determinó que la cuantificación de las tres cepas productoras de metano no se ve inhibida por la presencia de ADN no diana.
21. *Methanosarcina* fue la *Archaea* metanogénica dominante en el digestato compuesto por los residuos de la industria del tomate.

-----

This section presents the conclusions obtained in each of the research publications that make up this doctoral thesis.

**FIRST SCIENTIFIC PUBLICATION: Waste valorization as an example of circular economy in Extremadura**

1. The best performance of the anaerobic co-digestion of Veravic S.L. poultry slaughterhouse by-products are obtained with an organic load of 1.68 kg COD/m<sup>3</sup> reactor day, which means an HRT of 13 days. Under these conditions it is possible to achieve biogas productions of 11.89 m<sup>3</sup> Nbiogas/m<sup>3</sup> substrate with a methane fraction of 58.37 %.
2. This methane production rate results in an annual production of thermal energy that covers the annual heating needs of the slaughterhouse.
3. The economic analysis showed that the construction of the AD plant would be economically profitable, as the ERP is 7 years, the IRR 14% and the Van 2,894,685 €.
4. The project is also environmentally viable. Indeed, the COD reduction due to the biodigestion of this waste is (24,76 ± 21,01) %. Subsequent separation of the liquid and solid fractions of the digestate allows their respective COD values to be reduced to limits compatible with current environmental legislation. Furthermore, the construction materials used in the plant are easily reusable or recyclable, which shows that this case study is a good example of Circular Economy.
5. The use of the biogas generated in the planned AD plant as a self-consumption fuel would avoid 7 times the equivalent CO<sub>2</sub> emissions produced when organic matter degrades naturally in the environment.

**SECOND SCIENTIFIC PUBLICATION: Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura (Spain)**

6. All biometanation experiments with the porous materials used were maintained for reaction times of more than 168 days, which allows reliable results to be obtained regarding the biodegradability and energy potential of the by-products.

It also ensures that if inhibitions have not occurred during the test, they are not likely to occur when operating on an industrial scale.

7. The porous material showing the best energy yields in the AD is charcoal with a 27.82 % increase in methane production compared to the control experience.
8. The addition of charcoal improved the stability of the process by increasing the alkalinity.
9. The average time of adherent activity inside the charcoal biodigester is approximately 6 months, since thereafter a decrease in the energy performance (methane production) of the reaction is observed.
10. The methane production ( $13.04 \text{ m}^3\text{CH}_4/\text{m}^3\text{substrate}$ ) results in an annual production of thermal energy that covers the annual thermal needs of the cheese factory studied.
11. The economic analysis showed that the construction of the AD plant would be economically feasible, reaching a PRI of 8 years and an IRR of 10 %. This good economic feasibility is due to the increase in energy efficiency provided by the bacterial adhesion associated with the charcoal.
12. The results presented here are very consistent as they have been obtained from a long experimental simulation (12 HRT), ensuring that the projected industrial plant would remain in operation over time without any sign of inhibition.

**THIRD SCIENTIFIC PUBLICATION: Charcoal as a bacteriological adherent for biomethanation of organic wastes**

13. There was a 13 % increase in biogas production compared to the control experiment (no porous material).
14. The increase in pH is attributable to the formation of carbonate ions due to the fact that the charcoal material studied is a non-porous solid.
15. The reduction of  $\text{H}_2\text{S}$  may be due to electrostatic interactions between  $\text{S}_2$  and  $\text{HS}^-$ - $\text{Mn}^+$  ions and  $\text{H}_2\text{S}$ - $\text{H}_2\text{O}$  molecules whose polarity leads to an increased adsorption of sulphur species.
16. The charcoal added to the biomethanation mixture studied acts as an adsorbent in the methanogenesis and sulphate reduction processes.

**FOURTH SCIENTIFIC PUBLICATION: Development of real-time PCR methods for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina* and *Methanobacterium* in anaerobic digestion**

17. This research successfully developed three methods that allow rapid and reliable quantification of the archaea *Methanosarcinas*, *Methanoculleus* and *Methanobacterium* in sludge quality assessment and monitoring of anaerobic digesters.
18. Among the seven sets of primers designed, three pairs (one for each genus under study) were selected to optimise three specific qPCR protocols to detect and quantify these three methane-producing genera in anaerobic digesters.
19. The three optimised qPCR methods showed high efficiency and linear correlation. In addition, the qPCR methods were specific, sensitive, repeatable and reproducible.
20. The inhibition assay determined that quantification of the three methane-producing strains is not inhibited by the presence of non-target DNA.
21. *Methanosarcina* was the dominant methanogenic *Archaea* in the digestate composed of tomato industry waste.

### **5.3. Líneas futuras de trabajo**

Tras el desarrollo de esta Tesis Doctoral, surgen múltiples líneas futuras de investigación con un gran potencial de generar conocimiento innovador y de gran utilidad para seguir optimizando el aprovechamiento de los subproductos orgánicos agroindustriales mediante el proceso de biometanización.

En base a la línea de investigación actual, la bibliografía existente y los resultados obtenidos, se plantean las siguientes líneas futuras de investigación:

- Determinar la cantidad óptima de carbón vegetal (charcoal) que hay que incorporar para obtener el máximo incremento en la producción de biogás, y analizar la viabilidad económica de la aplicación de carbón vegetal como material de fijación bacteriana en reactores anaerobios.

- Activar el carbón vegetal para mejorar la macroporosidad del material por el método de activación física (en atmósfera de vapor de agua, aire u otros agentes activadores) o química (impregnación con ácido fosfórico, Cloruro de Cinc o hidróxido de potasio) y comprobar si ello permite mejorar el rendimiento energético en la DA.
- Fabricar en un horno cilíndrico horizontal (CARBOLITE) biocarbones para obtener biocarbones porosos, con un gran número de microporos y macroporos. Para ello, se pueden utilizar los residuos de madera de encina o del olivo, utilizando diferentes temperaturas y tiempos de permanencia en el interior del horno y comparar los rendimientos de fabricación de cada uno de ellos.
- Analizar y optimizar el volumen de micro y macroporos del biocarbón para introducirlos en los procesos de biometanización.
- Evaluar si el volumen de macroporosidad de los biocarbones está relacionado con la producción de biogás y el de microporosidad con la estabilidad del proceso.
- Monitorizar el comportamiento de las principales bacterias que se han estudiado cuando varían los parámetros físico-químicos del biodigestor (carga orgánica, pH, TRH, ácidos grasos volátiles...) para analizar las interrelaciones entre ellos.
- Desarrollar otro método de detección de poblaciones de microorganismos para el resto de fases del proceso de digestión anaerobio. Sobre todo, para la fase hidrolítica, ya que es otra de las mayores responsables de la velocidad del proceso de biometanización.



## **Capítulo 6. REFERENCIAS**





## 6.1. Referencias utilizadas en la Tesis Doctoral

- [1] Naciones Unidas. 2017. Cambios demográficos <https://www.un.org/es/un75/shifting-demographics> (último acceso 23.01.2023).
- [2] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2022. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. <https://www.fao.org/documents/card/es/c/cc0639es> (último acceso 23.01.2023).
- [3] Belaud, J.P., Prioux, N., Vialle, C., Sablayrolles, C. 2019. Big data for agri-food 4.0: Application to sustainability management for by-products supply chain. *Computers in Industry*. 111, 41–50.
- [4] United Nations. Transforming Our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development. 2015. Available online: [www.https://sustainabledevelopment.un.org](http://www.sustainabledevelopment.un.org) (último acceso 23.01.2023).
- [5] United Nations. The Paris Agreement. 2015. Available online: [https://unfccc.int/sites/default/files/english\\_paris\\_agreement.pdf](https://unfccc.int/sites/default/files/english_paris_agreement.pdf) (último acceso 23.01.2023).
- [6] United Nations. High-Level Dialogue on Energy 2021. Available online: [https://www.un.org/sites/un2.un.org/files/20-01529\\_att\\_concept\\_note\\_-\\_hl\\_dialogue\\_on\\_energy\\_2021.pdf](https://www.un.org/sites/un2.un.org/files/20-01529_att_concept_note_-_hl_dialogue_on_energy_2021.pdf) (último acceso 23.01.2023).
- [7] Ritchie, H., Roser, M., Mispy, J., Ortiz-Ospina, E. 2021. Measuring Progress Towards the Sustainable Development Goals. Available online: [SDG-Tracker.org](http://SDG-Tracker.org) (último acceso 23.01.2023).
- [8] Włodarczyk, B., Firoiu, D., Ionescu, G.H., Ghiocel, F., Szturo, M., Markowski, L. 2021. Assessing the Sustainable Development and Renewable Energy Sources Relationship in EU Countries. *Energies* 14(8), 2323. [doi.org/10.3390/en14082323](https://doi.org/10.3390/en14082323).
- [9] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2022. Informe anual de la industria alimentaria española periodo 2021–2022. [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/20220728informeanualindustria2021-20222t22ok\\_tcm30-87450.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/industria-agroalimentaria/20220728informeanualindustria2021-20222t22ok_tcm30-87450.pdf) (último acceso 23.01.2023).
- [10] Gracia, A; Albisu, L.M. Evolución de la industria agroalimentaria española en las dos últimas décadas. 2022. Unidad de economía Agraria. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) 197–210.

- [11] Cajamar, Caja Rural. 2019. Análisis sintético del sector agroalimentario de Extremadura. <https://www.publicacionescajamar.es/publicacionescajamar/public/pdf/series-tematicas/informes-coyuntura-coyuntura/extremadura-2019.pdf> (último acceso 23.01.2023).
- [12] Reckmann, K., Traulsen, I., Krieter, J. 2012. Environmental impact assessment – methodology with special emphasis on European pork production. *Journal of Environmental Management* 107, 102–109. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.04.015.
- [13] Aguirre-Villegas, H.A., Passos-Fonseca, T.H., Reinemann, D.J., Armentano, L.E., Wattiaux, M.A., Cabrera, V.E., Norman, J.M., Larson, R. 2015. Green cheese: Partial life cycle assessment of greenhouse gas emissions and energy intensity of integrated dairy production and bioenergy systems. *Journal of Dairy Science* 98(3) 1571–1592. doi:10.3168/jds.2014-8850.
- [14] González-García, S., Belo, S., Dias A.C., Várzea-Rodrigues, J., Roberto da Costa, R., Ferreira, A.; Pinto de Andrade, L., Arroja, L. 2015. Life cycle assessment of pigmeat production: Portuguese case study and proposal of improvement options. *Journal of Cleaner Production* 100 (1), 126–139.
- [15] Gerber, J., Hristov, A.N., Henderson, B., Makkar, H., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A.T., Yang, W.Z., Tricarico, J.M., Kebreab, E., Waghorn, G., Dijkstra, J., Oosting, S. 2013. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. *Animal* 7 (2), 220–234. doi: 10.1017/S1751731113000876.
- [16] Stępień, S., Czyżewski, B., Sapa, A., Borychowski, M., Poczta, W., Poczta-Wajda, A. 2021. Eco-efficiency of small-scale farming in Poland and its institutional drivers. *Journal of Cleaner Production* 279, 123721 doi: 10.1016/j.jclepro.2020.123721.
- [17] Üçtuğ, F.G. 2019. The Environmental Life Cycle Assessment of Dairy Products. *Food Engineering Reviews* volume 11, 104–121.
- [18] Organización Interprofesional Láctea (InLac). 2022. Publicación informe enero-abril 2022 <https://inlac.es/wp-content/uploads/2022/06/Informe-IFCN-mayo-2022.pdf> (último acceso 23.01.2023).
- [19] Organización Interprofesional Láctea (InLac). 2022. Publicación informe enero-octubre 2022. <https://inlac.es/wp-content/uploads/2022/12/Informe-IFCN-noviembre-2022.pdf> (último acceso 23.01.2023).
- [20] Prevención de la contaminación en la industria láctea. 2022. Centro de actividad regional para la producción limpia (CAR/PL). Plan de acción para el mediterráneo. [http://coli.usal.es/web/demo\\_appcc/demo\\_ejercicio/lac\\_es.pdf](http://coli.usal.es/web/demo_appcc/demo_ejercicio/lac_es.pdf) (último acceso 23.01.2023).
- [21] Elaboración torta del casar. 2022. Corazonex. <https://www.corazonex.es/elaboracion-torta-del-casar/> (último acceso 23.01.2023).

- [22] Miranda, R., Lascano, M., Caballero, A., Bosque, H. 2014. Influencia de la dosis de estiércol ovino y bioinsumo en la Mineralización del Nitrógeno. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales (RIIARn)* 1 (1). ISSN 2409–1618.
- [23] Tortosa, G. 2013. Caracterización agroquímica de un estiércol de oveja (o cabra) <http://www.compostandociencia.com/2013/03/caracterizacion-estiercol-oveja-y-cabra-html/> (último acceso 23.01.2023).
- [24] Brown, N., Güttler, J., Shilton, A. 2016. Overcoming the challenges of full scale anaerobic co-digestion of casein whey. *Renewable Energy* 96, 425–432.
- [25] Jelen, P., Tossavainen, O. 2003. Low lactose and lactose-free milk and dairy products- Prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology* 58 (2), 161–165.
- [26] Kratky, L., Jirout, T., 2011. Biomass size reduction machines for enhancing biogas production. *Chemical Engineering & Technology* 34 (3), 391–399. doi: 10.1002/ceat.201000357.
- [27] Koutinas, A.A., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A., Bosnea, L.A. 2009. Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology* 100, 3734–3739. doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.058
- [28] Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. 2021. El sector de la avicultura de carne en cifras. Principales Indicadores Económicos 2021. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/informeCompletoParasubirindicadores\\_tcm30-623991.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/informeCompletoParasubirindicadores_tcm30-623991.pdf) (último acceso 23.01.2023).
- [29] Statista. 2019. Largest European companies in poultry meat production as of October 2019 (in millions of animals slaughtered annually). WATT Global Media, Illinois, United States. <https://www.statista.com/statistics/959632/largest-poultry-producers-in-europe/> (último acceso 23.01.2023).
- [30] La agricultura y la ganadería extremeñas. 2016. Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales. Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura. <https://www.unex.es/conoce-la-uex/centros/eia/archivos/iag/2016/La%20agricultura%20y%20la%20Ganaderia%202016.pdf> (último acceso 23.01.2023).
- [31] Guía para el faenamiento de aves.2022. Eco business Fund Development Facility. [https://www.ecobusiness.fund/fileadmin/user\\_upload/Sustainability\\_Academy/Recursos/Guia\\_para\\_el\\_faenamiento\\_de\\_aves\\_con\\_resumen.pdf](https://www.ecobusiness.fund/fileadmin/user_upload/Sustainability_Academy/Recursos/Guia_para_el_faenamiento_de_aves_con_resumen.pdf) (último acceso 23.01.2023).
- [32] Wongngam, W., Mitani, T., Katayama, S., Nakamura, S., Yongsawatdigul, J. 2020. Production and characterization of chicken blood hydrolysate with antihypertensive properties. *Poultry Science* 99 (10), 5163–5174. doi: 10.1016/j.psj.2020.07.006.

- [33] Ruiz-Martín, A.M. 2019. Estudio de la problemática de las aguas residuales de un matadero: Opciones tecnológicas. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Cartagena.
- [34] Ministerio del Medio Ambiente. 2008. Prevención y control integrados de la contaminación (IPPC). Documento de referencias de Mejores Técnicas Disponibles para mataderos e industrias de subproductos animales (BREF).
- [35] Millner, P.D. 2009. Chapter 4 - Manure Management. *Food Science and Technology* 79–104. doi: 10.1016/B978-0-12-374186-8.00004-5.
- [36] Norris, A.B., Smith, W.B. 2020. Farming Characteristics and Manure Management of Small Ruminant and Cervid Livestock. *Animal Manure: Production, Characteristics, Environmental Concerns, and Management* 67. doi: 10.2134/asaspecpub67.c7.
- [37] Wang, G., Yang, Y., Kong, Y., Ma, R., Yuan, J., Li, G. 2022. Key factors affecting seed germination in phytotoxicity tests during sheep manure composting with carbon additives. *Journal of Hazardous Materials*. 421, 126809. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126809.
- [38] Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., Kishore, V.V.N., 2000. State of the art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 4, 135–156. [https://doi.org/10.1016/S1364-0321\(99\)00014-3](https://doi.org/10.1016/S1364-0321(99)00014-3).
- [39] Gantumur, M.A., Sukhbaatar, N., Shi, R., Hu, J., Bilawal, B., Qayum, A., Tian, B., Jiang, Z., Hou, J. 2023. Structural, functional, and physicochemical characterization of fermented whey protein concentrates recovered from various fermented-distilled whey. *Food Hydrocolloids* 135, 108130. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.108130
- [40] Shinde, G., Kumar, R., Chauhan, S.K., Subramanian, V., Nadanasabapathi, S. 2018. Whey Proteins: A potential ingredient for food industry-A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research* 37 (4), 283–290. doi: 10.18805/ajdfr. DR-1389.
- [41] Ganju, S., Gogate, R. 2017. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *Journal of Food Engineering* 215, 84–96. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.07.021.
- [42] Cavalaglio, G., Coccia, V., Cotana, F., Gelosia, M., Nicolini, A., Petrozzi, A. 2018. Energy from poultry waste: An Aspen Plus-based approach to the thermo-chemical processes. *Waste Management* 73, 496–503. doi: 10.1016/j.wasman.2017.05.037.
- [43] Hoang, A.T., Pandey, A., Huang, Z., Nižetić, S., Le, A.T., Nguyen, X.P. 2023. Chapter 3- Biofuels an option for agro-waste management. *Environmental Sustainability of Biofuels* 27–47. doi: 10.1016/B978-0-323-91159-7.00011-4.
- [44] Hoeve, M.T., Hutchings, N.J., Peters, G.M., Svanström, M., Jensen, L.S., Bruun, S. 2014. Life cycle assessment of pig slurry treatment technologies for nutrient redistribution in Denmark. *Journal of Environmental Management* 132, 60–70. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.10.023.

- [45] Motew, M., Booth, E.G., Carpenter, S.R., Chen, X., Kucharik, C.J. 2018. The synergistic effect of manure supply and extreme precipitation on surface water quality. *Environ Research Letters* 13, 044016. doi: 10.1088/1748-9326/aaade6.
- [46] Fuchs, W., Wang, X., Gabauer, W., Ortner, M., Li, Z. 2018. Tackling ammonia inhibition for efficient biogas production from chicken manure: Status and technical trends in Europe and China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97, 186–199. doi: 10.1016/j.rser.2018.08.038.
- [47] González-González A. Viabilidad medioambiental, energética y económica de la biometanización de residuos provenientes de la industria agroalimentaria en Extremadura. 2014. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
- [48] Li, K., Liu, R., Sun, C. 2016. A review of methane production from agricultural residues in China, *Renew. Renewable and Sustainable Energy Reviews* 5, 857–865. doi: 10.1016/j.rser.2015.10.103.
- [49] Lyytimäki, J. 2018. Renewable energy in the news: Environmental, economic, policy and technology discussion of biogas. *Sustainable Production and Consumption* 15, 65–73. doi:10.1016/j.spc.2018.04.004.
- [50] Yentekakis, I.V., Grammatiki, G. 2017. Biogas Management: Advanced Utilization for Production of Renewable Energy and Added-value Chemical. *Frontiers in Environmental Science* 5, 1–18. doi: 10.3389/fenvs.2017.00007.
- [51] Demirbaş, A. 2010. *Methane Gas Hydrate*, Springer, 57–76. ISBN: 978-1-84882-871-1
- [52] Akyürek, Z., 2018. Potential of Biogas Energy from Animal Waste in the Mediterranean Region of Turkey. *Journal of Energy Systems* 2(4), 159–167. doi: 10.30521/jes.455325.
- [53] Scarlat, N., Fahl, F., Dallemand, J.F., Monforti, F., Motola, V. 2018. A spatial analysis of biogas potential from manure in Europe. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 94, 915–930. doi: 10.1016/j.rser.2018.06.035.
- [54] Patterson, T., Esteves, S., Dinsdale, R., Guwy, A. 2011. An evaluation of the policy and techno-economic factors affecting the potential for biogas upgrading for transport fuel use in the UK. *Energy Policy* 39, 1806–1816. doi: 10.1016/j.enpol.2011.01.017.
- [55] Gujer, W., Zehnder, A.J.B. 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science & Technology* 15, 127–167. doi: 10.2166/wst.1983.0164.
- [56] Díaz-Báez, M., Espitia-Vargas, S., Molina-Pérez, F. 2002. *Digestión anaerobia: Una aproximación a la tecnología*. Bogotá, D.C. Universidad Nacional de Colombia.

- [57] Corrales, L.C., Antolinez Romero, D.M., Bohórquez Macías, J.A., Corredor Vargas, A.M. 2015. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*. 13, 24, 55–81. doi: 10.22490/24629448.1717.
- [58] Liu, Y., Whitman, W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125 (1), 171–89.
- [59] Guo, Y.Q., Hun, W.L., Liu, J.X. 2005. Methanogens and manipulation of methane production in the rumen. *Acta Microbiologica Sinica* 45(1), 145–148.
- [60] Boone, D., Whitman, W., Rouviere, P. 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In: *Methanogenesis*. Ferry, J.G., (Ed.). Chapman and Hall, New York, pp. 35–80.
- [61] Karakashev, D., Batstone, D.J., Angelidaki, I. 2005. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Applied and Environmental Microbiology Journal* 71, 331–338.
- [62] Krakat, N., Westphal, A., Schmidt, S., Scherer, P. 2010. Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. *Systematic and Applied Microbiology* 76, 1842–1850.
- [63] Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., Igarashi, Y. 2006. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 72,1623–1630.
- [64] Bauer, C., Korthals, M., Gronauer, A., Lebuhn, M. 2008. Methanogens in biogas production from renewable resources- a novel molecular population analysis approach. *Water Science & Technology* 58, 1433–1439. doi: 10.2166/wst.2008.514.
- [65] Munk, B., Bauer, C., Gronauer, A., Lebuhn, M. 2010. Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. *Engineering in Life Sciences* 10, 496–508.
- [66] Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., Klocke, M. 2010. Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2540–2548.
- [67] Conklin, H.D., Stensel, J.F. 2006. Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion. *Water Environment Research* 78 (5), 486–496.
- [68] Shin, S.G., Zhou, B.W., Lee, S., Kim, W., Hwang, S. 2011. Variations in methanogenic population structure under overloading of pre-acidified high-strength organic wastewaters. *Process Biochemistry* 46 (4),1035–1038.

- [69] Thauer, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W., Hedderich, R. 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* 6 (8), 579–591.
- [70] Cadillo-Quiroz, H., Brauer, S.L, Goodson, N., Yavitt, J.B., Zinder, S.H. 2014. *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1473–1480.
- [71] Baserba, M.G., Angelidaki, I., Karakashev, D. 2012. Effect of continuous oleate addition on microbial communities involved in anaerobic digestion process. *Bioresource Technology* 106, 74–81 doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.020.
- [72] Jiang, Y., McAdam, E., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C., Longhurst, P. 2019. Ammonia inhibition and toxicity in anaerobic digestion: A critical review. *Journal of Water Process Engineering* 32, 100899.
- [73] Wang, H., Ioannis, A., Angelidak, I. 2015. Ammonia effect on hydrogenotrophic methanogens and syntrophic acetate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 91 (11), 130.
- [74] Izumi, K., Okishio, Y., Nagao, N., Niwa, C., Yamamoto, S., Toda, T. 2010. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 601–608.
- [75] Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Sánchez, E., Milán, Z., Cortés, I., de la Rubia, M.A. 2012. Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. *Applied Clay Science* 58, 125–133.
- [76] Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology* 99, 7928–7940.
- [77] Guo, J., Zhang, P., Chen, Y., Shen, Y., Hu, X., Yan, P., Yang, J., Fang, F., Li, C., Gao, X., and Wang, G. 2015. Microbial attachment and adsorption–desorption kinetic of tightly bound extracellular polymeric substances on model organic surfaces. *Chemical Engineering Journal* 279, 516–521.
- [78] Chiappero, M., Norouzi, O., Hu, M., Demichelis, F., Berruti, F., Di Maria, F., Masek, O., Fiore, S. 2020. Review of biochar role as additive in anaerobic digestion processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 131, 110037. doi: 10.1016/j.rser.2020.110037.
- [79] Xiao, L., Lichtfouse, E., Kumar, S., Wang, Q., Liu, F. 2021. Biochar promotes methane production during anaerobic digestion of organic waste. *Environmental Chemistry Letters* 19, 3557–3564. doi: 10.1007/s10311-021-01251-6.
- [80] Kumar, M., Sun, Y., Rathour, R., Pandey, A., Thakur, I.S., Tsang, D.C.W. 2020. Algae as potential feedstock for the production of biofuels and value-added products: opportunities and challenges. *Science of The Total Environment* 716, 137116. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137116.

- [81] Madrigal, G., Huaraya, M., Sancho, T., Mendieta, O., Jaimes-Estévez, J. 2022. Biochar from bovine manure as a sustainable additive to improve the anaerobic digestion of cheese whey. *Bioresource Technology* 20, 101258. doi: 10.1016/j.biteb.2022.101258.
- [82] Qi, Q., Sun, C., Zhang, J., He, Y., Tong Y.W. 2021. Internal enhancement mechanism of biochar with graphene structure in anaerobic digestion: the bioavailability of trace elements and potential direct interspecies electron transfer. *Chemical Engineering Journal* 406, 126833. doi: 10.1016/j.cej.2020.126833.
- [83] Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), 2019. Superficies y producciones anuales de cultivos. Frutales no cítricos y frutales de fruto. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> (último acceso 23.01.2023).
- [84] Meza, F.A., Gamalier, L.S. 2005. El negocio de la nuez en la provincia del Choapa. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6196> (último acceso 23.01.2023).
- [85] Rodríguez-García, I.M. 2006. Caracterización química de fibras de plantas herbáceas utilizadas para la fabricación de pastas de papel de alta calidad. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- [86] Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. <http://www.fao.org> (último acceso 23.01.2023).
- [87] García, J.L., Patel, B.K.C., Ollivier, B. 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* 6 (4), 205–226. doi: 10.1006/anae.2000.0345.
- [88] Cleland, D., Krader, P., Emerson, D. 2008. Use of the DiversiLab repetitive sequence-based PCR system for genotyping and identification of *Archaea*. *Journal of Microbiological Methods* 73(2), 172–178.
- [89] Doan, N.T.L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Le Thanh, B., Vandamme, P. 2012. Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Letters in Applied Microbiology* 55, 265–273.
- [90] Aubertheau, E., Stalder, T., Mondamert, L., Ploy, M.C., Dagot, C., Labanowski, J. 2017. Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. *Science of the Total Environment* 579, 1387–1398.
- [91] Hagen, L.H., Vivekananda, V., Linjordet, R., Pope, P.B., Eijsink, V.G.H., Horn, S.J. 2014. Microbial community structure and dynamics during co-digestion of whey permeate and cow manure in continuous stirred tank reactor systems. *Bioresource Technology* 171, 350–359.



- [92] Ingrid, H., Whittle, F., Goberna, M., Insam, H. 2009. Design and testing of real-time PCR primers for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanothermobacter*, and a group of uncultured methanogens. *Canadian Journal of Microbiology* 55, 611–616.
- [93] Yu, Y., Kim, J., Hwang, S. 2006. Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: population dynamics and community structures. *Biotechnology and Bioengineering* 93, 424–433.
- [94] Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction". *Biotechnology and Bioengineering* 89, 670–679. doi: 10.1002/bit.20347
- [95] Kim, J., Lim, J., Lee, C. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances* 31(8), 1358–1373.
- [96] Zhang, T., Fang, H. 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 281–289.
- [97] Reitschuler, C., Lins, P., Ilmer, P. 2014. Primer evaluation and adaption for cost-efficient SYBR Green-based qPCR and its applicability for specific quantification of methanogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, 293–304.
- [98] Paszczynski, A.J., Paidisetti, R., Johnson, A.K., Crawford, R.L., Colwell, F.S., Green T., Delwiche, M., Lee, H., Newby, D., Brodie, E.L., Conrad M. 2011. Proteomic and targeted qPCR analyses of subsurface microbial communities for presence of methane monooxygenase. *Biodegradation* 22, 1045–1059.
- [99] Parameswaran, P., Torres, C.I., Lee, H.S., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E. 2009. Syntrophic interactions among anode respiring bacteria (ARB) and non-ARB in a biofilm anode: electron balances. *Biotechnology and Bioengineering* 103, 513–523.
- [100] Tang, Y., Ontiveros-Valencia, A., Feng, L., Zhou, C., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E. 2013. A biofilm model to understand the onset of sulfate reduction in denitrifying membrane biofilm reactors. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 763–772.
- [101] Saikaly, P.E., Hicks, K., Barlaz, M.A., de los Reyes III, F. 2010. Transport behavior of surrogate biological warfare agents in a simulated landfill: effect of leachate recirculation and water infiltration. *Environmental Science & Technology* 44 (22), 8622–8628.
- [102] Lee, I.S., Parameswaran, P., Rittmann, B.E. 2011. Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge. *Bioresource Technology*. 102, 10266–10272.
- [103] Sánchez-Sánchez, C., González-González, A., Cuadros-Salcedo, F., Cuadros-Blázquez, F. 2018. Using low-cost porous materials to increase biogas production: A

case study in Extremadura (Spain). *Journal of Cleaner Production* 198, 1165–1172. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.079

[104] Esposito, G., Frunzo, L., Panico, A., Pirozzi, F. 2011. Modelling the effect of the OLR and OFMSW particle size on the performances of an anaerobic co-digestion reactor. *Process Biochemistry*, 46 (2), 557–565.

[105] Dar, R.A., Parmar, M., DAR, E.A., Sani, R.K., Phutela, U.G. 2021. Biomethanation of agricultural residues: Potential, limitations and possible solutions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 135, 110217. doi: 10.1016/j.rser.2020.110217.

[106] APHA., AWWA., WPCF. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed. Washington DC, USA.

[107] Beltrán, J., Torregrosa, J., González, T., Domínguez, J.R. 2004. *Análisis Químico de Aguas Residuales*. Universidad de Extremadura: Ed. @becedario.

[108] Canelli, E., Mitchell, D.G., Pause, R.W. 1976. An improved determination of chemical oxygen demand in water and wastes by a simplified acid dichromate digestion. *Water Research* 10 (4), 351–356.

[109] Seoáñez, M. 2002. *Manual de tratamiento, reciclado, aprovechamiento y gestión de las aguas residuales de las industrias agroalimentarias*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

[110] González, A., Cuadros, F. 2013. Continuous biomethanization of agrifood industry waste: a case study in Spain. *Process Biochemistry* 48 (5-6), 920–925.

[111] IPCC, 2018. Anthropogenic and natural radiative forcing. Appendix 8.A: lifetimes, radiative efficiencies and metric values. [https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/02/WG1AR5\\_Chapter08\\_FINAL.pdf](https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/02/WG1AR5_Chapter08_FINAL.pdf) accessed 7 May 2020.

[112] Ministerio de Economía e Infraestructuras, 2016. Decreto 169/2016, de 18 de octubre, de la Junta de Extremadura, 2016. <http://doe.gobex.es/pdfs/doe/2016/2040o/16040194.pdf> (último acceso 23.01.2023).

[113] Ministerio de Industria, Energía y Turismo, 2017. <http://www.dieselogasolina.com/precio-del-gasoil-o-gasoleo-de-calefaccion.html> (último acceso 23.01.2023).

[114] Clustal Omega del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL) <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (último acceso 23.01.2023).

[115] Software Primer3Plus <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> (último acceso 23.01.2023).

[116] Rozen, S., Skaletsky, H.J. 2021. “Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers”. *Methods in Molecular Biology* 132, 365–386.

- [117] BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- [118] Rodríguez, A., Medina, A., Córdoba, J.J., Magana, N. 2016. Development of a HOG-based real-time PCR method to detect stress response changes in mycotoxigenic moulds. *Food Microbiology* 57, 109–115.
- [119] Probst, P.T., Meyer, M., Gupta, V., Steiner, A.M., Zhou, Z., Auernhammer, G.Z., König, T.A.F., Fery, A. 2021. Mechano-tunable chiral metasurfaces via colloidal assembly". *Nature Materials* 20, 1024–1028.
- [120] Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba, J.J. 2012. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *International Journal of Food Microbiology* 155(1-2), 10–181.
- [121] Karwacka, M., Ciużyńska, A., Lenart, A., Janowicz, M. 2020. Sustainable Development in the Agri-Food Sector in Terms of the Carbon Footprint: A Review. *Sustainability* 12(16), 6463. doi: 10.3390/su12166463.
- [122] Sánchez-Sánchez, C., González-González, A., Cuadros-Salcedo, F., Cuadros-Blázquez, F. 2020. Two-phase Olive mill waste: A circular economy solution to an imminent problem in Southern Europe. *Journal of Cleaner Production* 274, 122789.
- [123] Secundo, G., Ndou, V., Del Vecchio, P., De Pascal, G. 2020. Sustainable development, intellectual capital and technology policies: A structured literature review and future research agenda. *Technological Forecasting and Social Change* 153, 119917. doi: 10.1016/j.techfore.2020.119917.
- [124] Kavacik, B., Topaloglu, B. 2010. Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. *Biomass and Bioenergy* 34 (9), 1321-1329. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.04.006.
- [125] Charalambous, P., Shin, J., Shin, S.G., Vyrides, I. 2020. Anaerobic digestion of industrial dairy wastewater and cheese whey: performance of internal circulation bioreactor and laboratory batch test at pH 5–6. *Renewable Energy* 147, 1-10. doi: 10.1016/j.renene.2019.08.091.
- [126] Kazimierowicz, J., Dębowski, M., Zieliński, M. 2023. Taxonomic Structure Evolution, Chemical Composition and Anaerobic Digestibility of Microalgae-Bacterial Granular Sludge (M-BGS) Grown during Treatment of Digestate. *Applied Sciences* 13(2), 1098. doi:10.3390/app13021098.
- [127] Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., Tiedje, J. 1999. How Stable Is Stable? Function versus Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3697–3704.
- [128] Li, L., He, Q., Ma, Y., Wang, X., Peng, X. 2015. Dynamics of Microbial Community in a Mesophilic Anaerobic Digester Treating Food Waste: Relationship between Community Structure and Process Stability. *Bioresource Technology* 189, 113–120.

- [129] Wang, P., Wang, H., Qiu, Y., Ren, L., Jiang; B. 2018. Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production- A review. *Bioresource Technology* 248 (A), 29–36. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.152.
- [130] Khan, S., Lu, F., Jiang, Q., Jiang, C., Kashif, M., Shen, P. 2020. Assessment of Multiple Anaerobic Co-Digestions and Related Microbial Community of Molasses with Rice-Alcohol Wastewater. *Energies* 13 (18), 4866. doi: 10.3390/en13184866.
- [131] Hassa, J., Maus, I., Off, S., Pühler, A., Scherer, P., Klocke, M., Schlüter, A.2018. Metagenome, Metatranscriptome, and Metaproteome Approaches Unraveled Compositions and Functional Relationships of Microbial Communities Residing in Biogas Plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 5045–5063.
- [132] Ju, F., Lau, F., Zhang, T. 2017. Linking Microbial Community, Environmental Variables, and Methanogenesis in Anaerobic Biogas Digesters of Chemically Enhanced Primary Treatment Sludge. *Environmental Science & Technology* 51, 3982–3992. doi: 10.1021/acs.est.6b06344.
- [133] Upadhyay, A., Kovalev, A.A., Zhuravleva, E.A., Kovalev, D.A., Litti, Y.V., Masakapalli, S.K., Pareek, N., Vivekanand, V. 2023. A Review of Basic Bioinformatic Techniques for Microbial Community Analysis in an Anaerobic Digester. *Fermentation* 2023, 9(1), 62. doi: 10.3390/fermentation9010062.
- [134] Jia, Z., Ye, X., Liu, Y., Wang, C., Cao, C., Du, J., Kong, X., Chen, Z., Xi, Y. Metal–organic framework-derived porous metal oxide/graphene nanocomposites as effective adsorbents for mitigating ammonia nitrogen inhibition in high concentration anaerobic digestion of rural organic waste. *Fuel* 332 (1), 126032. doi: 10.1016/j.fuel.2022.126032.
- [135] Elsayed, M., Ran, Y., Ai, P., Azab, M., Mansour, A., Jin, K., Zhang, Y., Abomohra, A.E.F. 2020. Innovative integrated approach of biofuel production from agricultural wastes by anaerobic digestion and black soldier fly larvae. *Journal of Cleaner Production* 263, 121495. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.121495.
- [136] Kaal, J., Martínez-Cortizas, A., Reyes, O., Soliño, M. 2012. Molecular characterization of *Ulex europaeus* biochar obtained from laboratory heat treatment experiments – A pyrolysis–GC/MS study. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 95, 205–212. doi: 10.1016/j.jaap.2012.02.008.
- [137] You, S., Sik Ok, J., Chen, S.S., Tsang, D.C.W., Kwon, E.E., Lee, J., Wang, C.H. 2017. A critical review on sustainable biochar system through gasification: Energy and environmental applications. *Bioresource Technology* 246, 242–253. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.177.
- [138] Al-Wabel, M.I., Al-Omran, A., El-Naggar, A.H., Nadeem, M., Usman, A.R.A. 2013. Pyrolysis temperature induced changes in characteristics and chemical composition of biochar produced from conocarpus wastes. *Bioresource Technology* 131, 374–379. doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.165.

- [139] Hammes, K., Schmidt, M.W.I. 2009. Changes in biochar in soil. Chapter 10. In: Lehmann J, Joseph S (eds) Biochar for environmental management science and technology. Earthscan, London, pp 169–182.
- [140] Bertó R. 2018. Las Arqueas: Un mundo microbiológico por descubrir, <https://www.betelgeux.es/blog/2018/02/26/las-arqueas-todo-un-mundo-microbiologico-por-descubrir/> (último acceso 21.12.2022).
- [141] Salehi, R., Chaiprapat, S. 2022. Conversion of biogas from anaerobic digestion to single cell protein and bio-methanol: mechanism, microorganisms and key factors - A review. *Environmental Engineering Research* 27(4), 210109. doi: 10.4491/eer.2021.109.
- [142] Oremland, R.S., Polcin, S. 1982. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments, *Applied and Environmental Microbiology* 44(6), 1270–6. doi: 10.1128/aem.44.6.1270-1276.1982.
- [143] Sela-Adler, M., Ronen, Z., Herut, B., Antler, G., Vigderovich, H., Eckert, W., Sivan, O. 2017. Co-existence of methanogenesis and sulfate reduction with common substrates in sulfate-rich estuarine sediments. *Frontiers in Microbiology* 5. doi: /10.3389/fmicb.2017.00766.
- [144] Cookson, J.T.J. 1908. Adsorption mechanisms: the chemistry of organic adsorption on activated carbon. In: Cheremisinoff PN, Ellerbusch F, editors. *Carbon Adsorption Handbook*, Ann Arbor Science 241–79.
- [145] Smisek, M., Cerny, S. 1970. *Active Carbon, Manufacture, Properties and Applications*. Von M. Smišek und S. Cerný. Elsevier Publishing Comp., Amsterdam–London–New York 1970. 1. Aufl., VII, 479 S., ca. DM 97. doi: 10.1002/ange.19710830820.
- [146] Kousi, P., Remoundaki, E., Hatzikioseyan, A., Tsezos, M. 2015. Sulphate-reducing bioreactors: current practices and perspectives, IWA Balkan Young Water Professional Conference, Thessaloniki, Greece, 409–17.
- [147] Lide D.R, editor. *CRC handbook of chemistry and physics*. 86th Ed. Boca Raton: Taylor & Francis; 2005.

## 6.2. Referencias utilizadas en los artículos científicos

- Alba International Group. 2014. Contexto de la Comunidad Autónoma de Extremadura. Programa de Desarrollo Rural. 2014-2020. [https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2021-07/rdp-factsheet-spain-extremadura\\_es\\_0.pdf](https://agriculture.ec.europa.eu/system/files/2021-07/rdp-factsheet-spain-extremadura_es_0.pdf) (último acceso 23.01.2023).
- Ali, S.S., Wu, J., Xie, R., Zhou, F., Sun, J., Huang, M. 2017. Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite. *Reticulitermes chinensis*. *PLoS One* 12 (7).

Almeida, P.F., Salles, J.AA., Farias, T.M.B., Curvelo S.J.C. 2012. Aprovechamiento de patas de pollo como alternativa para disminuir residuos generados en los mataderos. *Información tecnológica* 23 (4), 42–52 doi:10.4067/S0718-07642012000400006.

APHA., AWWA., WPCF. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed. Washington DC, USA.

Baloch, H.A., Nizamuddin, S., Siddiqui, M.T.H., Riaz, S., Jatoi, A.S., Dumbre, D.K., Mubarak, N.M., Srinivasan, M.P., Griffin, G.J. 2018. Recent advances in production and upgrading of bio-oil from biomass: a critical overview. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6, 5101–5118.

Bauer, F., Hulteberg, C., Persson, T., Tamm, D. 2013. *Biogas upgrading- Review of commercial Technologies*. Swedish Gas Technology Centre, SGC 270.

Brennan, G., Tennant, M., Blomsma, F. 2015. Business and production solutions: closing the loop, in: Kopnina, H., Shoreman-Ouimet, E. (Eds.), *Sustainability: Key Issues*. E- Publishing Inc., EarthScan, Routledge, 219–239.

Capson-Tojo, G., Moscoviz, R., Astals, S., Robles, A., Steyere, P. 2020. Unraveling the literature chaos around free ammonia inhibition in anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 117, 109487.

Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology* 99 (10), 4044–4064. doi.10.1016/j.biortech.2007.01.057

Cuadros, F., López, F., Ruiz, A., Rubiales, F., González, A. 2011. Recycling, reuse and energetic valuation of meat industry wastes in Extremadura (Spain). *Resources, Conservation and Recycling* 55, 393–399.

Cuadros-Blázquez, F., González-González, A., Sánchez-Sánchez, C., Díaz-Rodríguez, V., Cuadros-Salcedo, F. 2018. Waste valorization as an example of circular economy in Extremadura (Spain). *Journal of Cleaner Production* 181, 136–44.

Dabert, P., Delgenes, J.P., Moletta, R., Godon, J.J. 2002. Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 1, 39–42.

Desai, M., Madamwar, D. 1994. Anaerobic digestion of a mixture of cheese whey, poultry waste and cattle dung: a study of the use of adsorbents to improve digester performance. *Environmental Pollution* 86, 337–340.

Desiderio, T.M., Stacy, N.I., Ossiboff, R.J., Iredale, M., Archer, L.L., Alexander, A.B., Heard, D.J., Crevasse, S.E., Craft, W.F., Fredholm, D.V.E., Donnelly, K.A., Rosenberg, J.F., Childress A.L., Russell, K., Wellehan Jr, J.F.X. 2021. Identification of a novel mortality-associated *Helicobacter* species in gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*), qPCR test development and validation, and correlation with mortality in a wildlife rehabilitation population. *Veterinary Microbiology* 259, 109136 doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109136.

Dhokpande, S.R., Kaware, J.P., Kulkarni, S.J. 2013. Research for removal of nickel from wastewater—A review. *International Journal of Scientific & Technology Research* 2 (12), 6.

- Edokpayi, J., Odiyo, J., Msagati, T., Popoola, E. 2015. Removal efficiency of faecal indicator organisms, nutrients and heavy metals from a Peri-Urban wastewater treatment plant in Thohoyandou, Limpopo Province, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12(7), 7300–7320.
- Elia, V., Gnoni, MG., Tornese, F. 2017. Measuring circular economy strategies through index methods: A critical analysis. *Journal of Cleaner Production* 142 (4), 2741–2751.
- Eroski foundation, 2017. [http://www.consumer.es/web/es/medio\\_ambiente/urbano/2010/03/17/191793.php](http://www.consumer.es/web/es/medio_ambiente/urbano/2010/03/17/191793.php) (último acceso 23.01.2023).
- European Commission. 2015 [https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:8a8ef5e8-99a0-11e5-b3b7-01aa75ed71a1.0011.02/DOC\\_1&format=PDF](https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:8a8ef5e8-99a0-11e5-b3b7-01aa75ed71a1.0011.02/DOC_1&format=PDF) (ultimo acceso 23.01.2023).
- Farizoglu, B., Keskinler, B., Yildiz, E., Nuhoglu, A. 2007. Simultaneous removal of C, N, P from cheese whey by jet loop membrane bioreactor (JLMBR). *Journal Hazardous Materials* 146, 399–407.
- Fischer, A., Pascucci, S. 2017. Institutional incentives in circular economy transition: The case of material use in the Dutch textile industry. *Journal of Cleaner Production* 155(2), 17–32.
- Fisgativ, H., Tremier, A., Dabert, P. 2016. Characterizing the variability of food waste quality: A need for efficient valorisation through anaerobic digestion. *Waste Management* 50, 264–274.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. (último acceso 23.01.2023). '(in Spanish)'
- Gang, L., Angelidaki, I. 2013. Co-digestion of manure and whey for in situ biogas upgrading by the addition of H<sub>2</sub>: Process performance and microbial insights. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 1373–1381.
- Gannoun, H., Khelifi, E., Bouallagui, H., Touhami, Y., Hamdi, M. 2008. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. *Bioresource Technology* 99, 6105–6111.
- Geeta, G.S., Raghevendra, S., Reddy, T.K.R. 1986. Increase in biogas production from bovine excreta by addition of various inert materials. *Agricultural Wastes* 17, 153–156.
- Geissdoerfer, M., Savaget, P., Bocken, N.M.P., Hultink, E.J. 2017. The Circular Economy—A new sustainability paradigm? *Journal of Cleaner Production* 143, 757–768.
- Ghisellini, P., Cialani, C., Ulgiati, S. 2016. A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *Journal of Cleaner Production* 114, 11–32.
- Gong, W., Liang, H., Li, W., Wang, Z. 2011. Selection and evaluation of biofilm carrier in anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Energy* 36, 3572–3578.
- González, A., Cuadros, F. 2014. Optimal and cost-effective industrial biomethanation of tobacco. *Renewable Energy* 63, 280–285.

## Capítulo 6. Referencias

- González, A., Cuadros, F. 2015. Effect of aerobic pretreatment on anaerobic digestion of olive mill wastewater (OMWW): An ecoefficient treatment". *Food and Bioproducts Processing* 95, 339–345.
- González, A., Cuadros, F., López, F. 2014. Influence of heavy metals in the biomethanation of slaughterhouse waste. *Journal of Cleaner Production* 65, 473–478.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K. 1999. Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Research* 33(8), 1805–10.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2004.
- Interprofessional dairy organization in Spain (INLAC). Data on production, industry and consumption in the dairy sector (2008-2015). <https://cooperativas-agro.s3.eu-west-1.amazonaws.com/old/docs/05092.pdf> (último acceso 23.01.2023).
- John, A., Mathews., Tan, H. 2011. Progress Toward a Circular Economy in China. *Journal of Industrial Ecology* 15 (3), 435–457.
- Kaplan, E., Aktaş, D., Döğen, A., Hilmioğlu-Polat, S., Gümral, R., Hagen, F., Ilkit, M., de Hoog, G.S.2021. Development and analysis of qPCR for the identification of arthroconidial yeasts of the genus *Magnusiomyces*. *Mycopathologia* 186, 41–51.
- Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Souidi, K., Mumme, J., Linke, B. 2008. Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology* 31,190–205.
- Kratky, L., Jirout, T. 2011. Biomass Size Reduction Machines for Enhancing Biogas Production. *Chemical Engineering Technology* 34, 391–399.
- Krause, L., Diaz, N.N., Goesmann, A., Kelley, S., Nattkemper, T.W., Rohwer, F., Edwards, R.A., Stoye, J. 2008. Phylogenetic classification of short environmental DNA fragments. *Nucleic Acids Research* 36, 2230–2239.
- Krishania M, Kumar V, Kumar Vijay V, Malik, A. 2013. Analysis of different techniques for improvement of biomethanation process: A review. *Fuel* 106,1–9.
- Kumar, S., Jain, M.C., Chhonkar, P.K. 1987. A note on stimulation of biogas production from cattle dung by addition of charcoal. *Biological Wastes* 20, 209–215.
- Lehmann, J. 2007. A handful of carbon. *Nature* 447, 143–144.
- Lehmann, J., Czimczik, C.I.C., Laird, D., Sohi, S. 2009. Stability of Biochar in the Soil. In J. Lehmann, J. Stephen (Eds.). *Biochar for Environmental Management: Science and Technology* (pp. 169-182), Earthscan.
- Libra, J.A., Ro, K.S., Kammann, C., Funke, A., Berge, N.D., Neubauer, Y., Titirici, M.M., Fühner, C., Bens, O., Kern, J. 2011. Hydrothermal carbonization of biomass residuals: a comparative review of the chemistry, processes and applications of wet and dry pyrolysis. *Biofuels* 2, 89–124.
- Liu, H., Wang, J., Wang, A.J., Chen, J.A.2011. Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (5), 1333–1340.



- Liu, T., Boone, D.R., Sleat, R., Mah, R.A. 1985. *Methanosarcina mazei lyc*, a new methanogenic isolate which produces a disaggregating enzyme. *Applied and Environmental Microbiology* 49 (3), 608–613.
- Los bosques extremeños. Sistemas y Recursos forestales [http://extremambiente.juntaex.es/pdf/BosquesCap15\\_peq.pdf](http://extremambiente.juntaex.es/pdf/BosquesCap15_peq.pdf) (último acceso 23.01.2023).
- Lü, F., Luo, C., Shao, L., He, P. 2016. Biochar alleviates combined stress of ammonium and acids by firstly enriching *Methanosaeta* and then *Methanosarcina*. *Water Research* 90, 34–43.
- Luo, C., Lu, F., Shao, L., He, P. 2015. Application of eco-compatible biochar in anaerobic digestion to relieve acid stress and promote the selective colonization of functional microbes. *Water Research* 68, 710–8.
- Maroušek, J. 2013a. Removal of hardly fermentable ballast from the maize silage to accelerate biogas production. *International Journal of Green Energy* 44, 253–257.
- Maroušek, J. 2013b. Study on Commercial Scale Steam Explosion of Winter Brassica Napus Straw. *International Journal of Green Energy* 10, 944–951.
- Maroušek, J., Hašková, S., Zeman, R., Váchal, J., Vanícková, R. 2014. Nutrient Management in Processing of Steam-Exploded Lignocellulose Phytomass. *Chemical Engineering Technology* 37, 1945–1948.
- Maroušek, J., Kawamitsu, Y., Ueno, M., Kondo, Y., Kolář, L. 2012. Methods for improving methane yield from rye straw. *Applied Engineering in Agriculture* 28, 747–755.
- Maroušek, J., Vochozka, M., Plachý, J., Zák, J. 2017. Glory and misery of biochar. *Clean Technologies and Environmental Policy* 19, 311–317.
- Marwaha, S.S., Kennedy, J. F. 1988. Review: whey pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science and Technology* 23, 323–336.
- Mawson, A.J. 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology* 47, 195–203.
- Minhalma, M., Magueijo, V., Queiroz, D.P., Pinho, M.N. 2007. Optimization of “Serpa” cheese whey nanofiltration for effluent minimization and by-products recovery. *Journal of Environmental Management* 82, 200–206.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2011-2012. [https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/II.H.%20Agricultura\\_tcm30-84068.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/II.H.%20Agricultura_tcm30-84068.pdf) (último acceso 23.01.2023).
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1990. Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre. <http://www.boe.es/boe/dias/1990/11/01/pdfs/A32339-32340.pdf> (último acceso 23.01.2023).
- Ministerio de Agricultura, Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Energía, 2015. Decreto 110/2015, de 18 de mayo, de la Junta de Extremadura.

- Ministerio de Fomento, 2017 (anexo 15). <https://www.fomento.gob.es/NR/rdonlyres/BC8AD664-127D-4CEF-AD59-0A221BE54FA2/37439/Anejo15borde.pdf> (último acceso 23.01.2023).
- Ministerio de la Presidencia, 2007. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre. <https://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf> (último acceso 23.01.2023).
- Moreno, L., González, A., Cuadros-Salcedo, F., Cuadros-Blázquez, F. 2017. Feasibility of a novel use for agroindustrial biogas. *Journal of Cleaner Production* 144, 48–56 doi: 10.1016/j.jclepro.2016.12.060.
- Mumme, J., Srocke, F., Heeg, K., Werner, M. 2014. Use of biochars in anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 164, 189–197. doi: 10.1016/j.biortech.2014.05.008.
- Pande, H., Roy, D.M. 1998. Influence of fibre morphology and chemical composition on the papermaking potential of kenaf fibres: A look at what attributes affect tensile strength. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Park, J.Y., Chertow, M.R. 2014. Establishing and testing the “reuse potential” indicator for managing wastes as resources. *Journal of Environmental Management* 137, 45–53.
- Pearce D.W., Turner, R.K. 1989. *Economics of Natural Resources and the Environment*, Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Potocnik, J., 2013. *Towards the Circular Economy - Economic and Business Rationale for an Accelerated Transition*. Ellen MacArthur Foundation.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J. 2012. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management* 110, 48–68.
- Qatibi, A.I., Bories, A., Garcia, J.L. 1991. Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture. *Current Microbiology* 22 (1), 47–52.
- Raposo, F., Borja, R., Sánchez, E., Martín, M.A., and Martín, A. 2004. Performance and kinetic evaluation of the anaerobic digestion of two-phase olive mil effluents in reactors with suspended and immobilized biomass. *Water Research* 38, 2017–2026.
- Raskin, L., Poulsen, L.K., Noguera, D.R., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. 1994. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (4).
- Reichel, A., Schoenmakere, M., Gillabel, J. 2016. *Circular Economy in Europe- Developing the Knowledge Base*. European Environmental Agency (EEA).
- Roberts, K.G., Gloy, B.A., Joseph, S., Scott, N.R., Lehmann, J. 2010. Life cycle assessment of biochar systems: estimating the energetic, economic, and climate change potential. *Environmental Science Technology* 44, 827–833.
- Rodríguez, A., Luque, M.I., Andrade, M.J., Rodríguez, M., Asensio, M.A., Córdoba, J.J. 2011. Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products”. *Food Microbiology* 28(6), 1190–1199.

- Romero-Arenas, O., López, R., Damián, M.A., Hernández, I., Parraguirre J.F., Huerta, M. 2012. Evaluation of residue of rind of nut (*Juglans regia L.*) in production of seedlings of *Pinus patula*, in pond. *Costa Rican Agronomy* 36, 103–110 '(in Spanish)'.
- Sameh, S.A., Jianzhong, S. 2019. Effective thermal pretreatment of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for the enhancement of biomethanation: VIT® gene probe technology for microbial community analysis with special reference to methanogenic *Archaea*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 7, (1), 102853.
- Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N.N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H., Kruse, O., Mussnug, J.H., Neuweger, H., Niehaus, K., Pühler, A., Runte, K.J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Tilker, A., Viehöver, P., Goesmann, A. 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology* 136 (1-2), 77–90. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.05.008
- Schmidt, H.P., Kammann, C., Niggli, C., Evangelou, M.W.H., Mackie, K.A., Abiven, S. 2014. Biochar and biochar-compost as soil amendments to a vineyard soil: Influences on plant growth, nutrient uptake, plant health and grape quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 191, 117–123.
- Sean, T., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., Nguyen, M. 2010. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50(4), S1–S5.
- Shen, Y., Linville, J.L., Ignacio-de Leon, P.A., Schoene, R.P., Urgun-Demirtas, M. 2016. Towards a sustainable paradigm of waste-to-energy process: Enhanced anaerobic digestion of sludge with woody biochar. *Journal of Cleaner Production* 135, 1054–64.
- Shigematsu, T., Tang, Y., Kawaguchi, H., Ninomiya, K., Kijima, J., Kobayashi, T. 2003. Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, 547–558.
- Shiozawa, S., Campbell, G.S. 1990. Soil thermal conductivity. *Remote Sensing Reviews* 5(1), 301–10.
- Silva, A., Rosano, M., Stocker, L., Gorissen, L. 2017. From waste to sustainable materials management: Three case studies of the transition journey. *Waste Management* 61, 547–557.
- Siso, M.I. 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* 57, 1–11.
- Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal* 18, 695–704.
- Steinberg, L.M., Regan, J.M. 2020. mcrA-targeted real-time quantitative PCR method to examine methanogen communities. *Applied and Environmental Microbiology Journal* 75, 13.
- Sturza, R., Mitin, V., Mitina, I., Buga, A., Zgardan, D., Behta, E. Development and validation of SYBR green-based qPCR technique of detection and quantification of *Salmonella enterica*. *Nutrition & Food Science* 12, 997–1007.
- Torri, C., Fabbri, D. 2014. Biochar enables anaerobic digestion of aqueous phase from intermediate pyrolysis of biomass. *Bioresource Technology* 172, 335–341.

## Capítulo 6. Referencias

- Truchado, P., Gil, M.I., Kostic, T., Allende, A. 2016. Optimization and validation of a PMA qPCR method for *Escherichia coli* quantification in primary production. *Food Control* 62, 150–156.
- Urrestarazu, M., Martínez, G.A., Salas, M.C. 2005. Almond shell waste: possible local rockwool substitute in soilless crop culture. *Scientia Horticulturae* 103, 453–460.
- .
- Watanabe, R., Tada, C., Baba, Y., Fukuda, Y., Nakai, Y. 2013. Enhancing methane production during the anaerobic digestion of crude glycerol using Japanese cedar charcoal. *Bioresource Technology* 150, 387–92.
- Weber, K., Quicker, P. 2018. Properties of biochar. *Fuel* 217, 240–61.
- Woolf, D., Amonette, J.E., Street-Perrott, F.A., Lehmann, J., Joseph, S. 2010. Sustainable biochar to mitigate global climate change. *Nature Communications* 1, 1–9.
- Worldsteel Association, 1967. <http://circulareconomy-worldsteel.org/> (último acceso 23.01.2023).
- Xing, W., Zuo, J.E., Dai, N., Cheng, J., Li, J. 2009. Reactor performance and microbial community of an EGSB reactor operated at 20 and 15 °C. *Journal of Applied Microbiology* 107, 848–857.
- Yang, Y., Tada, C., Shohidullah, M., Tsukahara, K., Yagishita T., Sawayama, S. 2004. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. *Materials Science and Engineering: C* 24, 413–419.
- Yan-Qiu G., Hu, W.L., Liu J.X. 2005. Methanogens and manipulation of methane production in the rumen. *Acta Microbiologica Sinica* 45(1), 145–148.
- Zhou, Z., Zhao, W., Chen, X., Zeng, H., 2017. MFCA extension from a circular economy perspective: Model modifications and case study. *Journal of Cleaner Production* 149, 110–125.

## **Capítulo 7. RELACIÓN DE PUBLICACIONES**



En este capítulo se muestra las publicaciones relacionadas directa o indirectamente con esta Tesis Doctoral, y que constituyen las aportaciones científicas referentes al trabajo realizado por la doctoranda en el Grupo de Investigación de la Universidad de Extremadura DTERMA, reflejando el impacto de los resultados. Se muestran los artículos científicos indexados en *Journal Citations Reports*, los capítulos de libro y las comunicaciones y pósteres presentadas a congresos nacionales e internacionales.

### 7.1. Artículos indexados en Journal Citation Reports

- Anexo I F. Cuadros Blázquez, A. González González, V. Díaz Rodríguez, C. Sánchez Sánchez, F. Cuadros Salcedo. 2018. Waste valorization as an example of circular economy in Extremadura (Spain). *Journal of Cleaner Production* 181, 136–144. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.01.228.
- Anexo II Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo, Francisco Cuadros Blázquez. 2018. Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura (Spain). *Journal of Cleaner Production* 198, 1165–1172. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.07.079.
- Anexo III Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo, Vicente Gómez Serrano, Francisco Cuadros Blázquez. 2019. Charcoal as a bacteriological adherent form biomethanation of organic wastes. *Energy* 179, 336–342. DOI: 10.1016/j.energy.2019.04.192.
- Anexo IV Consolación Sánchez Sánchez, Mercedes Aranda Medina, Alicia Rodriguez, Alejandro Hernández, María G. Córdoba, Francisco Cuadros Blázquez, Santiago Ruiz Moyano. 2022. Development of real-time PCR methods for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina* and *Methanobacterium* in anaerobic digestion. *Journal of Microbiological Methods* 199, 106522. DOI: 10.1016/j.mimet.2022.106529.

J.L. Llerena Ruiz; A. González González; F. Cuadros Blázquez; C. Sánchez Sánchez; F. Cuadros Salcedo; J.A. García Barrado. 2019. Treatment and energy recovery of tomato industry waste by biomethanation. *Acta Horticulturae* 1233, 175–183. DOI: 10.17660/ActaHortic.2019.1233.25.

Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo, Francisco Cuadros Blázquez. 2020. Two-Phase Olive Mill Waste: A circular economy solution to an imminent problem in Southern Europe. *Journal of Cleaner Production* 274, 122789. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.122789.

## **7.2. Artículo enviado para publicación en JCR**

Consolación Sánchez-Sánchez, Carmen Fernández González, Vicente Gómez-Serrano, Almudena González-González, Francisco Cuadros-Blázquez. 2022. Improving biogas production by adding biochar from olive wood waste. *Fuel* (Diciembre 2022). Disponible en SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4313211> o DOI: 10.2139/ssrn.4313211.

## **7.3. Capítulo de libro publicado en editorial *Springer***

Consolación Sánchez Sánchez, Francisco Cuadros Blázquez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo, 2022. Biofuel in Constructing Green Circular Societies: Circular Biorefinery of TPOMW En: *Biofuels in Circular Economy*, Suhaib A. y Bandh Fayaz A (Ed.), pp. 103–121. Springer. ISBN 978-981-19-5836-6  
DOI: 10.1007/978-981-19-5837-3.



#### **7.4. Otros capítulos de libro**

Consolación Sánchez Sánchez, Francisco Cuadros Blázquez, Lourdes Ciudad, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo. 2017. Producción de biogás a partir de lodos residuales de un matadero de aves. La investigación del grupo especializado de termodinámica de las reales sociedades españolas de física y química. 8, pp. 17–24. ISBN:978-84-17776-76-3.

F. Cuadros Blázquez, C. Sánchez Sánchez, A. González González, F. Cuadros Salcedo. 2017. Green and Circular Economy: A case study in Extremadura (Spain). Current Trends in Energy and Sustainability. pp. 87–101. Real Sociedad Española de Física. ISBN: 978-84-0903541-0.

C. Sánchez Sánchez, F. Cuadros Blázquez, A. González González, F. Cuadros Salcedo. 2018. Cómo convertir un problema en una oportunidad de negocio. La Investigación del Grupo Especializado de Termodinámica de las Reales Sociedades Españolas de Física y Química. 9, pp. 2131. ISBN: 978-84-9749-735-0.

C. Sánchez Sánchez. 2020. Aplicación de una nueva tecnología para monitorizar la biometanización de residuos agroalimentarios. En: Catálogo de investigación joven de Extremadura. 3, pp. 357–362. ISBN 978-84-09-25221-3

#### **7.5. Comunicaciones presentadas a congresos internacionales**

Consolación Sánchez Sánchez, Francisco Cuadros Blázquez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo. 2017. Innovaciones en la producción de biogás. I Congreso Luso-Extremadureño de Ciencias e Tecnología. Évora (Portugal).

Consolación Sánchez Sánchez; Almudena González González; Roberta Panizio; Paulo Brito; Vicente Gómez Serrano; Francisco Cuadros Blázquez; Carmen Fernández González. 2022. Meso and macroporosity in carbonaceous materials prepared by thermal treatment from lignocellulosic wastes. International conference on water, energy, food and sustainability (ICoWEFS). Portalegre (Portugal).

### **7.6. Pósteres presentados a congresos Internacionales**

Francisco Cuadros-Blázquez, Consolación Sánchez-Sánchez, Almudena González-González, Francisco Cuadros-Salcedo. 2018. Biomethanization of olive oil waste: energetic, economic and environmental benefits. 4th Iberoamerican congress on biorefineries. Jaén (España).

Almudena González-González, Francisco Cuadros, Consolación Sánchez-Sánchez, Francisco Cuadros-Salcedo, José Antonio García-Barrado, Rubén Sánchez, José Luis Llerena Ruiz. 2018. Treatment and energy recovery of tomato industry waste by biomethanation. 13th World tomato congress. Crecia.

### **7.7. Comunicaciones presentadas a congresos Nacionales**

Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo, Francisco Cuadros Blázquez. 2017. Uso de materiales alveolares de bajo coste para aumentar la producción de biogás. XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física. Santiago de Compostela (España).

F. Cuadros Blázquez, A. González González, V. Díaz Rodríguez, C. Sánchez Sánchez, F. Cuadros Salcedo. 2017. Planta de biogás de un matadero de aves. Un ejemplo de

economía verde. XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física. Santiago de Compostela, España.

Consolación Sánchez Sánchez, Francisco Cuadros Blázquez, Almudena González-González, Francisco Cuadros-Salcedo. 2018. Aprovechamiento energético de los residuos del aceite de oliva a través de la biometanización. II Congreso Luso-Extremadurensis de ciencia y tecnología. Badajoz (España).

Consolación Sánchez Sánchez, Francisco Cuadros Blázquez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo. 2018. Técnicas de recuperación sencillas y económicas de un digestor anaerobio en inhibición. XVI Encuentro inter-bienal del grupo especializado de termodinámica (GET 2018). A Coruña (España).

Francisco Cuadros Blázquez, Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo. 2018. Cómo convertir un problema en una oportunidad de negocio. XVI Encuentro inter-bienal del grupo especializado de termodinámica (GET 2018). A Coruña (España).

Consolación Sánchez Sánchez, Francisco Cuadros Blázquez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo. 2018. Estudio de sensibilidad económica y medioambiental de una planta de biogás. IV Congreso multidisciplinar de jóvenes investigadores de Extremadura. Badajoz (España).

Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González-González, Francisco Cuadros-Salcedo, Vicente Gómez-Serrano, Francisco Cuadros-Blázquez. 2019. Charcoal as a bacteriological adherent of the biomethanation. XXXVII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física. Zaragoza (España).

Francisco Cuadros-Blázquez, Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González-González, Francisco Cuadros-Salcedo. 2019. El tabaco como cultivo energético. XXXVII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física. Zaragoza (España).

Consolación Sánchez Sánchez; Mercedes Aranda Medina, Alicia Rodríguez, Alejandro Hernández, María G. Córdoba, Francisco Cuadros Blázquez, Santiago Ruiz Moyano. 2022. Development of real-time PCR methods for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina* and *Methanobacterium* in AD. XXXVIII Reunión Bienal de la Real Sociedad. Murcia (España).

Francisco Cuadros Blázquez, Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo. 2022. Secuestro de Carbono en una Planta Híbrida Biogás-Fotovoltaica Seguida de un Proceso de Compostaje. XXXVIII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Física. Murcia (España).

## ANEXOS

# ANEXO I

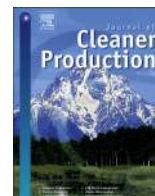
### Referencia

F. Cuadros Blázquez, A. González González, V. Díaz Rodríguez, C. Sánchez Sánchez, F. Cuadros Salcedo, 2018. Waste valorization as an example of circular economy in Extremadura (Spain). *Journal of Cleaner Production* 181, 136–144. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.01.228.

### Derechos de autor

No es necesario el permiso de la editorial. Como autor de un artículo publicado en una revista de Elsevier, conserva el derecho de incluirlo en una tesis o disertación, siempre que no se publique comercialmente. La publicación formal del artículo puede encontrarse a través del siguiente enlace: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.228>.





## Waste valorization as an example of circular economy in extremadura (Spain)

F. Cuadros Blázquez<sup>a</sup>, A. González González<sup>b</sup>, C. Sánchez Sánchez<sup>a,\*</sup>, V. Díaz Rodríguez<sup>a</sup>, F. Cuadros Salcedo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Applied Physics, School of Agricultural Engineering, University of Extremadura, Avda. de Elvas s/n, 06006, Badajoz, Spain

<sup>b</sup> Metanogenia S.L. Edificio Biodiversidad, Campus Universitario, Avda. de Elvas s/n, 06006, Badajoz, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 June 2017

Received in revised form

26 January 2018

Accepted 27 January 2018

Available online 3 February 2018

#### Keywords:

Circular economy

Anaerobic co-digestion

Energetic feasibility

Economic feasibility

Environmental feasibility

### ABSTRACT

This work demonstrates the possibility of implementing clean, renewable technologies that allow profitable value to be drawn from the highly contaminant waste of a broiler industry. An anaerobic digestion (AD) process can significantly reduce the overall chemical oxygen demand (COD), and the digestate's COD is also reduced to within legal limits by the process of separating its liquid and solid phases. The resulting liquid phase complies with regulations regarding discharge into the sewerage network or irrigation of crops with whose fruit it does not come in contact. The solid phase can be subjected to composting, obtaining an agricultural amendment of good quality. The materials used in the construction of the plant (steel, iron, concrete, paints, polyurethane, and PVC and HDPE plastics) are easily reusable or recyclable using standard technologies once the AD plant has reached the end of its service life (25–30 years). The study of the economic feasibility of the industrial plant, based on previous results, showed that the period of return on investment (PRI), net present value (NPV), and internal rate of return (IRR) economic parameters are highly favourable. In particular, with the use of this technology, a PRI of 7 years and IRR of 14% are achieved. That the plant is economically viable shows that the use of conventional materials would not represent any significant economic savings compared with the use of materials that have standardized protocols for their recycling, with the consequent reduction in negative environmental impacts.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Terms such as Circular Economy, Sustainability, Renewable Energies, etc., are in common use in the academic, industrial, and political worlds. Their meaning and scope, however, are far from being understood by the general public, and this leads to misconceptions (Geissdoerfer et al., 2017). The concept of the Circular Economy (CE) in particular has recently been receiving much attention both in political circles (Brennan et al., 2015), and on the part of academics (Geissdoerfer et al., 2017).

This concept was introduced by the British economists Pearce and Turner (1989), but the best known definition is that put forward by the Ellen MacArthur Foundation (2013) (Janez Potočník, 2013): “An industrial economy that is restorative or regenerative by intention and design”. With this approach, the concept of waste

disappears, since its components return to form part of natural or industrial cycles with a minimal consumption of energy. The components of the waste that are of organic origin will be biodegraded, while those that are of technological or industrial origin will be reused in a straightforward way and with low energy cost. The essence is one of closing the life cycle of products, i.e., moving from a linear model of the economy (produce, use, and discard) to one that is circular, as of course occurs in nature. The current linear model based on increased production, consumption, and economic growth seems to be coming to an end (Ghisellini et al., 2016; Fischer and Pascucci, 2017). This issue is confirmed by recent European Union (EU) documents, which focus on encouraging recycling and recovery strategies all along the life cycle of a product (Reichel et al., 2016; Elia et al., 2017).

Many case studies have been published showing the benefits of the CE. For example, Fischer and Pascucci (2017) presented the case of material use in the Dutch textile industry. Zhou et al. (2017) used a modification of Material Flow Cost Accounting (MFCA) to study

\* Corresponding author.

E-mail address: [consolis@unex.es](mailto:consolis@unex.es) (C. Sánchez Sánchez).

the CE performance of an iron and steel industry in China. Mathews and Tan (2011) compared the leading environmentally friendly industrial initiatives in China and more advanced countries, finding that in both cases most of the initiatives concerned existing industrial parks or towns, aiming to transform the previously linear value chain to a closed-loop production system. Silva et al. (2017) analysed the policy developments in three case studies of enhanced waste management – Flanders' Sustainable Materials Management Initiative, San Francisco's Zero Waste Program, and Japan's Sound Material-Cycle Society Plan.

As support for the waste products as resources argument grows, decision-makers would benefit from having quantitative tools that could be used to support the scientific evidence basis for their judgements (Park and Chertow, 2014).

Extremadura is a region in southwestern Spain, bordering Portugal, and considered to be one of Europe's natural reserves. Its main economic activities are centred on three sectors: agro-industrial, cultural, and ecotourism. The Regional Government has implemented policies to conserve the natural heritage and environment (Ministry of Agriculture; Rural Development, Environment and Energy, 2015). This document established the Natura 2000 Network – a network of sites of major ecological value that is the main instrument for developing EU policies aimed at ensuring the conservation of biodiversity, with particular attention paid to habitats and to the most threatened species of the flora and fauna. To get an idea of the importance of the Natura 2000 network, suffice it to say that it comprises 1276288.09 ha, constituting 30.6% of the total area of Extremadura.

Swine, cattle, and poultry slaughterhouses form a major part of Extremadura's agri-food sector. These facilities generate large amounts of highly contaminant waste, both liquid (wastewater, blood, sludge, etc.) and solid (bones, entrails, feet, heads, skin, stomach contents, etc.). But most of this waste has the advantage of being biodegradable if the proper techniques are applied for its elimination. Unfortunately however, these techniques are not being used by the firms involved, and the waste is often sent to landfills (Almeida et al., 2012) or, which is worse, in some cases dumped directly into the environment. Some slaughterhouses use the waste to produce compost, but this is not the case for poultry waste because its high nitrogen content would bind organically to the compost, with a consequent negative impact on the environment.

There are, therefore, two important sectors of the economy in Extremadura that are in "confrontation" with each other, one being the meat industry (in particular, that of the production of poultry for human consumption), and the other that concerned with preserving the environment to comply with the regulations of the Natura 2000 Network. We believe that anaerobic digestion (AD) is a good option for solving this problem.

The present work applies the circular economy concept to the decontamination and energy production capacity of using the AD technique to treat the waste from a broiler slaughterhouse located in Extremadura (Spain). We shall not go into the detailed analysis of the complete life cycle of broiler production, but instead focus on quantifying the reduction of fossil energy consumption in the production stage of meat products, i.e., in the stage in which live animals enter and are converted into products suitable for human consumption, since one of the main characteristics of the CE principle is its focus on energy usage.

To this end, we propose the construction of an AD biomethanation plant in a broiler industry located in the Region of Extremadura in order to guarantee, on the one hand, this industry's own thermal energy consumption through the combustion of biogas that the plant generates and, on the other, to offer an alternative to the traditional composting treatment of broiler waste (solid and liquid).

The specific objectives of this case study were: (i) to show the paradigm shift from a traditional linear economy to a circular one in which the use of energy and the preservation of the environment are interrelated and play a main role; (ii) the formation of social and political awareness of the new economy; (iii) to help the CE principle penetrate Extremadura's agroindustrial sector which generates a large amount of highly contaminating biomass waste; (iv) to serve as a model of priorities in regions with large tracts of land in the form of natural reserves; (v) by its teaching and dissemination, to foster R&D + i in this sector; and (vi) to show the economic and environmental feasibility of AD technology.

The paper is organized as follows: Section 2 describes the materials and methods that were used to obtain the experimental results on which the subsequent economic study was based. Section 3 presents the results of the biomethanization of broiler industry waste, considering in particular the optimization of the methane production which allowed us to calculate, size, and project the industrial AD plant. In addition, the materials used in the construction of this plant are briefly reviewed, and some processes are described which allow their reuse or recycling. Finally, Section 4 summarizes the main conclusions of the work.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental setup for aerobic digestion

The AD experiments were carried out in a digester operating in semi-continuous mode. In particular, a given volume of digested sludge was extracted daily from the reactor with a syringe, and that same volume of substrate was immediately restored also by syringe to ensure digestion at constant volume.

An image of the experimental setup is shown in Fig. 1. The rim of a 2 L capacity glass flask is attached to a central tube immersed in the reaction medium. The flask has an input hole through which to introduce the substrate and an output hole to collect the biogas generated in the process. The digestion unit was immersed in a water bath, and maintained at 38 °C by a thermostat equipped with a heating resistor. The substrate inside the main reactor was homogenized continuously by a magnetic stirrer, allowing for complete mixing.

A 5 L tank assembled next to the biodigester was used to determine the volume of methane generated during the AD process. A squeeze bottle containing a sodium hydroxide solution (20% by weight) was placed between the digester and the gas tank so as to retain the carbon dioxide generated during the digestion process.

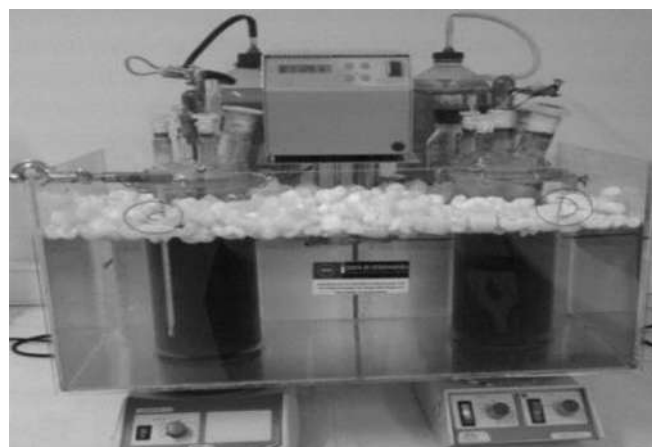


Fig. 1. Two semi-continuous reactors immersed in the same thermal bath.



The methane volumes generated during the experiment displaced water in the tank, which was collected in a measuring cylinder so that the volume of displaced water determined the volume of methane generated in each experiment (Fig. 1).

## 2.2. Preparation of substrate and start-up of the anaerobic digestion process

The substrate to be treated is from a broiler slaughterhouse located in the north of Extremadura. It consists of blood, wastewater (containing some solid waste in suspension), and sludge, without any pretreatment. To initiate the biomethanization process, an inoculum was used that had been acclimated to the target waste in prior laboratory trials.

## 2.3. Analytical methods

Substrate samples were taken in order to quantify total solids (TS), pH, and COD in accordance with the standard methods (APHA et al., 1992). Samples were also taken twice weekly from the anaerobic digester in order to monitor the following parameters: total COD (using Nanocolor<sup>®</sup> Macherey-Nagel kits), volatile fatty acids (VFA), alkalinity, pH, volatile solids in suspension (VSS), and volatile dissolved solids (VDS) (APHA et al., 1992). The above procedure has been followed successfully in various papers published

$$E_{\text{consumed}}(\text{kWh}) = \text{Wastes generated} \left( \frac{\text{m}^3}{\text{year}} \right) \times C_p \times (T_d - T_a) \times 1.60 \quad (2)$$

where  $C_p$  is the specific heat of the substrate which, since the substrate is mainly water, we shall take to be  $C_p = 1.163 \text{ kWh/m}^3\text{K}$ . The factor 1.60 is because we consider heat losses through the surface, floor, and cover of the digester of 60%.

Thus, the energy available,  $E_d$ , for self-consumption in the slaughterhouse will be

$$E_d = E_t - E_{\text{consumed}} \quad (3)$$

## 2.5. Sizing the AD plant

A flow diagram of the proposed AD plant with all the equipment is shown in Fig. 2.

### 2.5.1. Sizing the mixing and feed tank

The substrate is homogenized in the mixing tank whose volume should be sufficient to treat 3 days of substrate. This volume will be increased by 25% for reasons of safety in agitation and aeration.

$$V_{\text{mixing and feed tank}} (\text{m}^3) = \left( \frac{\text{Wastes generated} (\text{m}^3/\text{year})}{\text{days of operation of the plant per year}} \right) \times \text{treatment days} \times 1.25 \quad (4)$$

by our Research Group (González and Cuadros, 2013); (González and Cuadros, 2014); (Moreno et al., 2017).

## 2.4. Estimation of the energy potential

The AD plant was assumed to operate for 8000 h/year (equivalent to 333 days/year), the thermal efficiency of the boiler in which the biogas is burnt would be  $\eta = 0.85$ , and the calorific value of methane is  $10 \text{ kWh/Nm}^3 \text{ CH}_4$ . Therefore, the total thermal energy,  $E_t$ , that would be obtained by burning the biogas generated during a year would be:

$$E_t(\text{kWh}) = \text{Wastes Generated} \left( \frac{\text{m}^3}{\text{year}} \right) \times \text{Methane Production by AD} \left( \frac{\text{Nm}^3 \text{ CH}_4}{\text{m}^3 \text{ substance}} \right) \times \text{Calorific Value of methane} \left( \frac{\text{kWh}}{\text{Nm}^3 \text{ CH}_4} \right) \times \eta \quad (1)$$

The average amounts of waste generated in the broiler industry of this study are  $2340 \text{ m}^3/\text{year}$  of blood and  $156\,000 \text{ m}^3/\text{year}$  of wastewater (washing water and sludge), i.e., a total of  $158\,340 \text{ m}^3/\text{year}$ , and the production of methane measured in laboratory AD trials was  $6.94 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4/\text{m}^3$  of substrate (N stands for normal conditions of pressure and temperature) (See Table 2).

Part of this energy is invested in keeping the digester at the optimal reaction temperature, which was estimated to be  $T_d = 38^\circ\text{C}$ . The region's mean annual ambient temperature is around  $T_a = 15^\circ\text{C}$ , and the energy consumed in this process would be

### 2.5.2. Sizing the digester and its insulation

The useful volume of the anaerobic digester must be such as to allow the waste to be biomethanized within the hydraulic retention time (HRT) that gave the best results in the laboratory trials:

$$V_{\text{reactor}} (\text{m}^3) = \left( \frac{\text{Wastes generated} (\text{m}^3/\text{year})}{\text{days of operation of the plant per year}} \right) \times \text{HRT} \times 1.25 \quad (5)$$

in which a 25% safety buffer has been added.

In order to calculate the area of insulation necessary to cover the walls and the floor of the digester, as well as the top if the gasometer is external, it is necessary to start from the reactor's dimensions. As a general rule, anaerobic digesters are usually wider than they are tall so as to favour perfect mixing.

$$\text{Wall insulation} (\text{m}^2) = h \times D \times \pi \quad (6)$$

where  $h$  (m) and  $D$  (m) are the height and diameter of the digester, respectively.

$$\text{Floor insulation} (\text{m}^2) = \pi \times r^2 \quad (7)$$

where  $r$  (m) is the radius of the digester.

### 2.5.3. Sizing the digestate storage tank

For safety reasons, the digestate (effluent) tank has to have

Pump	-	-
Boiler	-	-
Gasometer	35% of biogas production	Continuous
Mixer	-	-
Solid-Liquid Separator	1 day	Discontinuous (8 hours)
Feed Tank	3 days	Continuous
Mud Tank	-	-
Blood Tank	-	-
Effluent Tank	2 days	Continuous

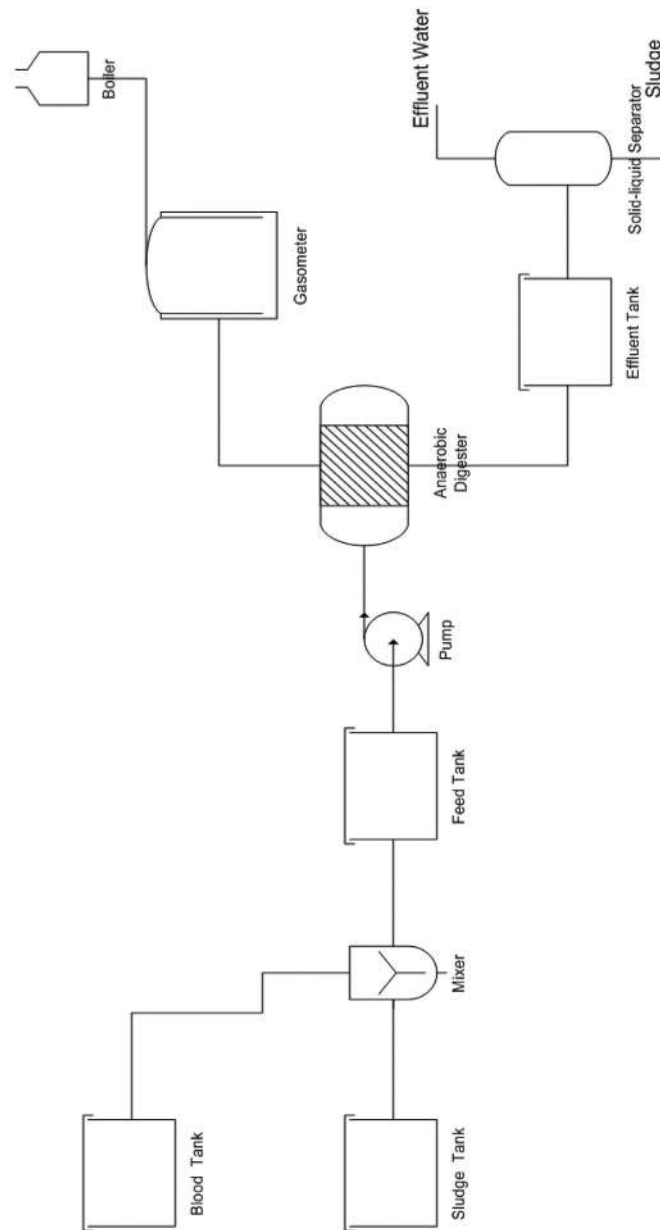


Fig. 2. Flow diagram of the AD plant design.

sufficient volume to store two days of the effluent generated in the AD plant.

$$V_{\text{digestate tank}} (\text{m}^3) = \text{days of storing the effluent} \times \left( \frac{\text{Wastes generated} (\text{m}^3/\text{year})}{\text{days of operation of the plant per year}} \right) \quad (8)$$

#### 2.5.4. Sizing the solid-liquid separator

The digestate has to be separated into two fractions: liquid and solid. The separator is designed to have the capacity to treat 1 day's digestate every 8 h. So, the separator volume will be:

$$V_{\text{separator}} (\text{m}^3) = \left( \frac{\text{Wastes generated} (\text{m}^3/\text{year})}{\text{days of operation of the plant per year}} \right) / 3 \quad (9)$$

#### 2.5.5. Gasometer sizing

The AD plant's design is for the biogas produced to be burnt in a boiler to provide the hot water needed for the operations that take place in the slaughterhouse itself. Since not all the biogas produced is consumed instantaneously, the excess must be stored in a gasometer. In our case, this is designed to store 35% of the daily biogas production ( $11.89 \text{ Nm}^3 \text{ biogas/m}^3 \text{ substrate}$ . See Table 2). The volume of the gasometer will then be:

$$V_{\text{gasometer}} (\text{m}^3) = \text{biogas production by AD} (\text{Nm}^3 \text{ biogas/day}) \times 0.35 \quad (10)$$

### 2.6. Economic feasibility of the AD plant

#### 2.6.1. Installation costs

These include construction costs, costs of the AD plant's materials and equipment, administrative costs (authorizations and building permits), and other costs such as safety items, economic feasibility study and industrial advice, and those relating to commissioning.

#### 2.6.2. Total investment

In order to evaluate the total economic investment in the AD plant, we took into account Decree 169/2016, dated October 18 (Ministry of Economy and Infrastructure, 2016). This establishes a maximum subsidy to this type of project of € 300 000. We also considered that the promoter will request a bank loan equal to 75% of the total cost of the plant, with the promoter's own contribution being 25%.

#### 2.6.3. Annual outlay

The annual operating and maintenance costs (reception, handling, and control of the input waste, equipment repair and replacement, administrative management, preventive maintenance of the plant, etc.) we take to be 1% of the total cost of the plant.

For the bank loan amortization, we assume the loan requested to be for 15 years, at a mean interest rate of 2.5%. The plant's useful life is taken to be from 25 to 30 years.

#### 2.6.4. Annual revenue

This amount comes from the industry's annual fossil fuel savings. This industry currently uses fuel oil with a mean price in Spain on 03/21/2017 of 0.810 €/L (Ministry of Industry, Energy and Tourism, 2017).

#### 2.6.5. Economic parameters

Period of return on investment (PRI), net present value (NPV), and internal rate of return (IRR).

## 3. Results and discussion

### 3.1. HRT and maximum methane production

The substrate to be treated in this work consists of 1.5% blood, 86.2% wastewater, and 12.3% sludge from an industrial broiler slaughterhouse in the Extremadura region. Table 1 lists the values of this substrate's characteristic parameters.

In previous, long-duration, laboratory trials of AD (Fig. 1) it was found that, at a constant 38 °C temperature, the maximum substrate flow rate allowed by a 2-L digester without inhibition of the biochemical reaction was 0.160 L/day. This gives a value of HRT = 12.5 days. As we shall be conservative in later calculations, we will take a value of HRT = 13 days.

The evolution of the biogas production is shown in Fig. 3. It shows that there are two distinct phases. One corresponds to the stabilization of the biochemical reaction, and the other to the stationary phase.

Table 2 presents the values of the digested effluent's characteristic parameters and the biogas productions  $P_{\text{biogas}} = 11.89 \text{ Nm}^3 \text{ biogas/m}^3$ . As the inflow of waste to be treated is  $475.5 \text{ m}^3/\text{day}$ , the biogas production obtained is  $P_{\text{biogas}} = 5653.7 \text{ Nm}^3/\text{day}$  (Eq. (10)). The percentage of methane in the biogas = 58.37%, and the net methane production is  $P_{\text{CH}_4} = 6.94 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4/\text{m}^3$  of substrate. The COD reduction due to the biodigestion of the waste is  $(24.76 \pm 21.01) \%$  (Table 2).

Given the organic nature of the waste of a broiler industry (wastewater, blood, sludge, bones, entrails, feet, heads, skin, stomach contents, etc.), its waste disposal and subsequent natural decomposition generate greenhouse gases, mainly carbon dioxide and methane. Considering that the ratios of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> obtained from the AD are the same as those which would occur through natural decomposition (and disregarding the effect of the other trace gases obtained from the AD), it is possible to quantify the positive environmental effect due to the reduction of greenhouse gases that the construction of an anaerobic digestion plant would facilitate (González and Cuadros, 2014); (González and Cuadros,

**Table 1**

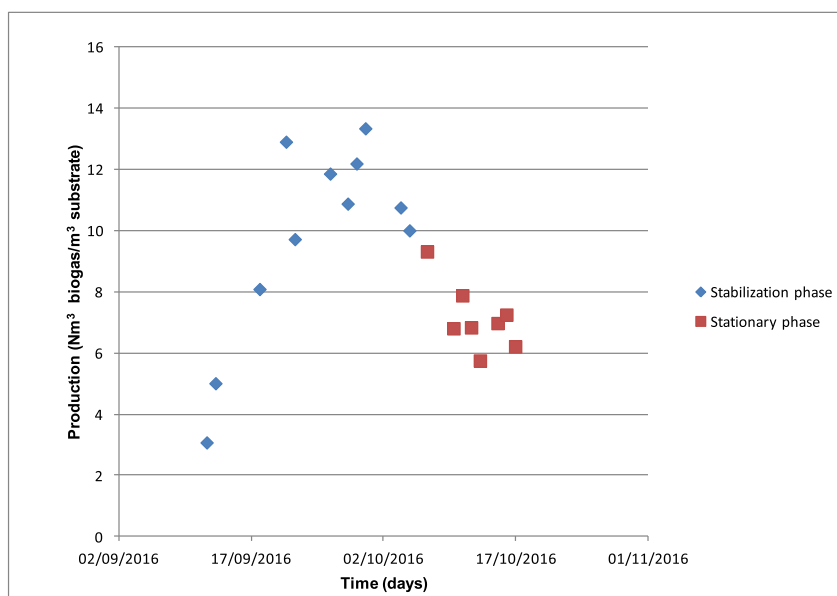
Characterization of the waste feedstock used in this work (TSS, total solids in suspension; MSS, mineral solids in suspension; TDS, total dissolved solids; MDS, mineral dissolved solids; other abbreviations defined in the text).

	Substrate	
	Mean	S.D.
pH	6.50	0.22
VFA (g CH <sub>3</sub> COOH/L)	1.51	0.81
Alkalinity (g CaCO <sub>3</sub> /L)	1.23	0.38
Total COD (g O <sub>2</sub> /L)	21.56	0.42
Kjeldahl nitrogen (g/L)	1.01	0.26
TSS (g/L)	5.10	2.21
MSS (g/L)	0.22	0.11
TDS (g/L)	5.95	4.64
VSS (g/L)	5.10	1.56
MDS (g/L)	0.23	0.16
VDS (g/L)	5.73	4.62

**Table 2**

Characterization of the digestate and biogas production (OLR, organic loading rate; other abbreviations defined in the text).

OLR (COD [g O <sub>2</sub> /L] per day)		1.68
HRT (days)		13.00
pH	Mean	7.63
	S.D.	0.10
VFA (g CH <sub>3</sub> COOH/L)	Mean	0.49
	S.D.	5.21
Alkalinity (g CaCO <sub>3</sub> /L)	Mean	3.68
	S.D.	0.39
VDS (g/L)	Mean	1.50
VSS (g/L)	S.D.	0.48
	Mean	7.03
COD <sub>total</sub> (g O <sub>2</sub> /L)	S.D.	2.31
	Mean	17.29
COD reduction (%)	S.D.	4.72
	Mean	24.76
Nm <sup>3</sup> methane/m <sup>3</sup> substrate	S.D.	21.01
	Mean	6.94
Nm <sup>3</sup> biogas/m <sup>3</sup> substrate	S.D.	2.64
	Mean	11.89
% CH <sub>4</sub>	S.D.	4.53
	Mean	58.37
% CO <sub>2</sub>	S.D.	14.10
	Mean	19.77
% O <sub>2</sub>	S.D.	5.21
	Mean	4.10
H <sub>2</sub> S (ppm)	S.D.	3.44
	Mean	122.67
	S.D.	63.13

**Fig. 3.** Evolution of the biogas production (HRT = 13 days).

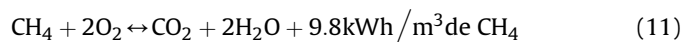
2013).

As can be deduced from Table 2, the AD of 158 340 m<sup>3</sup> of substrate/year will generate 1 098 879 Nm<sup>3</sup> of CH<sub>4</sub>/year and 525 689 Nm<sup>3</sup> of CO<sub>2</sub>/year. Taking into account the normal densities of CH<sub>4</sub> (0.680 kg/m<sup>3</sup>) and CO<sub>2</sub> (1.870 kg/m<sup>3</sup>) and the molecular masses of CH<sub>4</sub> (16 kg/kmol) and CO<sub>2</sub> (44 kg/kmol), the total tonnage of the two substances can be obtained as well as the total moles that are produced in such a plant. The results are 747.24 tonnes of CH<sub>4</sub> (corresponding to 46 577 kmol of CH<sub>4</sub>) and 967.27 tonnes of CO<sub>2</sub> (corresponding to 21 978 kmol of CO<sub>2</sub>). The same amounts would be released into the atmosphere if degradation were natural.

As reported in IPCC (2004), CH<sub>4</sub> can be considered about 28

times more active in producing the greenhouse effect than CO<sub>2</sub>. Thus, taking this relative equivalence of the two gases into account and adding their contributions, one obtains a total of 21 890 tonnes of CO<sub>2</sub> equivalent would be emitted through the natural decomposition of this waste.

With this biogas burnt in a boiler, as proposed in the present work, the combustion of the methane would give:



Of course, the content (%) of CO<sub>2</sub> of the biogas is not taken into account in the combustion reaction, since this gas is a product of

that reaction and has no calorific value. According to Eq. (11), the combustion of 46 577 kmol of CH<sub>4</sub> generates 46 577 kmol of CO<sub>2</sub>, i.e. 2050 tonnes of CO<sub>2</sub>. If the CO<sub>2</sub> content of the biogas (967.27 tonnes of CO<sub>2</sub>) is added to this quantity, 3017 total tonnes of CO<sub>2</sub> equivalent would be obtained.

Comparing the two results, i.e., the emission of the equivalent tonnes of CO<sub>2</sub> due to the natural decomposition of the waste of this industry (21 890 tonnes) and that corresponding to the combustion of the biogas generated in the DA of the said waste (3017 tonnes), one sees that this latter option would reduce equivalent CO<sub>2</sub> emissions by a factor of 7.25 (a total reduction of 18 873 tonnes of CO<sub>2</sub> equivalent).

Also, the liquid fraction (wastewater) of the digestate coming from the separator can be reused, provided that it complies with the regulations set out in Royal Decree 1620/2007, dated December 7 (Ministry of the Presidency, 2007) establishing the legal regime for the reuse of wastewater, and determining the quality demanded of recovered water according to its intended use. In this case, the wastewater can be used for irrigating crops with whose fruit it does not come into contact, or it can be discharged into the municipal sewerage system. The solid fraction coming from the separator can be used for composting in accordance with Regulation 1774/2002/CE, dated October 3, 2002, establishing the sanitary norms applicable to animal by-products not destined for human consumption.

Although such compost is a material with a good market, in the economic study that will be described below, possible revenues coming from its sale have not been taken into account.

### 3.2. Estimated budget for the biogas plant

Table 3 lists the dimensions of the elements and equipment constituting the AD plant. The design is to treat an annual inflow of 158 340 m<sup>3</sup> of waste from a broiler slaughterhouse (475.5 m<sup>3</sup> of waste/day), with HRT = 13 days, and biogas production of 235.6 Nm<sup>3</sup> biogas/h.

Table 4 presents the estimated costs of the equipment and engineering studies required for the construction of the planned plant. The total cost of the plant is estimated at € 1 154 941 (VAT not included). In this cost estimate, the following assumptions have been made: (i) a safety margin of 5% has been included in the calculations; (ii) the HRT considered is slightly longer than the calculated value; (iii) the costs of engineering and development, start-up, and digestate post-treatment have been included, which is not normally the case in costing civil works; and (iv) the boiler currently used by the broiler industry, which uses fuel oil, is not replaced, only the burner. If one subtracts these extra costs, the budgeted estimate for the plant would be € 1 013 244.

Bauer et al. (2013) estimate that, for this biogas flow, the specific investment costs of an AD plant are between € 3000 and € 4600 per Nm<sup>3</sup> biogas/h. The projected plant would then have a cost of

**Table 3**  
Dimensions of the elements constituting the AD plant.

Equipment	Characteristics		
Blood tank	Volume	20	m <sup>3</sup>
Sludge tank	Volume	1200	m <sup>3</sup>
Feed tank	Volume	1800	m <sup>3</sup>
Anaerobic reactor	Volume	8000	m <sup>3</sup>
	Height	16.3	m
	Diameter	25	m
	Wall insulation	1280	m <sup>2</sup>
	Floor insulation	490.9	m <sup>2</sup>
Effluent tank	Volume	1200	m <sup>3</sup>
Solid-liquid separator	Volume	60	m <sup>3</sup>
Gasometer	Volume	1800	m <sup>3</sup>

**Table 4**

Estimated costs of the equipment and actions to be carried out for the construction and start-up of the AD plant.

	Description	Total
1	Engineering and developmen	23 000 €
2	Substrate storage	164 850 €
3	Primary digester	630 800 €
4	Substrate's pumping system	30 135 €
5	Canalization and conditioning of biogas	34 597 €
6	Change boiler burner	11 109 €
7	Effluent storage	122 600 €
8	Heat distribution system	13 375 €
9	Control and automation box/electrical installation	40 425 €
10	Building and Engineering	10 500 €
11	Start up	24 150 €
12	Security and health elements	12 600 €
13	Effluent pos-treatment: Separator	36 800 €
Total price of biogas plant without IVA		1 154 941 €

between € 706 800 and € 1 083 760. This is coherent with our estimated cost.

Table 5 lists the parameters related to the economic feasibility of the plant. In particular, one observes that PRI = 7 years, NPV = € 2 894 685, and IRR = 14%, values that are indicative that the projected plant is indeed economically viable.

### 3.3. Reuse and recycling of the constituent parts of the AD plant

One of the objectives that we are proposing in this work is to contribute to the paradigm shift from a traditional linear economy to a circular one in which the use of energy and the preservation of the environment are interrelated. The use of reusable and/or recyclable materials in the construction of these plants also helps to further close the environmental cycle. As can be seen in Table 4, the components that are currently being used in the construction of an AD plant are for the most part manufactured using steel, iron, concrete, anticorrosive paint, polyurethane thermal insulation, and PVC and HDPE pipes and other elements. All of these materials have standardized protocols for their recycling once the AD plant shall have reached the end of its service life.

Steel, for instance, is one of the main materials used in manufacturing the components of an AD plant. It has two important advantages: reducing the amount of material need for the construction of the plant, and the ease with which steel components can be effectively reused, remanufactured, or recycled. Over the past 50 years, the steel industry has invested in research and technology to create new grades of advanced and ultra-high-strength steels. In this same period, these grades have reduced the weight of many steel applications by up to 40%, this reduction has led to lowering energy consumption by 60% per tonne of steel (Worldsteel Association, 1967), and is thus an integral part of a circular economy. Another aspect of steel use is that almost every by-product of steelmaking is used in new products. This minimizes the amount of waste sent to landfill, reduces emissions, and preserves raw materials.

The recycling process is also fundamental for the circular economy. Steel has been recycled ever since it was first made. All available steel scrap is recycled over and over again to create new steel products in a closed material loop. Recycled steel maintains the inherent properties of the original steel. Recycled concrete is made of coarse aggregate from crushed concrete waste at a recommended 20% dose rate. With this limitation, the final properties of the recycled concrete are hardly differentiable from those of conventional concrete (Ministry of Development, 2017).

Regarding the paintwork, it is recommended that long-lasting, biodegradable, anticorrosive paints be used. For the thermal



**Table 5**  
Economic feasibility of the AD plant.

Data	Substrate to process (m <sup>3</sup> /year)	158 340
	Methane production (m <sup>3</sup> methane/m <sup>3</sup> substrate)	6.94
	Biogas production (m <sup>3</sup> biogas/m <sup>3</sup> substrate)	11.89
Production	Thermal power (kW)	1144
	Total energy (kWh)	9 153 922
	Energy consumed by plant (kWh)	6 817 487
	Net available energy (kWh)	2 336 435
Biogas plant cost	Total installation cost (€)	1 154 941
Annual costs	Operating and maintenance costs (€)	11 078
	Amortization (€)	13 518
	Total annual expenses (€)	24 596
Total revenue	Annual saving of thermal energy (€)	227 077
	Annual income (€)	202 481
Economic ratios	PRI (years)	7
	NPV (€)	2 894 685
	IRR (%)	14%

insulation of the digester, it is advisable to use polyurethane foam due to its proven durability and resistance against the absorption of moisture. At decommissioning, the polyurethane foam can be reused in covering façades, as raw material in the manufacture of window frames, partitions, and doors, in packaging material, etc.

Finally, for the various pipes and fittings between the different components of the AD plant, it is proposed to use PVC and HDPE materials. Its ease of transformation and thermoplasticity make the (mechanical, chemical, thermal, or solvent-based) recycling of PVC technically and economically viable. HDPE is recycled by mechanical crushing or grinding, followed by an extrusion process in which the plastic is converted into a pellet of similar quality to the virgin material, which is then processed by different techniques. Due to their high calorific values, another viable option for both PVC and HDPE is to use them for energy production by combustion.

Table 5 lists the parameters related to the AD plant's economic feasibility with sustainable materials being used. That the plant is economically viable shows that the use of conventional materials would not represent any significant economic savings compared with the use of materials that have standardized protocols for their recycling, with the consequent reduction in negative environmental impacts (energy expenditure and CO<sub>2</sub> emissions).

#### 4. Conclusions

A large number of AD trials were carried out at the laboratory scale, allowing us to determine the optimal HRT for the treatment of waste from a meat industry located in the Autonomous Community of Extremadura (Spain). Taking into account the results of those trials as described in the present work, the following conclusions can be drawn:

1. The optimal HRT for the anaerobic treatment (biodigestion) of 158 340 m<sup>3</sup> of annual waste from a broiler slaughterhouse (475.5 m<sup>3</sup> of waste/day) is 13 days.
2. The biogas production obtained was 11.89 Nm<sup>3</sup> biogas/m<sup>3</sup> of slaughterhouse waste, with the methane fraction being 58.37%. The net methane production is thus 6.94 Nm<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/m<sup>3</sup> of substrate. The mean biogas outflow is 235.6 Nm<sup>3</sup> biogas/h.
3. This biogas production rate yields an annual useful thermal energy output of 2 336 435 kWh, equivalent to replacing 233 643.5 L of fuel oil. This energy is sufficient to cover the industry's annual heating needs, and generates savings of about € 202 481/year assuming a current fuel oil cost of € 0.810/L and a 2% average annual price increase.
4. The estimated total cost of the plant is € 1 154 941 (VAT not included). Despite this high cost, the economic analysis showed

that the construction of the AD plant would be economically profitable. In particular, the economic parameters of the project supporting this conclusion were: PRI = 7 years, IRR = 14% and NPV = € 2 894 685.

5. The project is also environmentally viable. Indeed, the reduction in COD due to the biodigestion of these wastes is (24.76 ± 21.01)%. The subsequent separation of the liquid and solid fractions of the digestate allows their respective COD values to be reduced to limits compatible with current environmental legislation. Also, the building materials used in the plant are easily reusable or recyclable, demonstrating that this case study is a good example of CE.
6. The use in the poultry industry of the biogas generated in the projected AD plant as self-consumption fuel would avoid the emission of 18 873 tonnes/year of CO<sub>2</sub> equivalent.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to the Regional Government of Extremadura and the European Union (FEDER Funds) for the financial support granted to this work through Project GR15146.

#### REFERENCES

- Almeida, P.F., Salles, J.A.A., Farias, T.M.B., Curvelo, S.J.C., 2012. Aprovechamiento de patas de pollo como alternativa para disminuir residuos generados en los mataderos. *Inf. Tecnol.* 23, 4.
- APHA, AWWA, WPCF, 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, nineteenth ed. Washington DC, USA.
- Bauer, F., Hulteberg, C., Persson, T., Tamm, D., 2013. *Biogas Upgrading- Review of Commercial Technologies*.
- Brennan, G., Tennant, M., Blomsma, F., 2015. Business and production solutions: closing the loop. In: Kopnina, H., Shoreman-Ouimet, E. (Eds.), *Sustainability: Key Issues*. E- Publishing Inc., EarthScan, Routledge, pp. 219–239.
- Elia, V., Gnoni, M.G., Tornese, F., 2017. Measuring circular economy strategies through index methods: a critical analysis. *J. Clean. Prod.* 142 (4), 2741–2751.
- Fischer, A., Pascucci, S., 2017. Institutional incentives in circular economy transition: the case of material use in the Dutch textile industry. *J. Clean. Prod.* 155 (2), 17–32.
- Geissdoerfer, M., Savaget, P., Bocken, N.M.P., Hultink, E.J., 2017. The Circular Economy—A new sustainability paradigm? *J. Clean. Prod.* 143, 757–768.
- Ghisellini, P., Cialani, C., Ulgiati, S., 2016. A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *J. Clean. Prod.* 114, 11–32.
- González, A., Cuadros, F., 2013. Continuous biomethanization of agrifood industry waste: a case study in Spain. *Process Biochem.* 48, 920–925.
- González, A., Cuadros, F., 2014. Optimal and cost-effective industrial biomethanation of tobacco. *Renew. Energy* 63, 280–285.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), 2004. [https://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/ar4/wg1/en/ch2s2-10-2.html](https://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg1/en/ch2s2-10-2.html).
- Mathews, John A., Tan, H., 2011. Progress toward a circular economy in China. *J. Ind. Ecol.* 15 (3), 435–457.
- Ministry of Agriculture, Rural Development, Environment and Energy, 2015. Decree 110/2015, dated May 18, of the Regional Government of Extremadura. <http://>

- doe.gobex.es/pdfs/doe/2015/1050o/15040122.pdf.
- Ministry of Development, 2017 (Annex 15). <https://www.fomento.gob.es/NR/rdonlyres/BC8AD664-127D-4CEF-AD59-0A221BE54FA2/37439/Anejo15borde.pdf>.
- Ministry of Economy and Infrastructure, 2016. Decree 169/2016, dated October 18, of the Regional Government of Extremadura, 2016. <http://doe.gobex.es/pdfs/doe/2016/2040o/16040194.pdf>.
- Ministry of Industry, Energy and Tourism, 2017. <http://www.dieselogasolina.com/precio-del-gasoi-o-gasoleo-de-cafeccion.html> (Accessed 12 June 2017).
- Ministry of the Presidency, 2007. Royal Decree 1620/2007, dated December 7. <https://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf>.
- Moreno, L., Gonzalez, A., Cuadros-Salcedo, F., Cuadros-Blazquez, F., 2017. Feasibility of a novel use for agroindustrial biogas. *J. Clean. Prod.* 144, 48–56.
- Park, J.Y., Chertow, M.R., 2014. Establishing and testing the “reuse potential” indicator for managing wastes as resources. *J. Environ. Manag.* 137, 45–53.
- Pearce, D.W., Turner, R.K., 1989. *Economics of Natural Resources and the Environment*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Potočník, J., 2013. *Towards the Circular Economy - Economic and Business Rationale for an Accelerated Transition*. Ellen MacArthur Foundation.
- Reichel, A., Schoenmakere, M., Gillabel, J., 2016. *Circular Economy in Europe-Developing the Knowledge Base*. EuropeanEnvironmental Agency (EEA).
- Silva, A., Rosano, M., Stocker, L., Gorissen, L., 2017. From waste to sustainable materials management: three case studies of the transition journey. *Waste Manag.* 61, 547–557.
- Worldsteel Association, 1967. <http://circulareconomy-worldsteel.org/>(Accessed 12 June 2017).
- Zhou, Z., Zhao, W., Chen, X., Zeng, H., 2017. MFCA extension from a circular economy perspective: model modifications and case study. *J. Clean. Prod.* 149, 110–125.





# ANEXO II

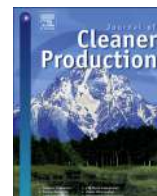
## Referencia

Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo, Francisco Cuadros Blázquez. 2018. Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura (Spain). *Journal of Cleaner Production* 198, 1165–1172. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.07.079.

## Derechos de autor

No es necesario el permiso de la editorial. Como autor de un artículo publicado en una revista de Elsevier, conserva el derecho de incluirlo en una tesis o disertación, siempre que no se publique comercialmente. La publicación formal del artículo puede encontrarse a través del siguiente enlace: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.079>.





## Using low-cost porous materials to increase biogas production: A case study in Extremadura (Spain)

Consolación Sánchez-Sánchez<sup>a,\*</sup>, Almudena González-González<sup>b</sup>,  
Francisco Cuadros-Salcedo<sup>b</sup>, Francisco Cuadros-Blázquez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Applied Physics, School of Agricultural Engineering, University of Extremadura, Avda. de Elvas s/n. 06006, Badajoz, Spain

<sup>b</sup> Metanogenia S.L. Edificio Biodiversidad, Campus Universitario, Avda. de Elvas s/n. 06006, Badajoz, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 September 2017

Received in revised form

5 July 2018

Accepted 9 July 2018

Available online 12 July 2018

#### Keywords:

Porous material

Anaerobic co-digestion

Energy viability

Economic viability

Environmental viability

### ABSTRACT

This study presents the effect of certain porous materials on the production of biogas from the anaerobic co-digestion of a mix of sheep manure (20 wt.%) and cheese whey (80 wt.%). These porous materials are custom-made from recycling agricultural and forestry wastes - almond shells, walnut shells, kenaf fibre, and charcoal. The manufacturing cost is therefore low. They are crushed and sieved, and then fed into the bioreactor to form a fixed bed in order to make a greater surface available for bacterial adhesion, and thus increase the microbial population in the reaction medium. The ultimate objective is to increase biogas production, i.e., to maximize the energy yielded by the codigestion of this mixture. The conclusion drawn from the results of the study was that the greatest long-term (for reaction times over 168 days) biogas production is obtained when using charcoal as the porous material. There was a 27.82% increase in methane (CH<sub>4</sub>) production compared with the biomethanization of the mixture without any porous material in the reactor (control experiment), and a 50% reduction in chemical oxygen demand (COD). The study of the economic viability of an industrial plant, based on previous results, showed that the period of return on investment (PRI), net present value (NPV), and internal rate of return (IRR) economic parameters are highly favourable. In particular, with the use of charcoal, a PRI of 8 years and an IRR of 10% are achieved.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The agricultural food industry is one of main branch of the manufacturing sector in Extremadura. Overall, the agricultural food complex, comprising of the primary sector (agriculture and livestock) and the agri-food industry, represents 10.83% of Extremadura's total gross value added (GVA) (Alba International Group, 2014).

Of all the livestock sub-sectors, the dairy sub-sector is second in importance after swine. In Extremadura, according to data of the Interprofessional Dairy Organization (2015), the dairy industry increased by 9.1% over the previous year. The most consumed dairy products were yoghurt and other fermented milks (680 million kg), cheese (347 million kg), ice cream (126 million kg), and milk shakes (116 million kg).

Cheese whey is a greenish-yellow liquid resulting from the

coagulation and removal of milk casein in the cheesemaking process (Brown et al., 2016). It is the most contaminating waste generated in the production of cheese (Rajeshwari et al., 2000). It accounts for about 85–95% of the milk's volume, and retains 55% of milk nutrients, i.e., on average 10 L of milk generates approximately 1 kg of cheese and 9 L of cheese whey (Jelen and Tossavainen, 2003). For these reasons, making use of cheese whey has been the subject of much research.

In the past, most cheese factories disposed of their effluents without any pretreatment into landfills or by direct discharge into receiving waters (rivers, lakes, the sea, etc.). Other less dramatic solutions involved the construction of storage tanks or ponds, discharge into municipal sewage systems, use as animal feed, and dilution by mixing with less polluting effluents such as domestic wastewater (Gannoun et al., 2008; Minhalmá et al., 2007). These alternatives, however, are not sufficiently attractive, especially for small-to-medium factories because management of the cheese effluent can become a major challenge due to strict legal requirements (Farizoglu et al., 2007; Mawson, 1994).

\* Corresponding author.

E-mail address: [consolis@unex.es](mailto:consolis@unex.es) (C. Sánchez-Sánchez).

Currently about 50% of the total world production of cheese whey is treated and processed into various food products. According Panesar et al. (2007) 45% is used directly in liquid form, 30% in the form of powdered cheese whey, 15% as lactose and as delactosed by-products, and the rest as cheese protein concentrates. In contrast, the other half of the world production of cheese whey remains untreated, but is still discarded as effluent (Aider et al., 2009; Fernandes et al., 2009).

At the same time, dairy industries consume much energy, and the cost of fossil fuels is rising. It is therefore important for these industries' bottom line that they reduce their consumption of conventional energy sources.

In this work, anaerobic digestion (AD) is presented as an effective approach to the controlled elimination of waste in dairy industries as it allows them both to manage the waste appropriately and to get value out of it. In particular, the process can contribute to their self-consumption of energy through the use of the biogas obtained by biomethanization of the waste they produce, at the same time as resolving the serious environmental problem that uncontrolled dumping of this type of waste would lead to.

Although the production of biogas through anaerobic digestion has been a well-established technology for some decades, there is still a need to optimize this process in terms of process stability, higher methane yields (Prazeres et al., 2012), and inhibition problems (Chen et al., 2008). There have been some studies of various alternative proposals. For instance, Kratky and Jirout (2011) used mechanical extrusion pretreatment and colloid milling to reduce the biomass size, and thus increase the accessible surface area. The decrease in cellulose crystallinity improved the digestibility and conversion of saccharides during hydrolysis, thus improving the production of biogas. Maroušek (2013a, 2013b) states that the best commercially available technology to significantly improve biogas yields may be to increase the reaction space by steam explosion. The rapid pressure change involved in this technology results in cavitation of the plant cell walls, and consequent deep intracellular disintegration. This naturally leads to a dramatic increase in the reaction surface area, and better availability of the cellulose for hydrolysis into easily fermentable particles for subsequent biotechnological utilization.

These methods are very expensive, however, and, on a commercial scale, consume approximately 33% of the total electrical demand. Furthermore, in comparison with non-pretreated biomass, the steam-exploded lignocellulose becomes more sensitive in terms of temperature, inhibitors, and nutrient availability during the subsequent anaerobic fermentation. This carries high risks and new challenges for the management of the process (Maroušek et al., 2014).

A traditional way of increasing the energy yield of AD is to put porous materials into the digester in order to increase the surface available for bacterial adhesion and thus increase the population of microorganisms. Some materials that have been used for this purpose are activated carbon, zeolite, bentonite, mineral wool, polyurethane, polyacrylate, polyethylene, and even straw as a biofilm carrier (Ward et al., 2008). In all cases, the pore size distribution (porosity) and the pore size of the supporting medium are determining factors since these pores must be of a size suitable for colonization by the methanogenic bacteria population (whose size is about 1 µm per bacterium cell). The quantity, shape, and disposition of the material inside the reactor are also important since they have been shown to affect the population of fixed bacteria (Guo et al., 2015; Yang et al., 2004).

The common problem of all these products that increase the surface available for bacterial adhesion is that their high costs are prohibitive for application in industrial scale AD plants.

In recent years, considerable attention has been paid to the

potential use of carbon-rich materials for soil amendment and for long-term carbon storage (Lehmann, 2007; Schmidt et al., 2014). It is hoped that these materials, produced by the thermochemical conversion of biomass and known as biochars, can increase soils' water and plant nutrient storage capacity, reduce greenhouse gas emissions, and improve crop yields (Lehmann et al., 2009; Maroušek et al., 2017). However, their relatively high costs constitute a major drawback impeding their broader use (Libra et al., 2011; Roberts et al., 2010).

One possibility to overcome this constraint is to aim to add value by expanding the biochar value chain. An example might be to use the biochars as additive in anaerobic digestion. This has been reported to increase the yield of biogas (Desai and Madamwar, 1994; Geeta et al., 1986; Kumar et al., 1987). It would speculate that the higher yields were caused by biofilm formation on the particle surfaces, and, based on a review of the literature, it appears likely to us that biochars may indeed be an effective additive to enhance biogas production.

It can be concluded from the work of Mumme et al. (2014) and Torri and Fabbri (2014) that biochars possess the capacity to catalyse anaerobic digestion by mitigating the mild ammonia inhibition and to support *archaeal* growth, apart from the methanization of their own labile carbon.

It should be borne in mind, however, that those experiments were conducted either in syringe reactors (100 mL) using synthetic wastewater, or only for short hydraulic retention times (Shen et al., 2016). The objective of the present study was to apply this concept using "real" sludge in bench-scale reactors (2000 mL) for long hydraulic retention times in order to increase the production and methane content of biogas. As well as charcoal, another three porous materials from agroindustrial and forestry waste also tested which require only simple and low-cost pretreatment:

- Almond shells: This waste results from the industrial processing of almonds to obtain the edible seed, and which represents 20% of the total raw material weight. In Spain, in the 2011–12 almond production year, production of the "shell" by-product was 216 000 t (Ministry of Agriculture and Fisheries, Food and Environment, 2011–2012). The physicochemical characteristics of two types of almond shells (fine and coarse) are listed in Table 1 (Urrestarazu et al., 2005).
- Walnut shells: This is a by-product of the production of edible walnuts. Global production is approximately 1 100 000 units. China and the United States are the main producing countries, with about 45% and 30% of the total, respectively. The physicochemical properties of walnut shells are listed in Table 2 (Romero-Arenas et al., 2012).
- Kenaf fibre: the kenaf plant contains coarser, moderately long fibres in the outer layer of the stem, and finer, short fibres in the core (Pande and Roy, 1998). World trade in kenaf is becoming

**Table 1**  
Properties of two types of almond shells.

Parameter or Property	Fine	Coarse
Bulk density (g/cm <sup>3</sup> )	0.40	0.40
Total pore space (vol.%)	71.00	72.00
Air capacity (vol.%)	40.00	36.90
Readily available water (vol.%)	1.20	1.20
Water buffering capacity (vol.%)	2.60	4.70
Total water-holding capacity (mL/L)	194	188.00
Shrinkage (%)	12.30	10.00
Wettability (minutes)	0.36	0.54
pH	5.20	5.09
Electrical conductivity (dS/m)	2.70	2.44
Organic matter content (wt.% dry basis)	98.90	99.00

**Table 2**  
Physicochemical properties of walnut shells.

Hardness (Mohs)	2.50
Density (kg/L)	0.95
pH	7
Combustion temperature (°C)	>270
Colour	Brown
Organic Material (%)	6.99

increasingly important since it has gone from being a crop used only for manufacturing sacks for packaging of agricultural and industrial products to now having many industrial uses. Among the properties of its fibres there stand out its porosity, resistance, and elasticity.

- **Charcoal:** This is a solid, brittle, and porous combustible material with a high carbon content (about 98%). Its gross calorific value (HHV) is in the range 29 000–35 000 kJ/kg dry basis. In Extremadura (a region located in the west of Spain, bordering with Portugal), charcoal is produced artisanally through the pyrolysis of woody wastes from pruning holm oaks. The holm oak is a tree that is the main plant component of the ecosystem called “dehesa” which is representative of this Spanish region. Fig. 1 is a photograph of a typical Extremadura artisanal kiln for the production of charcoal from holm oak prunings. Charcoal has great porosity and a high adsorption capacity. Its main characteristics are summarized in Table 3 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014).

The specific objectives of this study were: (i) to determine which of the tested materials is optimal regarding the environmental decontamination and biogas production in the biomethanization of a mix of cheese whey and sheep manure; (ii) to determine the amount and the particle size of the selected material to be put into

the biodigester; (iii) to establish the maximum time that the porous material should remain in the biodigester without losing its adherent activity; (iv) to estimate the costs of the industrial use of the selected porous material; (v) to extrapolate the laboratory results to the case of a real industrial plant; (vi) to determine the economic viability of this industrial plant.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental setup for anaerobic digestion

The AD experiments were carried out in a main digester operating in semi-continuous mode; that is, a given volume of digested sludge was extracted daily from the reactor with a syringe and the same volume of substrate was immediately introduced with the same procedure, so that digestion at constant-volume configuration was guaranteed.

The present work reports the results of five laboratories AD experiments: a control experiment, in which no porous material was used, and another four, each with a different porous material used to increase the surface area for bacterial fixation. The five experiments were performed simultaneously, and in all cases the substrate used was a mix of sheep manure (20 wt.%) and cheese whey (80 wt.%).

Fig. 2 shows a photograph of the experimental setup used in each of the five experiments. It essentially consists of a 2 L capacity glass flask, whose rim is attached to a central tube immersed in the reaction medium, and which has an input hole to introduce the substrate and an output hole to collect the biogas generated in the process. The digestion unit was immersed in a water tank and maintained at 38 °C by a thermostat equipped with a heating resistor. The substrate inside the main reactor was homogenized by the continuous action of a magnetic stirrer, allowing for complete



**Fig. 1.** Photograph of a typical artisanal charcoal kiln for holm oak prunings taken in Zahinos (Badajoz, Extremadura, Spain); a) Kiln ignition; b) Location of chimneys for fumes; c) Circulation of gases; d) Obtaining charcoal from holm oak prunings. Adapted from Tropical Products Institute (TPI), [www.fao.org](http://www.fao.org).

**Table 3**  
Characteristics of charcoal on a dry-weight basis.

	Max	Min
Fixed carbon	80%	0%
Ash	10%	3%
Volatile matter	26%	15%
Apparent density (kg/m <sup>3</sup> )	330	180
Mean size (mm)	60	10
Fixed carbon content	22%	10%
Moisture content	25%	5%

mixing.

A 5 L tank assembled next to the biodigester was used to determine the volume of methane generated during the AD process. A squeeze bottle containing a sodium hydroxide solution (20%) was placed between the digester and the gas tank, aimed at retaining the carbon dioxide generated during the digestion process. The methane volumes generated during the experiment displaced water in the tank, which was collected in a measuring cylinder. In this way, the volume of displaced water allowed for the determination of the volume of methane generated in each experiment (Fig. 2).

## 2.2. Preparation of substrate and porous materials. Start-up of the anaerobic digestion process

The feedstock used for the biomethanization was a mix of sheep manure (20 wt. %) and cheese whey (80 wt. %). A complete physicochemical characterization was made of this substrate (Table 4).

The porous materials were subjected to a mechanical pretreatment of comminution and screening through a mesh until reaching a predetermined particle size. They were then put into the biodigester to form a fixed bed consisting of a cloth bag holding the crushed material, which was secured by a thread to an inert material (Fig. 3) (Raposo et al., 2004).

To start the anaerobic digestion experiments, the reactors were completely filled with an anaerobic sludge adapted to the treatment of sheep manure with cheese whey from previous experiments.

The amount of material used and the particle size were also determined, since the porosity and pore size are fixed by the characteristics of each material. One of the objectives in this study was to minimize the amount of porous material used in order to minimize costs. On this basis, it fixed on 1 g of material per L of substrate to be digested (i.e., 1 kg/m<sup>3</sup> of substrate) was fixed (Table 5). The particle size was set at 850 μm. This size, slightly larger than the fixed bed's mesh size, ensured that the material was always kept inside the said bed while the AD experiments were under way.

## 2.3. Analytical methods

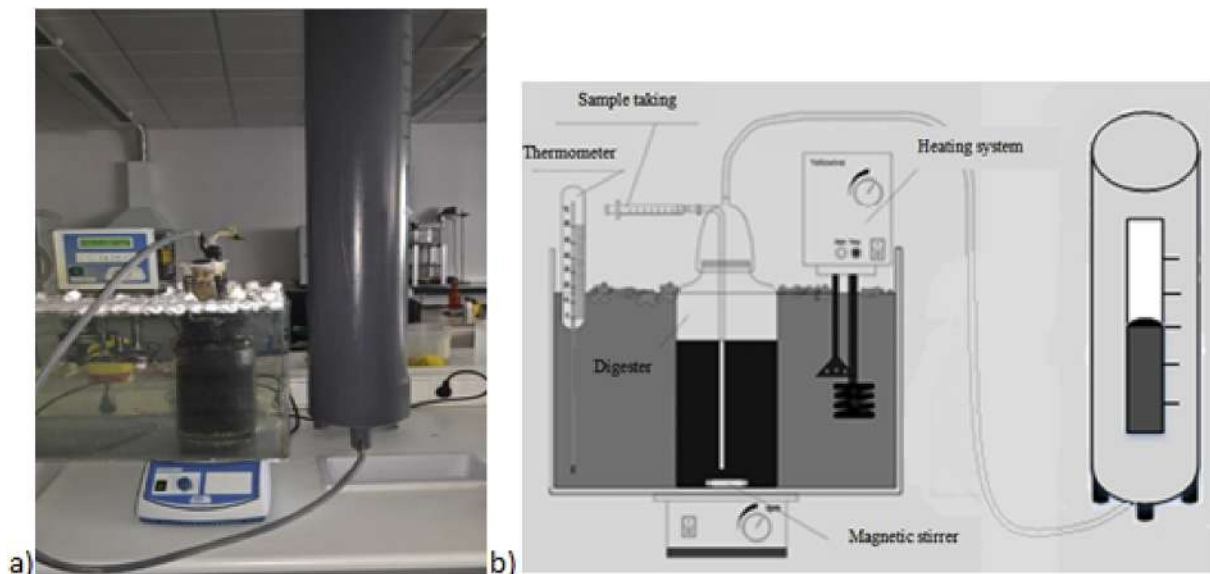
Substrate samples were taken in order to quantify total solids (TS), pH, chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC) and kjeldahl nitrogen (N<sub>k</sub>) according to the standard methods (APHA et al., 1992). Samples were also taken twice a week from the anaerobic digester in order to monitor the following parameters: total COD (using Nanocolor<sup>®</sup> Macherey-Nagel kits), volatile fatty acids (VFA), alkalinity, pH, volatile suspended solids (VSS), and volatile dissolved solids (VDS) (APHA et al., 1992). In addition, the sulfate concentration was measured at the end of this experiment (APHA et al., 1992). The procedure described has been followed successfully in several of our research group's published papers (González-González and Cuadros, 2013; Moreno et al., 2017).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Experimental results of the anaerobic co-digestion of sheep manure (20 wt. %) and cheese whey (80 wt. %) – the control experiment

In order to compare the results obtained with the porous materials in place inside the digester, a first anaerobic co-digestion experiment was carried out with sheep manure and cheese whey without any porous material inside the biodigester.

After several experiments, the hydraulic retention time (HRT) of this experiment was determined to be 14 days, which implies an



**Fig. 2.** a) Photograph of a semi-continuous reactor immersed in a thermal bath; b) Scheme of a semi-continuous reactor.



**Table 4**

Physicochemical characterization of the 20% cheese whey/80% sheep manure substrate. (TSS, total suspended solids; TDS, total dissolved solids; Nk, Kjeldahl Nitrogen; TOC, Total Organic Carbon; C/N, Carbon-Nitrogen ratio; other abbreviations defined in the text.)

Sheep Manure (20%)/Cheese Whey (80%)	
pH	6.83 ± 0.50
VFA (g CH <sub>3</sub> COOH/L)	0.82 ± 0.14
Alkalinity (g CaCO <sub>3</sub> /L)	3.47 ± 2.37
TSS (g/L)	54.91 ± 23.70
TDS (g/L)	47.53 ± 24.17
COD (g/L)	108.87 ± 27.74
N <sub>k</sub> (g/L)	2.52 ± 0.29
TOC (g/L)	29.69 ± 0.88
C/N	11.78
Sulfates (g/L)	15.52 ± 0.58

organic loading rate of 9.31 kg of COD per m<sup>3</sup> of reactor and day, and the possibility of generating 20 m<sup>3</sup> of methane per m<sup>3</sup> of treated waste and reducing the COD by 51.58%. This experiment was maintained for 4 HRT, which is equivalent to 56 days. The results are presented in Table 6.

### 3.2. Experimental results of the anaerobic co-digestion of sheep manure (20 wt. %) and cheese whey (80 wt. %) with almond shell as porous material

Table 6 presents the results of the biomethanization of a sheep manure (20 wt. %) and cheese whey (80 wt. %) mix with almond shell in the fixed bed in the ratio of 1 g/L almond shell. Comparing the results in Table 6, one can see that the almond shell addition led to considerable increases in both alkalinity and, above all, VFA concentration. In addition, the VSS concentration was reduced by almost half – (45.24 ± 17.34) g/L and (23.14 ± 15.36) g/L, respectively (Table 5).

There was also greater biodegradability of the treated waste compared to the control experiment, with reductions of 61% and 51.58%, respectively (Table 6). Finally, the sulfate concentration was greater at the end of the experiment, being 69.02 g/L compared to the control experiment value of 15.52 g/L (Table 6). This high sulfate concentration in the second experiment led to inhibition after only 3 HRT.

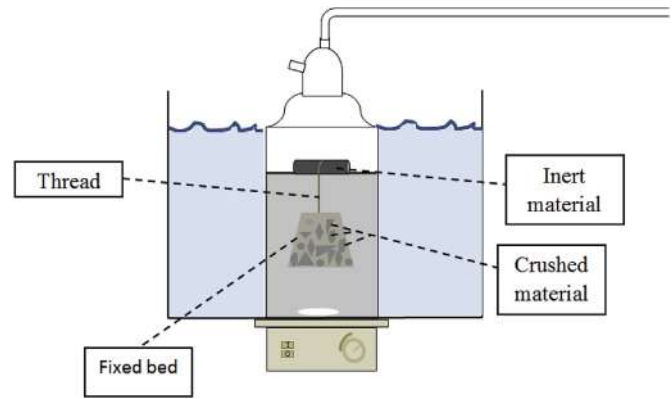
With regard to energy efficiency, both the biogas production and its quality (% methane) were considerably reduced compared to the control experiment (Table 6).

Based on the above, the use of almond shell as porous material has to be discarded for the biomethanization of a mix of sheep's manure (20 wt. %) and cheese whey (80 wt. %).

### 3.3. Experimental results of the anaerobic co-digestion of sheep manure (20 wt. %) and cheese whey (80 wt. %) with walnut shell as porous material

In the experiment on the anaerobic co-digestion of the substrate mix with walnut shell as porous material, as in the previous experiment, it was observed that the sulfate concentration at the end of the experiment was above the inhibitory limit, so that the experiment was inhibited before completing the third HRT (Table 6). One also observes in Table 6 that the VFA concentration increased markedly, reaching a VFA/alkalinity ratio of practically 1. This indicates that the buffering capacity of the mixture is not optimal, since this ratio should be between 0.3 and 0.6.

For the same reasons as in the previous case, the use of walnut shell as porous material has to be discarded for the biomethanization of the sheep manure and cheese whey mix.

**Fig. 3.** Configuration of reactor to introduce the porous materials.

### 3.4. Experimental results of the anaerobic co-digestion of sheep manure (20 wt. %) and cheese whey (80 wt. %) with kenaf fibre as porous material

However, in the experiment of anaerobic co-digestion with kenaf fibres, it was observed that the sulfate concentration decreased markedly relative to the previous experiments, to reach a level of 28.73 g/L at the end of the experiment.

There was an increase in biogas production of 22.25% over the control experiment (Table 6), and an improvement in the biogas quality as the percentage of methane increased from 64.25% in the control experiment to 67.47% in this kenaf experiment. This experiment remained stable for more than 4 HRT.

The addition of kenaf fibre led to slightly greater pH values than in the control experiment (Table 6). This favours the growth of the methanogenic bacteria population since these microorganisms optimal growth is for a pH in the range of 6.5–8.

Finally, the large increase in alkalinity (to 8.4 g CaCO<sub>3</sub>/L) led in this case to a VFA/alkalinity ratio much less than 1. This means that the addition of kenaf fibre at a concentration of 1 g/L of substrate endows the waste treatment process with a great capacity to neutralize acids.

### 3.5. Experimental results of the anaerobic co-digestion of sheep manure (20%) and cheese whey (80%) with charcoal as porous material

The results of an experiment in which 2 g of charcoal (1 g/L of substrate) was put into the fixed bed are presented in Table 6. The total time taken for this experiment was 8 HRT (112 days). These results were similar to those obtained with kenaf fibre. There was a 25.34% increase in biogas production compared to the control experiment, and an increase in the biogas quality (% methane) from (64.25 ± 4.19) % in the control experiment to (66.14 ± 3.54) % in this case.

The pH and alkalinity values increased considerably with respect to the control experiment (Table 6), with the reaction reaching optimal values in terms of stability. However, the biodegradability (% COD reduction) of the waste treated was less in this

**Table 5**

Experimental condition of porous materials.

Experimental condition of porous materials	
Mechanical pretreatment of comminution and screening	850 μm
Amount of porous material (kg/m <sup>3</sup> substrate)	1
HRT (months)	6

**Table 6**  
Results of the control experiment, experiment with almond shell, walnut shell, kenaf and charcoal and biogas production of each experiment. Mean values except for the sulfate concentration measured at the end of the experiment. (VSS, volatile suspended solids; VDS, volatile dissolved solids; OLR, organic loading rate; CO<sub>2</sub>, carbon dioxide; O<sub>2</sub>, oxygen; H<sub>2</sub>S, hydrogen sulfide; other abbreviations defined in the text.)

	Sheep Manure (20%)/Cheese Whey (80%) Control Experiment	Sheep Manure (20%)/Cheese Whey (80%) + Almond Shell	Sheep Manure (20%)/Cheese Whey (80%) + Walnut Shell	Sheep Manure (20%)/Cheese Whey (80%) + Kenaf	Sheep Manure (20%)/Cheese Whey (80%) + Charcoal
OLR (kg COD/m <sup>3</sup> reactor day)	3.89	3.89	3.89	3.89	3.89
HRT (days)	14	14	14	14	14
pH	7.67 ± 0.25	7.13 ± 0.41	7.18 ± 0.41	7.76 ± 0.25	7.89 ± 0.11
VFA (g CH <sub>3</sub> COOH/L)	1.14 ± 1.03	2.89 ± 1.44	4.07 ± 0.98	2.93 ± 1.15	2.39 ± 1.93
Alkalinity (g CaCO <sub>3</sub> /L)	4.76 ± 1.27	4.89 ± 0.71	4.48 ± 0.30	8.40 ± 1.62	7.02 ± 1.32
VDS (g/L)	5.12 ± 2.70	11.12 ± 6.63	9.50 ± 13.44	6.28 ± 7.99	5.71 ± 1.52
VSS (g/L)	45.24 ± 17.34	23.14 ± 15.36	42.87 ± 13.45	51.56 ± 40.03	45.00 ± 9.94
Total COD (g O <sub>2</sub> /L)	62.12 ± 18.57	57.72 ± 13.90	85.71 ± 21.13	80.40 ± 20.63	72.64 ± 14.70
Reduction in COD (%)	51.58	61	42	36	42
m <sup>3</sup> biogas/m <sup>3</sup> substrate (measured at 25 °C and atmospheric pressure)	31.32 ± 11.23	19.44 ± 8.24	27.87 ± 8.48	38.48 ± 10.09	40.74 ± 9.54
m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> /m <sup>3</sup> substrate (measured at 25 °C and atmospheric pressure)	20.12 ± 10.50	10.43 ± 7.05	16.00 ± 7.15	25.96 ± 8.09	26.95 ± 7.23
Sulfates (g/L)	15.52	69.02	40.17	28.73	Not determined
% CH <sub>4</sub>	64.25 ± 4.19	53.64 ± 4.70	57.13 ± 3.16	67.47 ± 4.70	66.14 ± 3.54
% CO <sub>2</sub>	34.32 ± 2.98	44.32 ± 4.11	41.28 ± 2.92	31.23 ± 1.50	29.32 ± 3.75
% O <sub>2</sub>	1.27 ± 1.83	0.62 ± 0.17	0.43 ± 0.19	0.83 ± 0.17	1.16 ± 1.24
ppm H <sub>2</sub> S	2021.50 ± 497.09	2667.20 ± 2068.50	2276.75 ± 410.08	1979.70 ± 7.94	1319.07 ± 736.13
Inhibition (4 HRT)	Yes	Yes	Yes	Yes	No. Currently continuing

case than in the control experiment.

As can be seen in Table 6, biogas production with charcoal as porous material was quite similar to that obtained with kenaf, being 26.95 m<sup>3</sup> of methane per m<sup>3</sup> of substrate (measured at 25 °C and atmospheric pressure) with charcoal, an 25.96 m<sup>3</sup> of methane per m<sup>3</sup> of substrate with kenaf (measured at 25 °C and atmospheric pressure). The same can be said for the proportions of methane in the biogas generated—66% for charcoal, and 67% for kenaf. Thus, with these data it is difficult to lean towards either one or the other material.

### 3.6. Duration of the selected experiments

Due to the similarity of the results of these two co-digestion experiments, one with the addition of kenaf fibres (Experiment 3.4.) and the other with charcoal (Experiment 3.5.), it was decided to follow the experimental simulation for a further 8 HRT, in total, therefore, for more than 168 days. Typically, AD experiments are extended for 2–3 HRT, and this is what one expects to find in the literature. In this case, the duration of experiments 3.4 and 3.5 was considerably lengthened to exceed 168 days in order to analyze the stability of the biochemical reaction over time.

During this long experimental simulation, a gradual decrease in the generation of biogas was observed, which it would associate with the degradation in the adherent power of the porous materials. At 11 HRT (approximately 6 months), new porous material (kenaf or charcoal) was introduced at the same concentration as initially (1 g/L of substrate). This decision was taken on seeing that

the volume of biogas production (mL) decreased significantly by approximately 31% after 6 months.

Both experiments were prolonged up to 12 HRT (168 days). At present, the experiment (Experiment 3.5) with charcoal as porous material continues to be stable, without any signs of inhibition, after more than a year and a half since it began. Table 7 lists the characteristic parameter values after 12 HRT. As can be observed, the biogas production was greater with charcoal (25.53 m<sup>3</sup> of methane per m<sup>3</sup> of substrate, measured at 25 °C and atmospheric pressure) than with kenaf (13.04 m<sup>3</sup> of methane per m<sup>3</sup> of substrate, measured at 25 °C and atmospheric pressure). In addition, the methane content is of better quality when adding charcoal to the mixture (72% CH<sub>4</sub> content for charcoal versus 60% for kenaf fibre). There was also a greater percentage of COD degradation with charcoal (50%) than with kenaf (47%).

With respect to the data obtained for the biogas production, kenaf (Experiment 3.4) gave lower yields than the control experiment (Table 6), while charcoal gave a 27.82% increase compared to the control experiment. This increase in biogas production is decisive when it comes to any economic viability analysis since it may make an industrial project for the biomethanization of a waste which otherwise would not be cost effective become economically viable if a fixed bed with charcoal is included inside the digester.

The conclusion therefore is that charcoal is the porous material which gives the best results, in both energy (methane production) and environmental (COD reduction) terms, for the biomethanization of a mix of cheese whey and sheep manure.

**Table 7**  
Characteristic parameters of the two prolonged AD experiments (12 HRT) with kenaf (Trial 3.4) and charcoal (Trial 3.5).

Experiments	m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> /m <sup>3</sup> substrate (measured at 25 °C and atmospheric pressure)	% CH <sub>4</sub>	pH	COD (g O <sub>2</sub> /L)	Reduction in COD	Increase in CH <sub>4</sub> production over the control trial
Control (Trial 3.1)	20.12	64%	7.67	62.12	52%	–
Kenaf fibre (Trial 3.4)	13.04	60%	7.21	65.38	47%	–35.19%
Charcoal (Trial 3.5)	25.53	72%	7.68	61.76	50%	27.82%



**Table 8**

Costs associated with the use of the porous material.

Charcoal price	0.70	€/kg
Concentration of charcoal in the digester	1	kg/m <sup>3</sup> substrate mix
Volume of charcoal required	3.03	m <sup>3</sup> /y
Maximum amount of charcoal	1000	kg/y
Total cost of charcoal	700	€/y
Distance to the pilot plant (round trip)	334	km
Fuel price	0.35	€/km
Van rental	160	€ per trip
Transportation cost	278.90	€/per trip
Total cost associated with the use of charcoal	978.90	€/y

### 3.7. Estimation of the costs of using charcoal

To estimate the economic cost of using charcoal as a bacterial adhesion material in the AD of a mix of sheep manure (20 wt. %) and cheese whey (80 wt. %), the requirement estimated in the laboratory was 1 kg/m<sup>3</sup> substrate (1 g/L substrate).

In accordance with the results described in the previous section, which established that the charcoal needs to be replaced every 6 months, a pre-industrial plant with a 500 m<sup>3</sup> digester designed to process the annual waste of a cheesemaker plant would need about 1000 kg of charcoal per year. The average price of charcoal is about € 0.70/kg (<https://www.carbonsponc.com>), so that the total cost of charcoal would be about € 700/y.

To this must be added the cost of transporting the material. The holm oak charcoal to be used in the assumed industrial AD installation comes from Zahinos (Badajoz). This town is located about 167 km away from the cheesemaker in Castuera (Badajoz). Taking into account the price of fuel used and the cost of renting a van, the estimated transportation cost for the charcoal is about € 279/y.

Thus, the total costs associated with the use of charcoal as porous material in an AD plant would be € 979/y (Table 8).

### 3.8. Economic viability of a pre-industrial plant for the AD of a cheese whey (80 wt. %) and sheep manure (20 wt. %) mix using charcoal as adsorbent material

The results to be presented in this subsection were obtained by a procedure of scaling and then evaluating the economic viability of anaerobic digestion plants (Cuadros et al., 2011; González-González et al., 2014).

An industrial AD plant was designed that would allow 9000 m<sup>3</sup> of substrate mix to be treated per year (1800 m<sup>3</sup> of sheep manure and 7200 m<sup>3</sup> of cheese whey) in the locality of Castuera (Badajoz, Spain). The construction was of a perfect-mixture biological reactor of 500 m<sup>3</sup> volume, height 7 m, and diameter 9.54 m, with an HRT of 14 days. Table 9 lists the dimensions of the main components.

The economic viability study performed for this anaerobic digestion plant showed a viable scenario for the generation of thermal energy. Table 10 presents the energy potential of the biomethanization plant for the treatment of 9000 m<sup>3</sup> of substrate mix per year.

**Table 9**

Dimensions of the components of the AD plant.

Dimensions of the Pre-Industrial Plant		
Anaerobic digester	500	m <sup>3</sup>
Mixing and feedstock tank	60	m <sup>3</sup>
Manure storage tank	25	m <sup>3</sup>
Digested sludge tank	40	m <sup>3</sup>
Crushing tank	3	M <sup>3</sup>
Gasometer	300	m <sup>3</sup>
Boiler	210	kW

**Table 10**

Economic viability of the AD plant.

Economic Feasibility of the Pre-Industrial AD Plant	
Starting data	
Thermal energy generated (MWh/y)	1678
Heating needed in the digester (MWh/y)	521
Useful thermal energy (MWh/y)	1157
Boiler's thermal power (MW)	0.210
Installation cost (€)	350 000
Maintenance of the plant (€)	9800
Electricity (€)	8075
Bank loan (€)	35 627
Transport (€)	279
Total costs (€)	54 480
Thermal energy savings (€)	94 974
Total revenue (€)	94 974
Annual profit (€)	40 494
Total NPV at 15 years (3%)	253 625
IRR	10%
Period of return on investment (PRI) (years)	8

Akbulut (2012) obtained greater economic viability from a farm-scale biogas plant of electricity and heat generating. This comes from the sale of the liquid and solid fraction of the digestate obtained from the AD. The liquid fraction (wastewater) of the digestate coming from the separator can be reused, provided that it complies with the regulations set out in Royal Decree 1620/2007, dated December 7 (Ministry of the Presidency, 2007). This regulations establishing the legal regime for the reuse of wastewater, and determining the quality demanded of recovered water according to its intended use. In this case, the wastewater can be used for irrigating crops with whose fruit it does not come into contact, or it can be discharged into the municipal sewerage system. The solid fraction coming from the separator can be used for composting in accordance with Regulation 1774/2002/CE, dated October 3, establishing the sanitary norms applicable to animal by-products not destined for human consumption.

Although such compost is a material with a good market (Mardoyan and Braun, 2015; Maroušek et al., 2016), in the economic study that will be described below, possible revenues coming from its sale have not been taken into account.

The construction of the industrial AD plant would generate an annual profit of € 94 974 due to the savings in diesel oil for the generation of thermal energy, taking the price of € 0.819/L diesel-C (Ministry of Industry, Energy and Tourism, 2017). This allows an 8-year period of return on investment (PRI), with a 10% internal rate of return (IRR), and a € 235 625 15-year net present value (NPV) (Table 10).

## 4. Conclusions

The objectives set out for the study were attained in the laboratory-scale biomethanization experiments carried out with a mix of sheep manure (20 wt. %) and cheese whey (80 wt. %) plus the use of four porous materials as bacterial adherents. The five experimental simulations were carried out simultaneously in semi-continuous 2-L reactors, and, in the cases of kenaf fibre and charcoal, prolonged to 12 HRT. The main conclusions are the following:

- The greatest long-term energy yields (for reaction times greater than 168 days) were obtained using charcoal as a bacterial adhesion material. There was an increase of 27.82% in methane production compared to the biomethanization of the mix without the presence of any porous material (control trial).
- Charcoal addition enhanced process stability by increasing the alkalinity.

- The time when charcoal begins to lose its bacterial adhesion properties is approximately 6 months. After this, the fixed bed must be renewed with the same amount of charcoal (1 kg per m<sup>3</sup> of substrate mix).
- This biogas production would permit a useful annual thermal energy of 1157318 kWh, equivalent to replacing 115732 L of diesel oil. This energy would be sufficient to cover the annual heating requirements of the cheesemaking factory studied and it would generate savings of about € 94974/y.
- This plant would work with a 500 m<sup>3</sup> anaerobic biodigester. Its construction would be economically viable since it would achieve an 8-year PRI and a 10% IRR. This good economic profitability is due to the increase in energy efficiency provided by the bacterial immobilization associated with the charcoal.
- The results that have been presented here are very consistent since they were obtained from a long experimental simulation (12 HRT), ensuring that the projected industrial plant would remain in operation over time without any signs of inhibition.

## Acknowledgments

The authors are grateful to the Junta de Extremadura and the European Union (FEDER Funds) for the financial support with which to carry out this study, through Project GR15146.

## References

- Aider, M., Halleux, D., Melnikova, I., 2009. Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: impact of processing conditions. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 334–341.
- Akbulut, A., 2012. Techno-economic analysis of electricity and heat generation from farm-scale biogas plant: Çiçekdağı case study. *Energy* 44, 381–390.
- Alba Intermodal Group, 2014. Context of the Autonomous Community of Extremadura. Rural Development Program 2014–2020. <http://www.juntaex.es>. (Accessed 9 April 2018).
- APHA, AWWA, WPCF, 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, seventeenth ed. (Madrid, Spain).
- Brown, N., Güttler, J., Shilton, A., 2016. Overcoming the challenges of full scale anaerobic co-digestion of casein whey. *Renew. Energy* 96, 425–432.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064.
- Cuadros, F., López, F., Ruiz, A., Rubiales, F., González-González, A., 2011. Recycling, reuse and energetic valuation of meat industry wastes in Extremadura (Spain). *Resour. Conserv. Recycl.* 55, 393–399.
- Desai, M., Madamwar, D., 1994. Anaerobic digestion of a mixture of cheese whey, poultry waste and cattle dung: a study of the use of adsorbents to improve digester performance. *Environ. Pollut.* 86, 337–340.
- Farizoglu, B., Keskinler, B., Yildiz, E., Nuhoglu, A., 2007. Simultaneous removal of C, N, P from cheese whey by jet loop membrane bioreactor (JLMBR). *J. Hazard Mater.* 146, 399–407.
- Fernandes, M., Fornari, R., Mazutti, M., Oliveira, D., Ferreira, F., Cichoski, A., Cansian, R., Luccio, M., Treichel, H., 2009. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *J. Food Eng.* 90, 119–123.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. <http://www.fao.org> (accessed 14 July 2017).
- Gannoun, H., Khelifi, E., Bouallagui, H., Touhami, Y., Hamdi, M., 2008. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. *Bioresour. Technol.* 99, 6105–6111.
- Geeta, G.S., Ragheevendra, S., Reddy, T.K.R., 1986. Increase in biogas production from bovine excreta by addition of various inert materials. *Agric. Wastes* 17, 153–156.
- González-González, A., Cuadros, F., 2013. Continuous biomethanization of agrifood industry waste: a case study in Spain. *Process Biochem.* 48, 920–925.
- González-González, A., Cuadros, F., López, F., 2014. Influence of heavy metals in the biomethanation of slaughterhouse waste. *J. Clean. Prod.* 65, 473–478.
- Guo, J., Zhang, P., Chen, Y., Shen, Y., Hu, X., Yan, P., Yang, J., Fang, F., Li, C., Gao, X., Wang, G., 2015. Microbial attachment and adsorption-desorption kinetic of tightly bound extracellular polymeric substances on model organic surfaces. *Chem. Eng. J.* 279, 516–521. <https://www.carbonsponc.com> (accessed 09 June 2017).
- Interprofessional dairy organization in Spain, 2015. Data on Production, Industry and Consumption in the Dairy Sector (2008–2015). [https://www.inlac.es/admin/uploads/files/id\\_20173418\\_Infomesocioeconomicoinlac20.09.16.pdf](https://www.inlac.es/admin/uploads/files/id_20173418_Infomesocioeconomicoinlac20.09.16.pdf). (Accessed 9 April 2018).
- Jelen, P., Tossavainen, O., 2003. Low lactose and lactose-free milk and dairy products – prospects, technologies and applications. *Aust. J. Dairy Technol.* 58, 161–165.
- Kratky, L., Jirout, T., 2011. Biomass size reduction machines for enhancing biogas production. *Chem. Eng. Technol.* 34, 391–399.
- Kumar, S., Jain, M.C., Chhonkar, P.K., 1987. A note on stimulation of biogas production from cattle dung by addition of charcoal. *Biol. Waste* 20, 209–215.
- Lehmann, J., 2007. A handful of carbon. *Nature* 447, 143–144.
- Lehmann, J., Czimczik, C., Laird, D., Sohi, S., 2009. Biochar for environmental management science and technology. In: Lehmann, J., Joseph, S. (Eds.), *Stability of Biochar in the Soil*. E-Publishing Inc., Earthscan, London, pp. 169–182.
- Libra, J.A., Ro, K.S., Kammann, C., Funke, A., Berge, N.D., Neubauer, Y., Titirici, M.M., Fühner, C., Bens, O., Kern, J., 2011. Hydrothermal carbonization of biomass residuals: a comparative review of the chemistry, processes and applications of wet and dry pyrolysis. *Biofuels* 2, 89–124.
- Mardoyan, A., Braun, P., 2015. Analysis of Czech subsidies for solid biofuels. *Int. J. Green Energy* 12, 405–408.
- Maroušek, J., 2013a. Removal of hardly fermentable ballast from the maize silage to accelerate biogas production. *Int. J. Green Energy* 44, 253–257.
- Maroušek, J., 2013b. Study on commercial scale steam explosion of winter Brassica napus straw. *Int. J. Green Energy* 10, 944–951.
- Maroušek, J., Hašková, S., Zeman, R., Váchal, J., Vaníčková, R., 2014. Nutrient management in processing of steam-exploded lignocellulose phytomass. *Chem. Eng. Technol.* 37, 1945–1948.
- Maroušek, J., Hašková, S., Zeman, R., Žák, J., Vaníčková, R., Maroušková, A., Váchal, J., Mysková, K., 2016. Polemics on ethical aspects in the compost business. *Sci. Eng. Ethics* 22, 581–590.
- Maroušek, J., Vochozka, M., Plachý, J., Žák, J., 2017. Glory and misery of biochar. *Clean Technol. Environ. Policy* 19, 311–317.
- Mawson, A.J., 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresour. Technol.* 47, 195–203.
- Minhalma, M., Magueijo, V., Queiroz, D.P., Pinho, M.N., 2007. Optimization of “Serpa” cheese whey nanofiltration for effluent minimization and by-products recovery. *J. Environ. Manag.* 82, 200–206.
- Ministry of Agriculture and fisheries, food and environment, 2011–2012. [http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/12-II-H-Agricultura\\_tcm7-286717.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/publicaciones/12-II-H-Agricultura_tcm7-286717.pdf) (accessed 13 March 2018).
- Ministry of Industry, 2017. Energy and Tourism. <http://www.dieselogasolina.com/precio-del-gasoi-o-gasoleo-de-calefacion.html>. (Accessed 14 July 2017).
- Moreno, L., González-González, A., Cuadros-Salcedo, F., Cuadros-Blázquez, F., 2017. Feasibility of a novel use for agroindustrial biogas. *J. Clean. Prod.* 144, 48–56.
- Mumme, J., Srocke, F., Heeg, K., Werner, M., 2014. Use of biochars in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 164, 189–197.
- Pande, H., Roy, D.M., 1998. Influence of fibre morphology and chemical composition on the papermaking potential of kenaf fibres: a look at what attributes affect tensile strength. *Food Agric. Organ. Unit. Nation.* 99, 31–34.
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., Bunko, K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.* 105, 1–14.
- Prazeres, A.R., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: a review. *J. Environ. Manag.* 110, 48–68.
- Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., Kishore, V.V.N., 2000. State of the art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 4, 135–156.
- Raposo, F., Borja, R., Sánchez, E., Martín, M.A., Martín, A., 2004. Performance and kinetic evaluation of the anaerobic digestion of two-phase olive mill effluents in reactors with suspended and immobilized biomass. *Water Res.* 38, 2017–2026.
- Regulation 1774/2002/CE, 2002. [http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/cocow/archivos/R.1774\\_2002.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/cocow/archivos/R.1774_2002.pdf) (accessed 09 May 2018).
- Roberts, K.G., Gloy, B.A., Joseph, S., Scott, N.R., Lehmann, J., 2010. Life cycle assessment of biochar systems: estimating the energetic, economic, and climate change potential. *Environ. Sci. Technol.* 44, 827–833.
- Romero-Arenas, O., López, R., Damián, M.A., Hernández, I., Parraguire, J.F., Huerta, M., 2012. Evaluation of residue of rind of nut (*Juglans regia* L.) in production of seedlings of *Pinus patula*, in pond. *Costa Rican Agron.* 36, 103–110.
- Royal Decree 1620/2007, 2007. Ministry of the Presidency. <https://www.boe.es/boe/dias/2007/12/08/pdfs/A50639-50661.pdf>. (Accessed 9 May 2018).
- Schmidt, H.P., Kammann, C., Niggli, C., Evangelou, M.W.H., Mackie, K.A., Abiven, S., 2014. Biochar and biochar-compost as soil amendments to a vineyard soil: influences on plant growth, nutrient uptake, plant health and grapequality. *Agric. Ecosyst. Environ.* 191, 117–123.
- Shen, Y., Linville, J.L., Ignacio-de Leon, P.A.A., Schoene, R.P., Urgun-Demirtas, M., 2016. Towards a sustainable paradigm of waste-to-energy process: enhanced anaerobic digestion of sludge with woody biochar. *J. Clean. Prod.* 135, 1054–1064.
- Torri, C., Fabbri, D., 2014. Biochar enables anaerobic digestion of aqueous phase from intermediate pyrolysis of biomass. *Bioresour. Technol.* 172, 335–341.
- Urrestarazu, M., Martínez, G.A., Salas, M.C., 2005. Almond shell waste: possible local rockwool substitute in soilless crop culture. *Sci. Hortic.* 103, 453–460.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Jones, D.L., 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresour. Technol.* 99, 7928–7940.
- Yang, Y., Tada, C., Shohidullah, M., Tsukahara, K., Yagishita, T., Sawayama, S., 2004. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized microbes in anaerobic digester. *Mater. Sci. Eng. C* 24, 413–419.

# ANEXO III

## Referencia

Consolación Sánchez Sánchez, Almudena González González, Francisco Cuadros Salcedo, Vicente Gómez Serrano, Francisco Cuadros Blázquez. 2019. Charcoal as a bacteriological adherent form biomethanation of organic wastes. *Energy* 179, 336–342. DOI:0.1016/j.energy.2019.04.192.

## Derechos de autor

No es necesario el permiso de la editorial. Como autor de un artículo publicado en una revista de Elsevier, conserva el derecho de incluirlo en una tesis o disertación, siempre que no se publique comercialmente. La publicación formal del artículo puede encontrarse a través del siguiente enlace: <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.04.192>.





# Charcoal as a bacteriological adherent for biomethanation of organic wastes



Consolación Sánchez-Sánchez <sup>a, \*</sup>, Almudena González-González <sup>b</sup>,  
Francisco Cuadros-Salcedo <sup>b</sup>, Vicente Gómez-Serrano <sup>c</sup>, Francisco Cuadros-Blázquez <sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Department of Applied Physics, School of Agricultural Engineering, University of Extremadura, Avda. de Elvas S/n, 06006, Badajoz, Spain

<sup>b</sup> METANOGENIA S.L, Avda. de La Innovación, Biodiversity Building, University Campus, 06006, Badajoz, Spain

<sup>c</sup> Department of Organic and Inorganic Chemistry, Science Faculty, University of Extremadura, Avda. de Elvas S/n, 06006, Badajoz, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 27 February 2019

Received in revised form

24 April 2019

Accepted 26 April 2019

Available online 6 May 2019

### Keywords:

Charcoal

Biomethanation

Bacteriological adherent

Renewable energy

## ABSTRACT

This paper analyses the improved energy and environmental performance of the biomethanation of a mixture of sheep manure (20% by weight) and cheese whey (80% by weight) in a reactor of 2 L capacity containing 2 g of charcoal in the form of a fixed bed with respect to the same process but without the charcoal in the reactor (control experiment). The results show an increased methane production of 27.05% and a reduction of the H<sub>2</sub>S content in the biogas of 34.7%, over those obtained in the control experiment. These marked improvements of the biomethanation process are attributable to the content of highly electropositive metals such as K and Ca in the charcoal which, because chemical reactions, can increase the pH of the medium and thus favour the processes of methanogenesis and sulphate reduction. Charcoal would act as a bacteriological adherent promoting the biomethanation of the organic waste materials used in the study.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Anaerobic digestion (AD) or biomethanation is a promising eco-friendly solution for the treatment of organic wastes. It leads on the one hand to efficient bioenergy production and on the other to a significant reduction in the pollutant load of those wastes [1]. Production of biofuels from biomass can contribute to reducing greenhouse emissions, and hence slow down climate change [2].

Biomethanation technology has recently become an attractive source of renewable energy due to its low capital costs and high process efficiency, and it can be considered as helping in the transition towards green growth and a more circular economy [3–5]. Immobilization of microorganisms in waste or some other support material is a widely used AD technique for producing biogas [6,7]. Manufactured materials including activated carbon, zeolite, saponite, bentonite, and rubberized-coir have been used as such support materials [8–10].

Activated carbon has been found to promote methane

production in organic wastes due to the adsorption of inhibitive sulfide anion [11], and it can facilitate direct interspecies electron transfer that can be beneficial in a methanogenic system [12].

Another kind of support material produced and utilized for several thousand years has been biochar, the solid product of biomass pyrolysis. The applications of biochar are very diverse, ranging from heat and power production, flue gas cleaning, metallurgy, agriculture and animal husbandry, construction material, enhancing carbon sequestration, medical uses, etc. [13,14].

It can be concluded from experimental work reported in the literature [15,16] that biochars possess the capacity to catalyze anaerobic digestion by mitigating ammonia inhibition and supporting archaeal growth, apart from the methanization of their own labile carbon content. It should be borne in mind, that those experiments were conducted either in syringe reactors (100 mL) using synthetic wastewater, or only for short hydraulic retention times [17].

However, the common problem of all these products that increase the surface available for bacterial adhesion is that their high costs are prohibitive for their application in industrial scale AD plants.

Instead, charcoal is an alternative to the use as an adherent for the bacteria responsible for the biomethanation of organic matter.

\* Corresponding author. Department of Applied Physics, University of Extremadura, Avda. de Elvas s/n, 06006, Badajoz, Spain.

E-mail address: [consolis@unex.es](mailto:consolis@unex.es) (C. Sánchez-Sánchez).



Charcoal's porous nature makes it especially well suited to colonization by different bacterial families, thus increasing the amount of microorganisms available in the reaction medium and generating more biogas per unit mass of feed substrate. The advantages of charcoal for this use over other porous materials are mainly due to three factors: (i) its surface properties are similar to those of other manufactured materials; (ii) its manufacture is very low cost; and (iii) it can be obtained from many different biomass residues.

In Extremadura (Spain), the dead trunks and prunings of the holm oak (*Quercus ilex*) have traditionally been used as raw material for the production of charcoal. Fig. 1 is a photograph of an artisanal earth-mound charcoal oven. The holm oak is the main component of the “dehesa”, a Mediterranean agrosilvopastoral system in which farming is combined with forestry and livestock. These systems are mostly located in the southwest of the Iberian Peninsula. In addition to their biodiversity, dehesas are of great landscape and recreational value, and contribute substantially to the historical and cultural heritage of Extremadura, all of which aspects are linked to what is a new but important economic activity for the region – rural tourism [18]. The area occupied by the dehesa in Extremadura is 1 434 000 ha, of which 1 145 000 ha (79.85%) corresponds to oak woodland [19].

Charcoals constitute an alternative not just from being low-cost carbonaceous materials, as noted above, but also because the digestate residues can be used directly to as soil amendments without posing any environmental risk. Despite their apparent attractiveness, there have been few studies on using charcoals in anaerobic digestion, mainly because the underlying biochemical mechanism is not understood in its entirety, particularly at the microscopic level [20].

The presence of charcoal can change the microbial community in the reactor, and it can serve as a good substrate for high-load digestion by inducing selective colonization of functional microbes [21].

Our group [22] have recently been working on the use of low-cost porous materials as bacterial adherents in the AD of wet agroindustrial waste, using “real” sludge in bench-scale reactors (2000 mL) for long experimental times (168 days or more) aimed at increasing the production and methane content of biogas and at testing the bioreaction's stability. That work included an exhaustive analysis of the environmental and energy benefits, and the economic sensitivity of industrial projects incorporating this type of material. The substrate used in those trials was a sludge composed of 20% by weight of sheep manure and 80% by weight of cheese whey, and the porous materials tested were: almond shell, walnut

shell, kenaf fibre, and holm-oak charcoal.

The main objective of the present work was to characterize the surface properties of holm-oak charcoal and correlate them with the yields and quality of the biogas obtained through the biomethanation of a determined amount of that agroindustrial waste put into the digester. The optimal amount of charcoal will be the minimum that allows the best energy, economic, and environmental results to be achieved.

This is a promising line of applied research since it addresses, within a model of promoting green growth and a circular economy, the conjoint use of two types of waste that abound in our region (wood from oak prunings, and wet agroindustrial wastes that are generally highly polluting). The aim is to optimize the energy, economic, and environmental yields of the AD processing of organic matter waste by adding a low-cost porous material (artisanally-made charcoal) to serve as bacterial adherent.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Charcoal study

#### 2.1.1. Origin and analyses

Using the bioreactor which will be described in detail below, we carried out two AD experiments simultaneously, one with charcoal and the other without charcoal (control experiment) for comparison purposes. The charcoal had been produced in the dehesa pastureland of Extremadura following the earth-mound procedure that is traditional in the region in which mainly large oak logs are formed into a pile and covered densely with earth for thermal isolation (conductive heat transport in soil is almost temperature independent [23]) and to restrict gas inflow and outflow. Dry distillation of the wood is completed after several days have elapsed. The charcoal material was furnished by Carboneras de Zahinos S.L. (Badajoz, Spain). It was crushed and sieved to select an 850  $\mu\text{m}$  particle size as being slightly larger than the mesh of the sieve in the fixed reactor, thus ensuring that the carbon particles remained in the bed for as long as the AD experiment lasted. Elemental analysis of the charcoal was carried out in a LECO CHNS-932 analyser. The results were (wt%): C, 80.60; H, 4.30; N, 0.26; S, 0.02;  $\text{O}_{\text{diff}}$ , 14.86 (Table 1). The ash content was determined in triplicate by incinerating ~1 g of sample at 600 °C to constant mass (~12 h) in a Selecta muffle furnace (Select-Horn), yielding a value of 4.16 wt%.

#### 2.1.2. Morphology and texture

The charcoal was characterized morphologically and texturally. For the former, electron microscope images were obtained using a model Quanta 3D FEG (FEI Company) scanning electron microscope operating in high-vacuum mode under an accelerating voltage ranging from 0.1 to 30 kV, and an Everhart Thornley detector for secondary electrons. Several SEM images of randomly chosen particle regions and grains were acquired for each sample at different magnifications. For the latter,  $\text{N}_2$  adsorption at  $-196^\circ\text{C}$  was determined, together with mercury porosimetry, and mercury and helium density measurements. In particular, the  $\text{N}_2$  adsorption isotherm was determined on 0.118 g of sample in a Quantachrome Autosorb-1 device after degassing the aliquot at 120 °C for 12 h. For the porosimetry, a Quantachrome PoreMaster 60 porosimeter was



Fig. 1. Photograph of a typical artisanal earth-mound oak-wood charcoal oven taken in Zahinos (Badajoz, Extremadura, Spain).

Table 1  
Chemical analyses of charcoal (wt%).

C	H	N	S	$\text{O}_{\text{diff}}$	Ash
80.60	4.30	0.26	0.02	14.82	4.16

used, with  $\sim 0.326$  g of charcoal sample put into the glass holder which was then evacuated by means of an oil pump before filling with mercury, determining the sample's mercury density from knowing the previously calibrated glass holder volume and the density of liquid mercury at the working temperature (Fig. 2). The helium density was measured in a Quantachrome stereopycnometer, using  $\sim 3$  g of sample.

## 2.2. Anaerobic digestion

### 2.2.1. Organic substrate and charcoal adsorbent

The feedstock (substrate) used for the biomethanation process was a mix of sheep manure (20 wt%) and cheese whey (80 wt%). It had previously been completely characterized physicochemically (see Table 2). Since one of the objectives of the study was to minimize costs in the AD process, the amount of charcoal used in the experiments was fixed at 1 g of material per L of substrate (i.e., 1 kg of charcoal/m<sup>3</sup> of feedstock).

### 2.2.2. Experimental set-up and procedure

The AD experiments were carried out in the "Laboratory of Biomethanation and Photoirrigation (LBP)" located in the School of Agricultural Engineering at the University of Extremadura, Badajoz (Spain). The reactors were operated in semi-continuous mode, i.e., a given volume of digested sludge was extracted daily from the reactor with a syringe, and the same volume of substrate was immediately introduced with the same procedure to ensure digestion at constant volume. The present work reports the results of two experiments – a control in which there was no porous material in the bioreactor, and another with charcoal used to increase the surface area for bacterial fixation. The two experiments were performed simultaneously, using the aforementioned substrate of a mix of sheep manure (20 wt%) and cheese whey (80 wt%). Fig. 3a is a photograph of the experimental setup used in the two experiments. It essentially consists of a 2-L capacity glass flask, whose rim is attached to a central tube immersed in the reaction medium, and which has an input hole to introduce the substrate and an output hole to collect the biogas generated in the process. The digestion unit was immersed in a water tank, and maintained at 38 °C by a thermostat equipped with a heating resistor. The substrate inside the reactor was homogenized by the continuous action of a magnetic stirrer, ensuring complete mixing. To provide the reactor with a fixed bed of adsorbent, the aforementioned amount of previously conditioned charcoal particles was

introduced in a cloth bag which was secured inside the reactor by a thread hanging from a piece of inert material (Fig. 4) following the experimental design of Raposo et al. [24].

A 5-L tank next to the biodigester was used to determine the volume of methane generated during the AD process. A squeeze bottle containing a 20% sodium hydroxide solution was placed between the digester and the gas tank in order to retain the carbon dioxide generated during the digestion process. The methane generated displaced water in the tank, which was collected in a measuring cylinder so as to determine the volume of methane generated in each experiment (see Fig. 3).

### 2.2.3. Analytical methods

Substrate samples were taken in order to quantify total solids (TS), pH, chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), and Kjeldahl nitrogen (N<sub>k</sub>), following the standard methods [19]. Samples were also taken twice a week from the anaerobic digester in order to monitor the following parameters: total COD (using Nanocolor<sup>®</sup> Macherey-Nagel kits), volatile fatty acids (VFA), alkalinity, pH, volatile suspended solids (VSS), and volatile dissolved solids (VDS) [25]. In addition, the sulphate concentration was measured at the end of the experiments [25]. The procedure described has been followed successfully in previous studies carried out by our research group [26,27].

## 3. Results and discussion

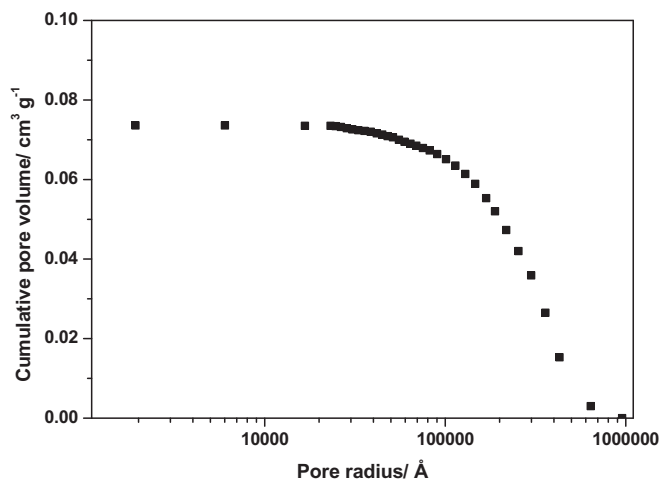
### 3.1. Charcoal characterization

The SEM images of Fig. 4 were taken on different particle grains with magnifications to resolve sizes of either 20 or 50 μm. It is shown that, morphologically, the charcoal particles are characterized by very uneven surfaces, featuring fissures, cracks, and grooves, and large, dissimilarly shaped, zones of free matter, some of them displaying pore openings. Given the method used to make the charcoal, it is probable that some of the morphological features were caused by release of gases from the pyrolysis of the wood and by contact of those gases with the transient char during the process. The latter should of course mainly have influenced the surface of the material rather than its internal structure. White polycrystalline particles were also observed, evidence of the presence of inorganic matter on the surface of charcoal particles. An energy-dispersive X-ray (EDX) spectroscopic analysis (spectra not presented for the sake of brevity) yielded the following mean wt% and at% data for the four most abundant chemical elements: C, 66.62, 75.51; O, 22.24, 19.35; K, 6.24, 2.18; Ca, 2.04, 0.70. Although more rarely, the presence of N, Mg, and S was also detected in the particle grains analysed. For N, the mean wt% and at% were 4.45 and 4.43, while, for Mg and S, the

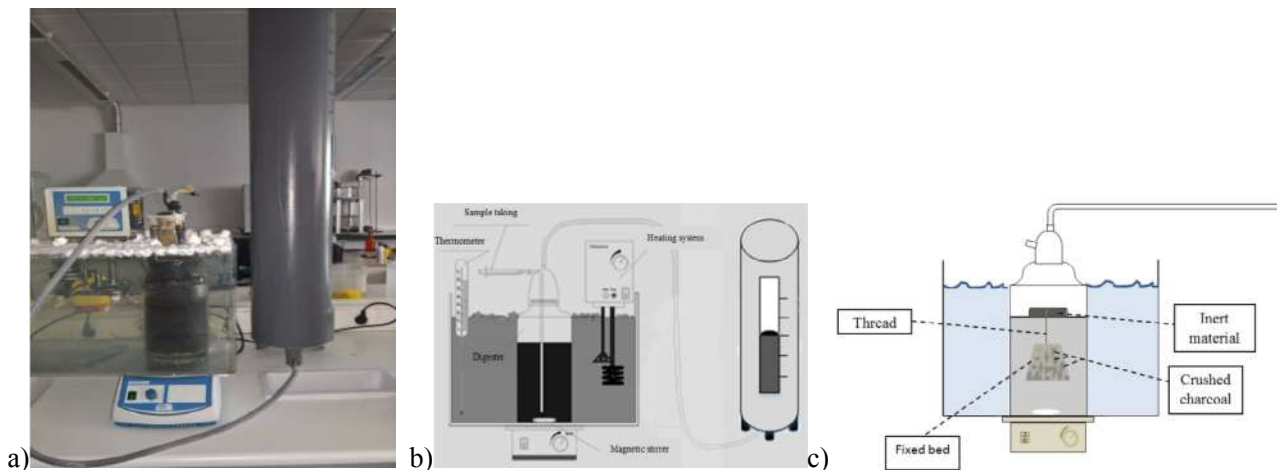
**Table 2**

Physicochemical characterization of the 20% cheese whey/80% sheep manure substrate. (TSS, total suspended solids; TDS, total dissolved solids; N<sub>k</sub>, Kjeldahl nitrogen; TOC, total organic carbon; C/N, carbon-nitrogen ratio. Other abbreviations defined in the text.)

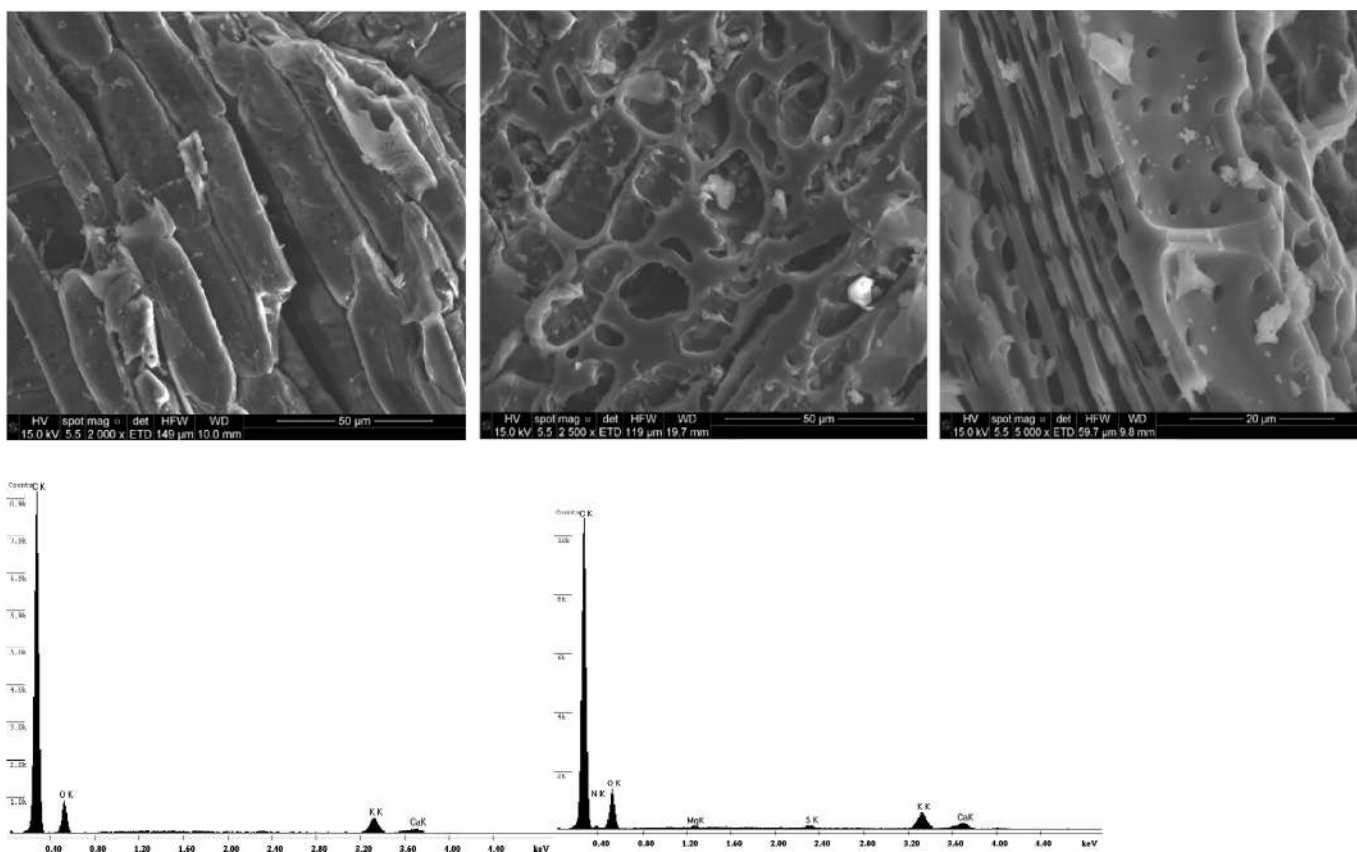
Sheep Manure (20%)/Cheese Whey (80%)	
pH	6.83 ± 0.50
VFA (g CH <sub>3</sub> COOH/L)	0.82 ± 0.14
Alkalinity (g CaCO <sub>3</sub> /L)	3.47 ± 2.37
TSS (g/L)	54.91 ± 23.70
TDS (g/L)	47.53 ± 24.17
COD (g/L)	108.87 ± 27.74
N <sub>k</sub> (g/L)	2.52 ± 0.29
TOC (g/L)	29.69 ± 0.88
C/N	11.78
Sulfates (g/L)	15.52 ± 0.58



**Fig. 2.** Curve of mercury intrusion against pore radius.



**Fig. 3.** (a) Photograph of the semi-continuous reactor immersed in a heat bath; (b) diagram of the semi-continuous reactor; (c) experimental configuration for the introduction of the porous material.



**Fig. 4.** The SEM images reported taken on a different particle grains each with magnification to resolve sizes of either 20 or 50  $\mu\text{m}$ .

values were markedly lower. The significantly higher oxygen content as determined by EDX spectroscopy (22.24 wt%) than by elemental analysis (14.82 wt%) advocates for a concentration of oxygen in the surface of the charcoal particles as a result of the oxidation by air of the manufactured product. The oxidation process would have been favoured if the freshly pyrolysed product, which would still have been hot, was allowed contact with air from the simple removal of the earth forming the protective insulating layer.

The  $\text{N}_2$  adsorption/desorption isotherm measured for the

charcoal is plotted in Fig. 5. According to the BDDT (Brunauer, Deming, Deming & Teller) classification system of  $\text{N}_2$  isotherms, the aforesaid isotherm is not a typical isotherm that may be assigned to any of the five types into which the majority of  $\text{N}_2$  isotherms may be grouped. The  $\text{N}_2$  isotherm under study shows small values of adsorption that increase steadily throughout the range of relative pressure from  $p/p_0 = 0.0$  to 1.0. Furthermore, it does not display the typical point of inflection (called Point B) indicative of the completion of a monolayer in the adsorption of  $\text{N}_2$  by non-porous solids. Accordingly, it is apparent that the adsorption of  $\text{N}_2$  on



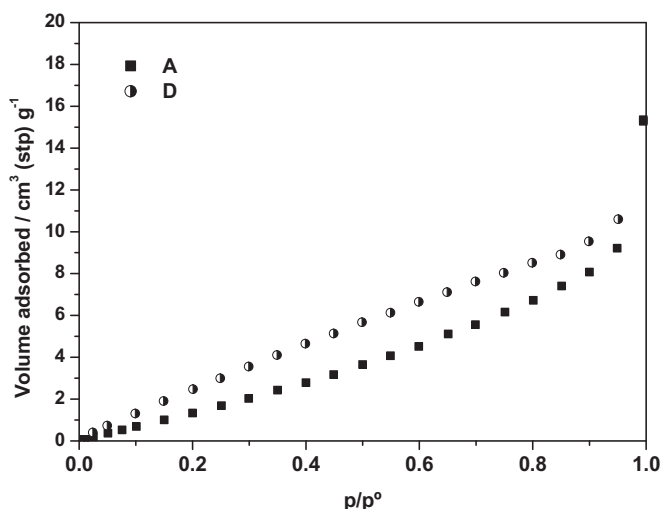


Fig. 5. Adsorption-desorption isotherm of  $N_2$  at  $-196^\circ\text{C}$ .

charcoal particles is controlled, not by the monolayer/multilayer mechanism, but by the diffusion of the adsorbate through a very constricted porosity of the adsorbent, with the resulting strong hindrance affecting the adsorption and desorption equilibria. The values of SBET and the pore volumes given in Table 3 indicate that the carbon adsorbent acts as a practically non-porous material. Notice that it only possesses a slightly developed macroporosity, with the volume of macropores amounting to  $\sim 90\%$  of the total pore volume present in the sample. The pore size distribution in the macropore range is fairly homogeneous since the radius of most pores is greater than  $100\,000\text{ \AA}$ . As expected for non-porous solids,  $\rho_{\text{Hg}} \sim \rho_{\text{He}}$ . Nevertheless, that  $\rho_{\text{Hg}}$  is slightly greater than  $\rho_{\text{He}}$  is attributable to the penetration of mercury into macropores after the indispensable evacuation of the sample-containing glass holder prior to filling it with mercury up to the calibration mark.

### 3.2. Biomethanation

Table 4 lists the results of the two laboratory trials. As can be seen, they had the same hydraulic retention time (HRT) of 14 days, and the results reported here are those following 168 days (12 HRT) of operation. Currently, the two trials are still active. The AD studies that we have consulted in the literature generally have a temporal duration of some 2–3 HRT, and, if the AD reaction is not stable, inhibition usually appears after that relatively short time. In our case, due to the prolonged time of experimental simulation (12 HRT), we can affirm that the bioreaction is stable.

The results showed greater biogas production when charcoal was present ( $35.46\text{ Nm}^3\text{ biogas/m}^3\text{ substrate}$ ) than in the control experiment ( $31.40\text{ Nm}^3\text{ biogas/m}^3\text{ substrate}$ ); i.e., an increase of almost 13% with the charcoal. This is due to the increase in the population of bacteria because they have more surface available to

adhere to inside the reactor when the charcoal is present. In addition, and very importantly, the biogas is of greater quality when alveolar material is present in the reactor – from 64.25%  $\text{CH}_4$  in the control reactor case to 72%  $\text{CH}_4$  in the charcoal-containing reactor case (Table 4). However, the percentage of COD degradation was basically the same: 50% vs 52% in the control experiment (Table 4).

With respect to the amount of methane produced, there was a 27.05% increase for the charcoal-containing reactor over the control reactor. Such an increase in methane production can be a determining factor when it comes to any economic viability analysis, since it can mean that an industrial waste-biomethanation project that is in principle unprofitable can become economically viable if a certain amount of carbon is added to the content of the digester.

In addition, the charcoal addition led to slightly higher pH values than in the control experiment (Table 4). This favours the growth of the methanogenic bacteria since their optimal growth corresponds to pH's in the interval 6.5–8.

There was a major increase in alkalinity (to  $7.02\text{ gCaCO}_3/\text{L}$ ), and the VFA/alkalinity ratio was 0.34, much less than 1, which means that the addition of charcoal in a concentration of 1 g/L of substrate eases the treatment of this waste with a great capacity to neutralize acids.

During this long experimental simulation, we observed a gradual decrease in biogas generation. We would associate this with degradation in the adherence capacity of the porous material. At 11 HRT (approximately 6 months), the volume of biogas production (mL) had decreased by approximately 31%, so that the decision was made to introduce new porous material at the same concentration as initially (1 g/L of substrate) to replace the old.

Another important result was the lowered hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ) content in the charcoal-containing reactor with respect to the control reactor: from  $2021.5 \pm 497.1\text{ ppm}$  (control) to  $1319.1 \pm 736.1\text{ ppm}$  (with charcoal), i.e., a mean reduction of 34.7%. Hydrogen sulfide is created naturally by decaying organic matter during AD. Unlike the standard techniques which use activated carbon to remove hydrogen sulfide from the stream of biogas already generated from the digester, the removal of  $\text{H}_2\text{S}$  here takes place inside the digester, in an aqueous medium, under anaerobic conditions, at a temperature of  $38^\circ\text{C}$ , and close to atmospheric pressure.

### 3.3. Charcoal as an adsorbent

Studies of the co-existence of methanogenesis and sulphate ion reduction with organic substrates in estuarine sediments have shown that sulphate ions greatly retard methanogenesis when hydrogen or acetate form the substrate, whereas these same substrates stimulate sulphate reduction [28]. With estuarine sediments incubated with acetate and lactate, methanogenesis rates are two orders of magnitude lower than those of sulphate reduction, suggesting a higher affinity of sulphate reducing bacteria for the substrates available [29]. In the present study, it follows from the results described above that the biomethanation of mixed organic

Table 3  
BET surface area, pore volumes and densities.

$S_{\text{BET}}^a$	$W_0^a$	$V_{\text{mi-na}}^a$	$V_{\text{me-na}}^a$	$V_{\text{me-mp}}^b$	$V_{\text{ma-mp}}^b$	$V_{\text{T}}^c$	$\rho_{\text{He}}$	$\rho_{\text{Hg}}$
$\text{M}^2\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	$\text{g cm}^{-3}$	$\text{g cm}^{-3}$
11.800	0.001	0.001	0.013	0.009	0.074	0.084	1.440	1.550

<sup>a</sup>  $N_2$  adsorption isotherm:  $S_{\text{BET}}$ , BET surface area;  $W_0$ , micropore volume (Dubinin-Radushkevich equation);  $V_{\text{mi-na}}$ , micropore volume ( $V_{\text{ad}}$  at  $p/p^0 = 0.10$ ,  $V_{\text{ad}}$  = volume adsorbed);  $V_{\text{me-na}}$ , mesopore volume ( $V_{\text{ad}}$  at  $p/p^0 = 0.95 - V_{\text{ad}}$  at  $p/p^0 = 0.10$ ).  $W_0$ ,  $V_{\text{mi-ad}}$ , and  $V_{\text{me-na}}$  are expressed as liquid volumes.

<sup>b</sup> Mercury porosimetry:  $V_{\text{me-mp}}$ , mesopore volume;  $V_{\text{ma-mp}}$ , macropore volume.

<sup>c</sup>  $V_{\text{T}}$ , total pore volume ( $W_0 + V_{\text{me-mp}} + V_{\text{ma-mp}}$ ).

**Table 4**

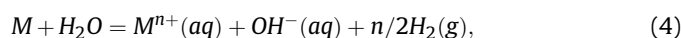
Results of the two long-term AD experiments.

Experiments		
Substrate: 20% sheep manure/80% cheese whey	Control (without charcoal)	Reactor containing charcoal
OLR (kg COD/m <sup>3</sup> reactor day)	3.89	3.89
HRT (days)	14.00	14.00
pH	7.67 ± 0.25	7.89 ± 0.11
VFA (g CH <sub>3</sub> COOH/L)	1.14 ± 1.03	2.39 ± 1.93
Alkalinity (g CaCO <sub>3</sub> /L)	4.76 ± 1.27	7.02 ± 1.32
Total COD (g O <sub>2</sub> /L)	62.12 ± 18.57	61.76 ± 14.70
Reduction in COD (%)	51.58	50.03
m <sup>3</sup> biogas/m <sup>3</sup> substrate (measured at 25 °C and atmospheric pressure)	31.32 ± 11.23	35.46 ± 9.54
% CH <sub>4</sub>	64.25 ± 4.19	72.00 ± 3.54
Increase in CH <sub>4</sub> production over the control trial (%)	–	27.05
H <sub>2</sub> S ppm	2021.50 ± 497.09	1319.07 ± 736.13
Inhibition (12 HRT)	Yes	No - currently continuing

waste in the presence of sulphate ions and added charcoal led to higher pH, a greater yield, and possibly an increase in H<sub>2</sub>S sequestration, showing that the charcoal acted as an adsorbent of the processes of methanogenesis and sulphate reduction. The process of methanogenesis is often described as simply the conversion of organic matter into methane as the end product:



and therefore the increase in pH is attributable to carbonate ion formation. This implies that the Reactions (1)–(3) move towards the right hand side, with Reaction (1) tending to increase the yield. Although bacteria may concentrate in large pores of charcoal and thus promote its biological action, the present carbon material is a non-porous solid since its macropore volume of 0.074 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> is low compared to the 0.2–0.8 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> typical of such carbon adsorbents as activated carbon [30], most of whose surface area corresponds to micropore walls. The charcoal's adsorbent action of the may also be connected with its chemical composition. As is well known, the even small amounts of inorganic matter present in carbonaceous materials may significantly influence their adsorptive characteristics, and have a strong catalytic effect on gasification processes [31]. Our EDX results showed two highly electropositive elements (K and Ca) to be present in the charcoal. This may entail an increase in pH, and favourably influence the biomethanation process in accord with the reactions:

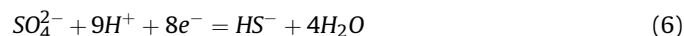


and hence

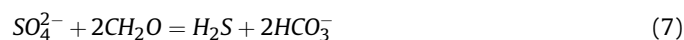


there by increasing the presence of CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> in the reaction medium.

Sulphate reduction may occur in the absence of organic matter by the reactions:



and



Reaction (6) involves the consumption of a substantial quantity of hydrogen ions, which should also tend increase the pH. And Reaction (7) would influence pH because of the generation of such chemical species as HS<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, which are acidic or amphoteric in character [32]. The electron donors needed for Reaction (6) may be the K and Ca present in the charcoal (adherent of bacteria). On the other hand, HS<sup>-</sup> and H<sub>2</sub>S dissolved in water should dissociate to S<sup>2-</sup>. With the aforementioned M<sup>n+</sup> ions, this ion forms metal sulfides such as K<sub>2</sub>S and CaS. The former is very soluble in water, while the latter undergoes hydrolysis to transform into H<sub>2</sub>S and Ca(OH)<sub>2</sub>. The latter is sparingly soluble in water (i.e., K<sub>sp</sub> = 5.02 × 10<sup>-6</sup> [33]). Although H<sub>2</sub>S is formed again, the fact that in the bulk of the solution the electrostatic interactions between S<sup>2-</sup> and HS<sup>-</sup>-M<sup>n+</sup> ions are stronger than those between H<sub>2</sub>S–H<sub>2</sub>O molecules, despite these being polar molecules bearing unshared electron pairs, should lead to an increased uptake of sulphur species in the bulk of the aqueous medium and thereby to a decreased H<sub>2</sub>S release from it. Thermodynamically, this would be accompanied by a release of heat and an increase of order in the system.

#### 4. Conclusions

The greatest energy yields were obtained using charcoal as a bacterial adhesion material. There was an increase of 27.82% in methane production compared with control experiment.

The pH increase is attributable to carbonate ion formation because the charcoal material under study is a non-porous solid.

The reduction of H<sub>2</sub>S may be due to electrostatic interactions between S<sup>2-</sup> and HS<sup>-</sup>-M<sup>n+</sup> ions and H<sub>2</sub>S–H<sub>2</sub>O molecules whose polarity leads to increased absorption of sulphur species.

The charcoal added to the biomethanation mixture studied acts as an adsorbent in the processes of methanogenesis and sulphate reduction.

#### Acknowledgements

Financial support from the Junta de Extremadura and the European Union (ERDF) through Project GR15146 and Project 0330\_IDERCEXA\_4\_E (INTERREG Program) and from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain through EMPLEA 2016 aids is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] Zhang C, Su H, Baeyens J, Tan T. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;38:383–92.
- [2] Krishania M, Kumar V, Kumar Vijay V, Malik A. Analysis of different techniques for improvement of biomethanation process: a review. *Fuel* 2013;106:1–9.
- [3] European Commission. [http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:8a8ef5e8-99a0-11e5-b3b7-01aa75ed71a1.0011.02/DOC\\_1&format=PDF](http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:8a8ef5e8-99a0-11e5-b3b7-01aa75ed71a1.0011.02/DOC_1&format=PDF;); [Accessed 15 June 2018].
- [4] Cuadros-Blázquez F, González-González A, Sánchez-Sánchez, Díaz-Rodríguez V, Cuadros-Salcedo F. Waste valorization as an example of circular economy in Extremadura (Spain). *J Clean Prod* 2018;181:136–44.
- [5] Appels L, Baeyens J, Degreè J. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog Energy Combust Sci* 2008;34:755–81.
- [6] Chauhan A, Ogram A. Evaluation of support matrices for immobilization of anaerobic consortia for efficient carbon cycling in waste regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327(3):884–93.
- [7] Yang Y, Tada C, Shohidullah M, Tsukahara K, Yagishita T, Sawayama S. Influence of bed materials on methanogenic characteristics and immobilized

- microbes in anaerobic digester. *Mater Sci Eng* 2004;241:413–9.
- [8] Bertin L, Berselli S, Fava F, Petrangeli-Papini M, Marchetti L. Anaerobic digestion of olive mill wastewaters in biofilm reactors packed with granular activated carbon and “Manville” silica beads. *Water Res* 2004;38:14–5.
- [9] Borja R, Sánchez E, Weiland P, Travieso L, y Martín A. Effect of natural zeolite support on the kinetics of cow manure anaerobic digestion. *Biomass Bioenergy* 1993;5(5):395–400.
- [10] Dhaked RK, Ramana KV, Tomar A, Waghmare C, Kamboj DV, Singh L. Immobilization of anaerobic bacteria on rubberized-coir for psychrophilic digestion of night soil. *Anaerobe* 2005;11(4):217–24.
- [11] Gong W, Liang H, Li W, Wang Z. Selection and evaluation of biofilm carrier in anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Energy* 2011;36:3572–8.
- [12] Luo C, Lu F, Shao L, He P. Application of eco-compatible biochar in anaerobic digestion to relieve acid stress and promote the selective colonization of functional microbes. *Water Res* 2015;68:710–8.
- [13] Weber K, Quicker P. Properties of biochar. *Fuel* 2018;217:240–61.
- [14] Woolf D, Amonette JE, Street-Perrott FA, Lehmann J, Joseph S. Sustainable biochar to mitigate global climate change. *Nat Commun* 2010;1:1–9.
- [15] Mumme J, Srocke F, Heeg K, Werner M. Use of biochars in anaerobic digestion. *Bioresour Technol* 2014;164:189–97.
- [16] Torri C, Fabbri D. Biochar enables anaerobic digestion of aqueous phase from intermediate pyrolysis of biomass. *Bioresour Technol* 2014;172:335–41.
- [17] Shen Y, Linville JL, Ignacio-de Leon PA, Schoene RP, Urgan-Demirtas M. Towards a sustainable paradigm of waste-to-energy process: enhanced anaerobic digestion of sludge with woody biochar. *J Clean Prod* 2016;135:1054–64. [http://www2.montes.upm.es/Dptos/Dsrn/SanMiguel/PUBLICACIONES/2006/2010/2008\\_Selvicultura%20de%20dehesas\\_Compendio\\_selvicultura\\_rev.pdf](http://www2.montes.upm.es/Dptos/Dsrn/SanMiguel/PUBLICACIONES/2006/2010/2008_Selvicultura%20de%20dehesas_Compendio_selvicultura_rev.pdf). [Accessed 3 July 2018].
- [18] Extremadura forest systems and resources. 2018. [http://extremambiente.juntaex.es/pdf/BosquesCap15\\_peq.pdf](http://extremambiente.juntaex.es/pdf/BosquesCap15_peq.pdf). [Accessed 12 June 2018].
- [19] Watanabe R, Tada C, Baba Y, Fukuda Y, Nakai Y. Enhancing methane production during the anaerobic digestion of crude glycerol using Japanese cedar charcoal. *Bioresour Technol* 2013;150:387–92.
- [20] Qatibi Al, Borjes A, Garcia JL. Sulfate reduction and anaerobic glycerol degradation by a mixed microbial culture. *Curr Microbiol* 1991;22(1):47–52.
- [21] Sánchez-Sánchez C, González-González A, Cuadros-Salcedo F, Cuadros-Blázquez F. Using low-cost porous materials to increase biogas production: a case study in Extremadura (Spain). *J Clean Prod* 2018;198:1165–72.
- [22] Shiozawa S, Campbell GS. Soil thermal conductivity. *Rem Sens Rev* 1990;5(1):301–10.
- [23] Raposo F, Borja R, Sánchez E, Martín MA, Martín A. Performance and kinetic evaluation of the anaerobic digestion of two-phase olive mill effluents in reactors with suspended and immobilized biomass. *Water Res* 2004;38:2017–26.
- [24] APHA, AWWA, WPCF. Standard methods for the analysis of drinking and waste water. Madrid: Díaz de Santos S.A; 1992 (in Spanish).
- [25] González-González A, Cuadros-Blázquez F. Continuous biomethanization of agrifood industry waste: a case study in Spain. *Process Biochem* 2013;2013(48):920–5.
- [26] Moreno L, González-González A, Cuadros-Salcedo F, Cuadros-Blázquez F. Feasibility of a novel use for agroindustrial biogas. *J Clean Prod* 2017;144:48–56.
- [27] Oremland RS, Polcin S. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* 1982;44(6):1270–6.
- [28] Sela-Adler M, Ronen Z, Herut B, Antler G, Vigderovich H, Eckert W, Sivan O. Co-existence of methanogenesis and sulfate reduction with common substrates in sulfate-rich estuarine sediments. *Front Microbiol* 2017. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00766/full>. [Accessed 15 June 2018].
- [29] Cookson Jr JT. Adsorption mechanisms: the chemistry of organic adsorption on activated carbon. In: Cheremisinoff PN, Ellerbusch F, editors. *Carbon adsorption handbook*. Ann Arbor Science; 1908. p. 241–79.
- [30] Smisek M, Cerny S. Active carbon: manufacture, properties and applications. Amsterdam: Elsevier; 1970.
- [31] Kousi P, Remoundaki E, Hatzikioseyian A, Tsezos M. Sulphate-reducing bioreactors: current practices and perspectives. In: IWA balkan young water professional conference, thessaloniki, Greece, may 10-12; 2015. p. 409–17. In: 2005-2006. In: Lide DR, editor. *CRC handbook of chemistry and physics*. 86th Ed. Boca Raton: Taylor & Francis; 2005.



# ANEXO IV

## Referencia

Consolación Sánchez Sánchez, Mercedes Aranda Medina, Alicia Rodriguez, Alejandro Hernández, María G. Córdoba, Francisco Cuadros Blázquez, Santiago Ruiz Moyano. 2022. Development of real-time PCR methods for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina* and *Methanobacterium* in anaerobic digestion. Journal of Microbiological Methods 199, 106522. DOI: 10.1016/j.mimet.2022.106529.

## Derechos de autor

No es necesario el permiso de la editorial. Como autor de un artículo publicado en una revista de Elsevier, conserva el derecho de incluirlo en una tesis o disertación, siempre que no se publique comercialmente. La publicación formal del artículo puede encontrarse a través del siguiente enlace: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106529>.





## Development of real-time PCR methods for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina* and *Methanobacterium* in anaerobic digestion

Consolación Sánchez-Sánchez<sup>a</sup>, Mercedes Aranda-Medina<sup>b</sup>, Alicia Rodríguez<sup>c,\*</sup>, Alejandro Hernández<sup>c</sup>, María G. Córdoba<sup>c</sup>, Francisco Cuadros-Blázquez<sup>a</sup>, Santiago Ruiz-Moyano<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Física Aplicada, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Avda. de Adolfo Suárez S/n, 06007 Badajoz, Spain

<sup>b</sup> Expresión Gráfica, Escuela de Ingenierías Industriales, Campus Universitario, Avda de Elvas sn, 06006 Badajoz, Spain

<sup>c</sup> Instituto Universitario de Investigación de Recursos Agrarios (INURA), Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Avda. Adolfo Suarez, s/n, 06071 Badajoz, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Primer  
Real-time quantitative PCR  
Methanogenic archaea  
Anaerobic digestion  
Microbial community

### ABSTRACT

Anaerobic digestion is a growing technology to manage organic waste and produce bioenergy. To promote this technology, it is essential to know, at the molecular level, the dynamics of microbial communities, specifically the methanogenic community. In the present study, three primer pairs were selected from seven primer pairs which were designed and tested with different concentrations and conditions to detect *Methanosarcina*, *Methanoculleus* and *Methanobacterium* by real-time PCR based on the SYBR Green System. The functionality of the developed methods was demonstrated by the high linear relationship of the standard curves, and the specificity of each primer was empirically verified by testing DNA isolated from methane-producing and non-producing strains. These assays also exhibited good repeatability and reproducibility, which indicates the robustness of the methods. The described primers were successfully used to investigate the methanogenic communities of 10 samples from an anaerobic co-digestion. The genus *Methanosarcina* was the dominant methanogenic group.

### 1. Introduction

Climate change is currently one of the greatest challenges. The increase in greenhouse gas emissions, caused mainly by the burning of fossil fuels to ensure access to energy, creates an urgent need to find alternatives such as bioenergy from wet biomass waste (Ali et al., 2017; Baloch et al., 2018; Sameh and Jianzhong, 2019).

Anaerobic digestion (AD) of organic material to biogas has become an attractive strategy for biogas production (clean energy) and sustainable waste disposal. All waste products with a high moisture content, such as agri-food industry waste, agricultural and livestock waste, urban solid waste and sewage, are ideal substrates to produce biogas (Gang and Angelidaki, 2013). Anaerobic digestion proceeds via four steps, of which the last one is carried out by specialised groups of methane-producing archaea (methanogens) (Gujer and Zehnder, 1983; Díaz-Báez et al., 2002). Methanogens are classified as acetoclastic or hydrogenotrophic and belong to the kingdom of Euryarchaeota in the

domain of Archaea. They are characterised by their ability to produce methane under anaerobic conditions; phylogenetically, they can be divided into five orders, namely Methanobacteriales, Methanococcales, Methanosarcinales, Methanopyrales and Methanomicrobiales (Boone et al., 1993).

Methanobacteriales, Methanococcales and Methanomicrobiales belong to hydrogenotrophic orders. Methanosarcinales can be acetolactic or hydrogenotrophic, and Methanopyrales has only hyperthermophilic member species and will not be considered further (Karakashev et al., 2005).

Although the exact composition of the variable methanogenic biocoenosis seems to be dependent on substrate composition and process parameters, such as temperature (Kratat et al., 2010) and volatile fatty acid concentration (Karakashev et al., 2005; Hori et al., 2006), certain microbial taxa have been identified repeatedly. Species of the hydrogenotrophic genera *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* and *Methanosarcinales* are frequently reported to be present (Bauer et al.,

\* Corresponding author.

E-mail address: [aliciarj@unex.es](mailto:aliciarj@unex.es) (A. Rodríguez).

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106529>

Received 26 April 2022; Received in revised form 18 June 2022; Accepted 22 June 2022

Available online 27 June 2022

0167-7012/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.



2008; Klocke et al., 2008; Munk et al., 2010; Nettmann et al., 2010). Their identification and quantification are important since the stability and speed of the process depend on them. For this task, it is necessary to apply rapid and sensitive molecular methods to monitor and control the biotechnological process (García et al., 2000).

Most methods for rapid and systematic identification of prokaryotes have been developed primarily for bacteria (Cleland et al., 2008; Doan et al., 2012; Aubertheau et al., 2017). An exhaustive bibliographic search, there are few references regarding the optimisation of methods to detect and quantify specific microbial groups responsible for anaerobic digestion, such as Methanobacteriales, Methanomicrobiales and Methanosarcinales (Franke-Whittle et al., 2009; Hagen et al., 2014).

Detection and quantification via quantitative PCR (qPCR) are appropriate methods to reveal conditions and alterations within microbial communities. The qPCR allows the rapid, reproducible and sensitive detection and quantification of specific microbial populations from an environmental sample (Yu et al., 2005; Yu et al., 2006; Franke-Whittle et al., 2009). Unlike conventional PCR-based methods, such as DGGE and T-RFLP, this method does not only detect the presence of target sequences but also quantifies their absolute numbers (Kim et al., 2013).

Today's most established detection systems in qPCR applications are amplicon quantification with the dsDNA-binding SYBR Green dyes and the more specific approach via a detection probe (e.g., TaqMan probes). The latter detection systems have the possibility of multiplexing however they are substantially more expensive than SYBR Green-based systems and sometimes more difficult to optimise (Zhang and Fang, 2006; Reitschuler et al., 2014).

Although qPCR assays are being increasingly used in microbial ecology, the application of the method to the field of anaerobic digestion is highly limited or out of date (Yu et al., 2006; Franke-Whittle et al., 2009; Paszczynski et al., 2011). In particular, studies have referred to the quantification of methanogenic *Archaea* in other ecosystems (Parameswaran et al., 2009; Saikaly et al., 2010; Tang et al., 2013). Only, Lee et al. (2011) studied the effect of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion.

The aims of the present study were based on the development of a SYBR Green-based qPCR protocols that allow the detection and quantification of the most relevant members of the methanogenic communities of anaerobic digesters, namely *Methanoculleus*, *Methanobacterium* and *Methanosarcina*. The specificity, sensitivity, reproducibility, repeatability, and applicability of the three optimised qPCR methods were also evaluated.

## 2. Material and methods

### 2.1. Methane-producing archaea strains

The three type strains *Methanoculleus bourgensis* DSMZ 8220, *Methanobacterium formicicum* DSMZ 1535 and *Methanosarcina barkeri* DSMZ 1538, belonging to the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), were used for qPCR optimisation. Strains from the families Methanomicrobiaceae, Methanobacteriaceae and Methanosarcinaceae have been found in tests carried out in our own biogas-producing reactors at laboratory level and characterised by conventional cultural and molecular techniques. Strains *M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 and *M. barkeri* DSMZ 1538 were purchased as active grown culture and preserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  in glycerol until DNA extraction.

### 2.2. DNA extraction

The DNA extraction was performed with the NucleoSpin Microbial DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA obtained was eluted in 50  $\mu\text{L}$  of elution buffer BE and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The purity and concentration of

the DNA extracted from each strain were measured with an ultraviolet spectrometer (NanoDrop™ 2000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA). The  $A_{260/280}$  and  $A_{260/230}$  ratio determined the purity and the absence of contamination of the samples. The theoretical gene copy numbers which it corresponds to for each standard size was calculated.

### 2.3. Primer design

Various primer pairs were designed to specifically detect and quantify individually *Methanoculleus*, *Methanobacterium* and *Methanosarcina* bacteria, as shown in Table 1. For this, available partial sequences of 16S rRNA of *Methanoculleus* (AB065297, M59142.1, NR\_042786.1), *Methanobacterium* (AY386124, AF169245, MT889736.1, EU333914.2, CP002772.1, CP002551.1, CP006933.1) and *Methanosarcina* (M59137, CP009512.1, CP032683.1, CP042908.1, M59144.1) retrieved from the Ribosomal Database Project (RDP-II), were edited and aligned by the Clustal Omega resource from the EMBL European Bioinformatics Institute (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Alignment showed conserved regions between the sequences used, which were employed to design the respective primer pairs using the Primer3Plus software (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>; Rozen and Skaletsky, 2000). After designing qPCR primers, an *in-silico* validation was conducted to confirm the specificity of the primers by aligning the sequences of the primers with published sequences of 16S rRNA of reference strains of the three target genera using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) as indicated in Table 1. The primers were HPLC grade and manufactured by Invitrogen by Thermo Fisher Scientific (Madrid, Spain).

### 2.4. Optimisation of real-time PCR conditions

The StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, United States) was used for qPCR amplification and detection. The qPCR was prepared in triplicate of 12.5  $\mu\text{L}$  reaction mixture in MicroAmp optical 96-well reaction plates and sealed with optical adhesive covers (Applied Biosystems). Three replicates of a control sample without DNA template were also included in the runs. All primers pairs designed in this work were evaluated in several SYBR Green protocols to optimise the qPCR mix and conditions. Briefly, the reaction mixtures for the amplification of each gene consisted of 6.25 of NZY qPCR Green Master Mix 2 $\times$  (NZYTech, Lisbon, Portugal), 2.5  $\mu\text{L}$  of DNA template (aprox.  $10^4$  gene copy numbers) and different concentrations of each primer. For this, the target strains *M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 and *M. barkeri* DSMZ 1538 were used. To optimise the primer concentration, 7 different concentrations, namely 300, 150, 75, 50, 25, 10 and 5 nM, were tested. To optimise qPCR conditions, different annealing temperatures and times were assayed ranging from 58 to 62  $^{\circ}\text{C}$  and from 30 s to 1 min. The optimal SYBR Green qPCR conditions to test the efficacy of the primers were, in all cases, a single step of 10 min at 95  $^{\circ}\text{C}$ , 40 cycles of 95  $^{\circ}\text{C}$  for 15 s and 60  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min, followed by the melting curve analysis of the PCR products consisting in a slow ramp between 60 and 95  $^{\circ}\text{C}$  in increments of 0.3  $^{\circ}\text{C}$  for 15 s. After the final PCR cycle, melting curve analyses of the PCR products were conducted, and the values of the melting temperatures were checked to ensure the reliability of the results and the specificity of the primers.

The quantification cycle (C<sub>q</sub>) value, corresponding to the PCR cycle number at which fluorescence was detected above threshold, was calculated automatically by the software StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). All assays were carried out in triplicate.

### 2.5. Standard curves, sensitivity and specificity

Standard curves were obtained for the three methanogenic strains. For this quantified DNA from strains *M. bourgensis* DSMZ 8220,



**Table 1**  
Nucleotide sequence of primers designed used for SYBR Green qPCR assays.

Strain	Primer name	Sequence (5'-3')	Position	Amplicon size
<i>Methanoculleus bourgensis</i> DSMZ 8220	Mmic-F1	TCTGAGACACGAATCCAGGC	214 <sup>a</sup>	78
	Mmic-R1	GTTCCCTTATCACGGTTGCC	272 <sup>a</sup>	
	Mmic-F2	CTCTGGGAAATCTGGCAGC	494 <sup>a</sup>	68
	Mmic-R2	TCTCCGGTTCCTAGATTGC	446 <sup>a</sup>	
	Mmic-F3	AGGCGTCTAAGAGATACTGGC	509 <sup>a</sup>	59
	Mmic-R3	GAAGTACCCCTCACCTCTCC	475 <sup>a</sup>	
	Mmic-F4	CGAAAACCTTACAATGCGGGC	254 <sup>a</sup>	79
	Mmic-R4	GTTTTAGACACCCAGACAGCC	312 <sup>a</sup>	
<i>Methanobacterium formicicum</i> DSMZ 1535	Mbact-F	GACCCACGCCCTTAGTTACC	874973 <sup>b</sup>	71
	Mbact-R	GTTTATCACTGGCGGTCCCC	875024 <sup>b</sup>	
<i>Methanosarcina barkeri</i> DSMZ 1538	Msar-F	GGCGCGAAAACCTTACAATGC	39753 <sup>c</sup>	193
	Msar-R	AGACCCAATAATCAGATCACC	39925 <sup>c</sup>	
	Msy-F	CCTGAATCGCTGAGAGGAGG	1351622 <sup>c</sup>	128
	Msy-R	CAGAGTACCCATCATCCCGG	1351730 <sup>c</sup>	

Forward primer (F), reverse primer (R).

<sup>a</sup> Positions are in accordance with the published sequence *Methanoculleus bourgensis* MS2 (GeneBank accession no. NR\_042786.1).

<sup>b</sup> Positions are in accordance with the published sequence *Methanobacterium paludis* strain SWAN1 (GeneBank accession no. CP002772).

<sup>c</sup> Positions are in accordance with the published sequence *Methanosarcina mazei* S-6 (GeneBank accession no. CP009512.1).

*M. formicicum* DSMZ 1535 and *M. barkeri* DSMZ 1538 was used as stock solution.

The stock solutions were serially diluted by a factor of 10, and an aliquot of each dilution, with concentrations ranging from  $5 \times 10^5$  to 5 gene copy numbers for each reference strain, was used as standard during each setup of the qPCR reaction. Individual standard curves with each of the three methane-producing strains were carried out in triplicate.

The criteria considered for reliability of the designed methods were the correlation coefficient ( $R^2$ ) and the amplification efficiency calculated from the formula  $E = 10^{-1/S} - 1$  ( $S$  is the slope of the linear fit) (Rodríguez et al., 2016; Probst et al., 2021). The limit of detection (LOD) of the qPCR protocols was also determined; it corresponds to the lowest standard concentration of template DNA that produced at least 95% positive replicates in a dilution assay.

The specificity of the three primer pairs was tested on a fixed amount of gene copy number ( $10^4$  16S rRNA copy numbers). To conduct the specificity tests, the three reference strains (*M. bourgensis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 and *M. barkeri* DSMZ 1538) and twelve strains belonging to species commonly found in sludge (see Table 3). Besides, to evaluate the specificity of the primers designed for the SYBR Green assay, the melting temperature ( $T_m$ ) was automatically calculated and compared with that deduced from the sequence of the expected fragment (Rodríguez et al., 2012). In all cases, the qPCR reactions were carried out as described in Section 2.4.

## 2.6. Reproducibility and repeatability

In this study, repeatability (defined as the precision determined under conditions where the same methods and equipment are used by the same operator to make measurements on identical specimens) and reproducibility (defined as the precision determined under conditions where the same methods but different equipment or laboratories are used, or different operators are involved) were tested (Rodríguez et al., 2012). For the repeatability tests, three samples were treated by the same operator and analysed in the same equipment (StepOne™ Real-Time PCR System).

In the reproducibility assays, three samples were treated by the same operator with two different qPCR systems (StepOne™ Real-Time PCR System and 7300 Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, California, USA) located in the University of Extremadura, and five samples were treated by two different operators and analysed in the same laboratory and with the same equipment. In both assays, DNA was extracted as described in Section 2.2 and subjected to the qPCR protocols designed as described in Section 2.4. The Cq values for samples

were obtained from standard curves previously built. Three samples of negative controls were included in each experiment.

## 2.7. Applicability of the developed qPCR method

The applicability of the optimised qPCR protocols to detect and quantify the three methane-producing species was tested using different samples of a digested sludge from a laboratory-scale mesophilic reactor (capacity of the reactor 2 L). The digestate samples were from an anaerobic co-digestion of organic waste from the tomato industry. For this, 10 mL of sludges were freeze-dried (Lyobeta, Azbil Telstar Technologies S.L.U.) and 0.18 g of freeze-dried sludges were used for DNA extraction using a NucleoSpin DNA Stool kit (Macherey-Nagel). DNA purity and contamination were determined as described in Section 2.2. The presence of the three different methane-producing species was quantified with The StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) under the optimised conditions. Subsequently, the mean Cq values of the three genera under study were obtained, and the gene copy numbers of each genus were obtained with the calibration curves built as explained in Section 2.5. Next, the percentage of the presence of each genus in the samples was calculated assuming that 100% of the microbial population of the sludges was only composed of the genera *Methanoculleus*, *Methanobacterium* and *Methanosarcina*. Based on the literature, the most predominant methanogenic genera in this type of sludge are *Methanosarcina*, followed by *Methanoculleus* and *Methanobacterium* (Schlüter et al., 2008; Shin et al., 2011; Cadillo-Quiroz et al., 2014). Finally, to ensure the truthfulness of the results, an inhibition assay by mixing DNA amounts of each of the three target microorganisms and DNA amounts extracted from sludge (100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100) was done.

## 2.8. Statistical analysis

For the statistical treatment, the software IBM SPSS Statistic version 20 (IBM, USA) was used. One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to determine significant differences within and between groups in the repeatability (days, operators) and reproducibility assays. Tukey's test was applied to compare the mean values. Statistical significance was established at  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Selection of primer pairs and optimisation of qPCR mix and conditions

The selection of the best primer pair, for each methane-producing genus, was mainly based on the analysis of the melting curves and the presence of primer dimers for each of the primers designed, whose results are included in Table 2. Analysis of the dissociation curves showed just one amplicon and the absence of primer dimers in the case of the primer pairs Mmic -F2/R2, Mmic -F3/R3, Mbac-F/R and Msy-F/R at 300 nM each. The remaining primer pairs and concentrations resulted in more than one amplicon or primer dimers. The primer pairs Mmic -F1/R1 at 300 nM and Msy-F/R at 150 nM did not produce any amplification products. The Cq values ranged between 12.07 and 27.22, depending on the primer pair used (Table 2). The mean Cq values with their corresponding standard deviations were used to select the best primer pair to identify *Methanoculleus*, being the primer pair Mmic-F2/R2 chosen.

The criteria used to select the different pairs of primers were the same as those used by Yu et al. (2005) and Rodríguez et al. (2015). The T<sub>m</sub> of the primers was about 60 °C with a difference between the primers T<sub>m</sub> of each pair lower than 2 °C. The percentage of G + C bases was adjusted to be between 40% and 70%. Primers with a strong possibility of either self-complementarity or formation of dimers were excluded. Primers with more than two degenerated bases were also rejected. However, the primer concentration selected was lower than those chosen by Yu et al. (2005), because in this study, the primer pairs have been designed to perform qPCR methods with SYBR Green and not with probes, and primer dimers should be avoided to increase specificity (Asakawa and Nagaoka, 2003).

Therefore, the primers targeting the 16S rRNA gene Mmic-F2/R2, Mbac-F/R and Msy-F/R at the concentration of 300 nM each were selected to quantify *Methanoculleus*, *Methanobacterium* and *Methanosarcina* because they showed a single amplified product and no primer dimers in the analysis of the melting curves in the SYBR Green methodology as well as optimal Cq values. For Mmic-F2/R2, Mbac-F/R and Msy-F/R, the T<sub>m</sub> values were 84.90 ± 0.18 °C, 83.80 ± 0.21 °C and 84.48 ± 0.14 °C, with Cq values of 15.42 ± 0.79, 12.07 ± 0.07 and 12.90 ± 0.40, respectively (Table 2).

These Cq values were slightly higher than those obtained by other studies in which qPCR was performed to quantify methane-producing archaea (Zhang and Fang, 2006; Reitschuler et al., 2014). However, this was not an impediment to obtaining suitable primers able to amplify specific PCR products from the different nucleotide sequences since a unique peak was obtained in all melting curves. Moreover, this selection

methodology has been widely used in previous studies with satisfactory results (Rodríguez et al., 2016; Bernaldez et al., 2017).

The optimised SYBR Green protocol was carried out in a final volume of 12.5 µL, containing 2.5 µL of template DNA (1:10), 6.25 µL of NZY qPCR Green Master Mix 2×, 0.375 µL (10 µM) of forward primer, 0.375 µL (10 µM) of reverse primer and 3 µL of H<sub>2</sub>O-grade PCR.

After testing different thermal cycling conditions for each of the primer pairs, following the study by Timmers et al. (2017), the optimal thermal cycling conditions were 1 cycle at 95 °C for 10 min and 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. With the optimised conditions, three PCR products with expected sizes of 123, 73 and 62 bp were obtained using the specific protocols to detect *Methanoculleus*, *Methanobacterium* and *Methanosarcina*, respectively.

#### 3.2. Specificity of real-time PCR reactions

The success in developing qPCR protocols depends on the suitability of the designed primers, since the specificity of the technique is closely related to the annealing of primers to their complementary targets (Bustin, 2000). For this, the correct selection of the targeted sequence of nucleic acid is essential (Sobhy and Colson, 2012). The specificity of primers was tested using DNA of the methane-producing strains (*M. bourgenis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 and *M. barkeri* DSMZ 1538) and DNA from twelve strains belonging to species that commonly can be found in sludge (see Table 3).

In the SYBR Green methods, only *M. bourgenis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 and *M. barkeri* DSMZ 1538 showed specific PCR products with T<sub>m</sub> values of 84.90 ± 0.11 °C, 83.80 ± 0.35 °C and 84.50 ± 0.01 °C for their respective primer pairs (Table 3). The melting point analysis showed that the T<sub>m</sub> values of the remaining strains differed from the specific ones.

Regarding Cq values obtained with the developed qPCR methods, *M. bourgenis* DSMZ 8220, *M. formicicum* DSMZ 1535 and *M. barkeri* DSMZ 1538 showed Cq values of 12.05 ± 0.44, 12.35 ± 0.70 and 13.34 ± 0.31, respectively (Table 3). In addition, in methods for detection of *Methanobacterium* and *Methanosarcina*, some of the strains produced non-specific amplification (Table 3). These results confirm the specificity of the three methods. Other studies did not find specific primers for detecting members of the genus *Methanoculleus* or primers designed for identify *Methanosarcina* did not work specifically with SYBR Green real-time PCR (Franke-Whittle et al., 2009).

#### 3.3. Standard curves, sensitivity and detection limits of qPCR

The ability of the optimised qPCR protocol to quantify the three types

**Table 2**  
Results of the different qPCR assays with the designed primers.

Genus	Primer pair	Primer concentration (nM)	Primer dimers	Number of amplicons	T <sub>m</sub> ± SD (°C)	Cq ± SD
<i>Methanoculleus</i>	Mmic -F1/R1	300	Yes	0	71.41 ± 1.27	>40
	Mmic -F1/R1	150	Yes	3	81.55 ± 0.01	>40
	Mmic -F1/R1	75	Yes	2	81.55 ± 0.00	>40
	Mmic -F1/R1	150/75	Yes	2	77.38 ± 7.38	>40
	Mmic -F1/R1	75/150	Yes	2	81.93 ± 0.11	>40
	Mmic -F1/R1	50	Yes	2	81.92 ± 0.11	>40
	Mmic -F1/R1	75	Yes	2	82.14 ± 0.00	>40
	<b>Mmic -F2/R2</b>	<b>300</b>	<b>No</b>	<b>1</b>	<b>84.90 ± 0.18</b>	<b>15.42 ± 0.79</b>
	Mmic -F3/R3	300	Yes	1	78.25 ± 0.42	>40
	Mmic -F4/R4	300	Yes	2	90.19 ± 0.01	>40
<i>Methanobacterium</i>	<b>Mbac-F/R</b>	<b>300</b>	<b>No</b>	<b>1</b>	<b>83.80 ± 0.21</b>	<b>12.07 ± 0.07</b>
	Mbac-F/R	150	Yes	3	83.27 ± 6.85	>40
<i>Methanosarcina</i>	Msar-F/R	300	Yes	3	85.41 ± 0.39	>40
	Msar-F/R	150	Yes	3	85.86 ± 10.05	>40
	<b>Msy-F/R</b>	<b>300</b>	<b>No</b>	<b>1</b>	<b>84.48 ± 0.14</b>	<b>12.90 ± 0.40</b>
	Msy-F/R	150	Yes	0	72.35 ± 6.63	>40

Forward primer (F), the reverse primer (R), Temperature melting (T<sub>m</sub>) and Threshold cycle number (Cq) were determined by qPCR assays with the corresponding set in triplicate. The calculated values were expressed as average ± standard deviation (SD). The selected primer pair and concentrations are highlighted in bold.

**Table 3**

Results obtained in the assay to test the specificity of the real time PCR protocols optimised to specifically quantify *Methanoculleus*, *Methanobacterium* and *Methanosarcina*.

Strains	Method for detection of <i>Methanoculleus</i>		Method for detection of <i>Methanobacterium</i>		Method for detection of <i>Methanosarcina</i>	
	Cq ± SD	Tm ± SD (°C)	Cq ± SD	Tm ± SD (°C)	Cq ± SD	Tm ± SD (°C)
<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220 <sup>a</sup>	<b>12.05 ± 0.44<sup>***</sup></b>	<b>84.90 ± 0.11</b>	23.77 ± 3.35	90.20 ± 0.21	17.12 ± 0.98	81.19 ± 0.58
<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535 <sup>a</sup>	>Cq NTC value	76.72 ± 0.11	<b>12.35 ± 0.70*</b>	<b>83.80 ± 0.35</b>	11.38 ± 2.99	85.96 ± 0.53
<i>M. barkeri</i> DSMZ 1538 <sup>a</sup>	>Cq NTC value	85.96 ± 0.11	>Cq NTC value	82.83 ± 0.11	<b>13.34 ± 0.31*</b>	<b>84.50 ± 0.01</b>
<i>Escherichia coli</i> CECT 4267 <sup>b</sup>	25.00 ± 0.06	82.50 ± 0.12	27.16 ± 0.06	82.91 ± 4.21	>Cq NTC value	83.95 ± 1.47
<i>Enterobacter cloacae</i> S46 <sup>c</sup>	>Cq NTC value	90.05 ± 0.02	22.66 ± 0.77	87.07 ± 0.00	>Cq NTC value	90.13 ± 0.10
<i>Citrobacter freundii</i> <sup>a</sup>	24.81 ± 0.30	87.46 ± 0.32	27.41 ± 0.23	88.05 ± 0.11	23.53 ± 0.10	88.49 ± 0.53
<i>Advenella</i> <sup>d</sup>	>Cq NTC value	76.72 ± 0.11	>Cq NTC value	77.84 ± 1.69	>Cq NTC value	84.77 ± 0.10
<i>Alkaliphilus hydrothermalis</i> <sup>d</sup>	>Cq NTC value	85.59 ± 0.00	>Cq NTC value	86.78 ± 0.11	>Cq NTC value	79.70 ± 0.11
<i>Alkaliphilus sp.</i> <sup>d</sup>	>Cq NTC value	79.26 ± 0.11	>Cq NTC value	89.83 ± 0.10	>Cq NTC value	82.46 ± 3.16
<i>Clostridium disporicum</i> <sup>d</sup>	>Cq NTC value	90.06 ± 0.21	>Cq NTC value	74.49 ± 7.70	>Cq NTC value	80.45 ± 5.37
<i>Alkaliphilus sp.</i> <sup>d</sup>	>Cq NTC value	75.98 ± 0.32	>Cq NTC value	81.49 ± 0.32	>Cq NTC value	79.40 ± 0.10
<i>Alkaliphilus sp.</i> <sup>d</sup>	>Cq NTC value	79.48 ± 0.00	27.02 ± 0.17	81.04 ± 0.10	17.63 ± 1.74	82.38 ± 3.47
<i>Acinetobacter sp.</i> <sup>d</sup>	>Cq NTC value	78.44 ± 2.11	25.37 ± 0.12	81.12 ± 0.11	17.52 ± 0.30	86.48 ± 2.11
<i>Lactobacillus paracasei</i> <sup>d</sup>	>Cq NTC value	81.94 ± 0.32	>Cq NTC value	80.45 ± 1.80	26.33 ± 0.29	85.84 ± 0.20
<i>Latilactobacillus sp.</i> <sup>d</sup>	>Cq NTC value	79.93 ± 0.63	>Cq NTC value	79.63 ± 0.04	27.73 ± 1.23	85.07 ± 0.74

Non-template control (NTC) Cq value was established in 31–32 cycles.

<sup>a</sup> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Wolfenbüttel, Germany).

<sup>b</sup> Spanish Type Culture Collection (CECT; Valencia, Spain).

<sup>c</sup> Food Quality and Microbiology Research group collection (CAMIALI; Badajoz, Spain).

<sup>d</sup> Strains isolated from organic waste from the tomato industry.

<sup>e</sup> Data represent the mean quantification cycle (Cq) ± standard deviation (SD) of the 3 independent experiments each consisting of triplicate samples. Those Cq values and Tm values in bold means that the amplified PCR product was specific.

of methane-producing archaea was evaluated. For this, standard curves plotting Cq values versus the log DNA of the strains *M. barkeri* DSMZ 1538, *M. bourgensis* DSMZ 8220 and *M. formicicum* DSMZ 1535 were generated; the slopes of the linear regression equations were – 3.88, –3.43 and – 3.19, respectively. The amplification efficiencies for *Methanoculleus*, *Methanobacterium* and *Methanosarcina* were 81, 96 and 106%, respectively. In addition, the  $R^2$  values of all standard curves were higher than 0.99 (Table 4), which indicates good optimisation of the qPCR reactions and that no errors occurred in this process (Fredlund et al., 2008; Shigematsu et al., 2003; Sean et al., 2010; Sturza et al., 2021).

A good linear correlation was obtained over the range  $8.6 \times 10^6$  to  $8.6 \times 10^2$  gene copies for *Methanoculleus*, from  $3.3 \times 10^6$  to  $3.3 \times 10$  gene copies for *Methanobacterium* and from  $6.1 \times 10^5$  to  $6.1 \times 10$  gene copies for *Methanosarcina*, per reaction, for qPCR assays (Table 5).

The detection limit was  $\approx 3.1 \times 10$  gene copies ( $1.7 \times 10^2$  copies/mL of reactor effluent) for *Methanoculleus*,  $2 \times 10$  gene copies ( $1.1 \times 10^2$  copies/mL of reactor effluent) for *Methanosarcina* and 3.7 gene copies ( $2.1 \times 10$  copies/mL of reactor effluent) for *Methanobacterium* in the optimised qPCR methods. The primers targeting the sequence encoding *Methanobacterium* was 10-fold more sensitive than those targeting the *Methanoculleus* and *Methanosarcina* sequences, enabling the detection of lower concentrations of the methane-producing genus. In the present study, an adequate detection limit capable of detecting the genera *Methanoculleus*, *Methanobacterium* and *Methanosarcina* was obtained. The study conducted by Steinberg and Regan (2020) showed a detection limit of the TaqMan qPCR method for the methanogenic groups of  $2.6 \times 10^4$  copies per mL of reactor effluent.

**Table 4**

Efficiency of amplification and  $R^2$  obtained from standard curves of methane-producing archaea by real-time PCR.

Genus designation	Reference Strain	Efficiency (%)	$R^2$	Slopes
<i>Methanoculleus</i>	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220	81%	0.9921	–3.88
<i>Methanobacterium</i>	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535	96%	0.9985	–3.43
<i>Methanosarcina</i>	<i>M. barkeri</i> DSMZ 1538	106%	0.9907	–3.19

**Table 5**

Reproducibility test of the three specific real-time PCR (qPCR) protocols conducted on the same equipment by different operators.

Day	Repetition	Reference strain		
		<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535	<i>M. barkeri</i> DSMZ 1538
1	Operator	15.40 ± 0.10 <sup>a</sup> (0.64%)	14.99 ± 0.15 (1.00%)	21.29 ± 0.18 (0.08%)
	1	15.41 ± 0.14 (0.90%)	15.00 ± 0.16 (1.06%)	21.70 ± 0.13 (0.59%)
2	Operator	17.57 ± 0.10 (0.56%)	15.98 ± 0.10 (0.63%)	25.23 ± 0.07 (0.64%)
	1	17.51 ± 0.19 (1.08%)	15.96 ± 0.07 (0.44%)	25.79 ± 0.11 (0.27%)
3	Operator	16.59 ± 0.08 (0.48%)	17.69 ± 0.13 (0.73%)	26.98 ± 0.14 (0.52%)
	1	16.57 ± 0.12 (0.72%)	17.92 ± 0.02 (0.11%)	27.05 ± 0.05 (0.18%)

<sup>a</sup> Data represent the average quantification cycle number (Cq) ± standard deviation (SD) which was determined by the specific qPCR assays with the corresponding set in triplicate. The coefficients of variation (%) is also provided (in brackets).

### 3.4. Repeatability and reproducibility

To fully conduct the validation of the qPCR protocols, repeatability and reproducibility tests were performed. The repeatability of the qPCR assays was carried out by the same operator on the same equipment on different days. Similar Cq values ( $p > 0.05$ ) in the three repetitions for each of the respective and specific qPCR protocols, with low standard deviations, were obtained. In the case of the target strain belonging to the genus *Methanoculleus*, the mean Cq values ranged from  $13.01 \pm 0.08$  (coefficient of variation (CV) = 0.61%) to  $13.07 \pm 0.11$  (CV = 0.84%), whereas for the *Methanobacterium* strain, the values varied between  $12.62 \pm 0.09$  (CV = 0.71%) and  $12.73 \pm 0.07$  (CV = 0.55%). The strain *M. barkeri* DSMZ 1538 belongs to the genus *Methanosarcina* genus and provided Cq values between  $20.43 \pm 0.08$  (CV = 0.39%) and  $20.48 \pm 0.07$  (CV = 0.34%). Using a maximum error criterion of 5% (Jagadish et al., 2021; Lázaro et al., 2020), the coefficients of variation for the developed assay ranged from 0.34 to 0.84%, so the repeatability of the

qPCR assays was demonstrated in this study. Most previous studies have relied on qPCR method optimisation but did not perform repeatability tests, which is of great importance to ensure the robustness of the method (Franke-Whittle et al., 2009; Desiderio et al., 2021). Only a few studies have conducted repeatability assays for SYBR Green-based qPCR methods, reporting standard deviation values in the same range as those obtained in this study (Rodríguez et al., 2012; Kaplan et al., 2021).

For the reproducibility tests, three samples were treated and repeated on three different days and by two different operators. The mean Cq values obtained by operator 1 and operator 2 were similar ( $p > 0.05$ ), indicating a high reproducibility of the optimised methods (Table 5). The results of the reproducibility assay carried out by the same operator in different equipment demonstrated that no significant differences between Cq values were found ( $p \leq 0.05$ ; data not shown). In another study from Truchado et al. (2016), reproducibility was only tested by doing three replicates per dilution on the day of the experiment and repeating the experiment on three different days. Similarly, the results obtained were highly similar to each other and with a low standard deviation, which indicates the robustness of the method. In addition, the coefficients of variation in the reproducibility assays varied from 0.11 to 1.08% being lower than 5% considered by other authors as cut-off values (Jagadish et al., 2021; Lázaro et al., 2020).

### 3.5. Applicability of the developed qPCR methods

The newly optimised qPCR methods were successfully used to investigate the methanogenic communities in a lab-scale mesophilic reactor. Firstly, an inhibition assay to ensure the truthfulness the results and demonstrate the applicability of the qPCR methods was conducted. Results are shown in Table 6. It can be seen that the three reference strains amplified the specific PCR products with their respective specific primers in spite of the presence of the non-target DNA (from sludge) at the different target DNA:non-target DNA ratios tested. Besides, there were not differences between Cq values regardless of the presence or the absence of non-target DNA. No specific amplification was observed when only non-target DNA was used. This means that the quantification of the three methane-producing strains is not inhibited by the presence of non-target DNA and false positive and negative results are avoided. On the other hand, the samples of the analysed digestate came from the anaerobic co-digestion of organic waste from the tomato industry. The results of the qPCR analysis showed that *Methanosarcina* was the most prevailing methane-producing genus compared to the other two genera studied. This methanogenic group represented a relative population higher than 99% compared to *Methanobacterium* and *Methanoculleus*, which showed a relative population of 0.3 and 0.4%, respectively (Table 7).

These results agree with those obtained in other studies on the population dynamics of anaerobic digesters, where *Methanosarcina* was also the most abundant and stable methanogenic Archaea (Raskin et al., 1994; Shin et al., 2011).

The development of these methods is an important advance for the monitoring of the anaerobic digestion process as it provides rapid and sensitive insight into the main microbial communities involved in mesophilic anaerobic reactors.

## 4. Conclusions

This research successfully developed three methods that allow rapid and reliable quantification of the archaea *Methanosarcina*, *Methanoculleus* and *Methanobacterium* to assess the quality of sludge and monitor the health of anaerobic digesters. Among the seven primer sets designed, three primer pairs (one for each genus under study) were selected to optimise three specific qPCR protocols to detect and quantify three methane-producing genera. The three optimised qPCR methods showed high efficiencies and linear correlation. In addition, the qPCR methods were specific, sensitive, repetitive and reproducible.

**Table 6**

Results obtained in the inhibition assays to test the effect of substrate on the quantification by the qPCR assays developed in this study.

Primer pairs	Ratio of target strain:substrate (organic waste from tomato industry)	SYBR Green reaction mean Cq $\pm$ SD	Tm $\pm$ SD ( $^{\circ}$ C)
Msy-F/R	<i>M. barkeri</i> DSZM 1538 (100:0)	17.00 $\pm$ 0.12	84.99 $\pm$ 0.18
	<i>M. barkeri</i> DSZM1538: Organic waste (75:25)	17.69 $\pm$ 0.09	84.99 $\pm$ 0.01
	<i>M. barkeri</i> DSZM1538: Organic waste (50:50)	18.49 $\pm$ 0.12	84.69 $\pm$ 0.32
	<i>M. barkeri</i> DSZM1538: Organic waste (25:75)	19.63 $\pm$ 0.08	84.69 $\pm$ 0.01
	Organic waste from tomato industry (0:100)	23.78 $\pm$ 0.13	89.61 $\pm$ 0.01
Mbac-F/R	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535 (100:0)	16.37 $\pm$ 0.13	83.65 $\pm$ 0.01
	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535: Organic waste (75:25)	16.96 $\pm$ 0.13	83.50 $\pm$ 0.01
	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535: Organic waste (50:50)	17.42 $\pm$ 0.24	83.50 $\pm$ 0.01
	<i>M. formicicum</i> DSMZ 1535: Organic waste (25:75)	18.51 $\pm$ 0.21	83.50 $\pm$ 0.01
	Organic waste from tomato industry (0:100)	20.90 $\pm$ 0.10	79.18 $\pm$ 0.11
Mmic-F2/R2	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220 (100:0)	17.70 $\pm$ 0.28	80.07 $\pm$ 0.01
	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220: Organic waste (75:25)	18.02 $\pm$ 0.09	80.07 $\pm$ 0.11
	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220: Organic waste (50:50)	18.85 $\pm$ 0.09	79.92 $\pm$ 0.01
	<i>M. bourgensis</i> DSMZ 8220: Organic waste (25:75)	20.04 $\pm$ 0.02	79.92 $\pm$ 0.01
	Organic waste from tomato industry (0:100)	27.32 $\pm$ 0.15	88.71 $\pm$ 0.01

**Table 7**

Results of the applicability of the real-time PCR (qPCR) methods developed for the quantification of the methane-producing genus in a digested sludge from the biomethanation of organic waste from the tomato industry.

Genus	Primer pairs	SYBR Green reaction mean Cq $\pm$ SD	Tm ( $^{\circ}$ C)	Percentage of population	Gene copies/mL of the reactor effluent
<i>Methanoculleus</i>	Mmic-F2/R2	21.37 $\pm$ 1.05	84.89 $\pm$ 0.29	0.20	$2.2 \times 10^5$
<i>Methanobacterium</i>	Mbact-F/R	18.42 $\pm$ 2.04	83.43 $\pm$ 0.32	0.30	$3.2 \times 10^5$
<i>Methanosarcina</i>	Msy-F/R	11.96 $\pm$ 0.40	85.31 $\pm$ 0.11	99.5	$2.1 \times 10^9$

Data represent the average threshold cycle number (Cq)  $\pm$  standard deviation (SD) and temperature melting (Tm)  $\pm$  SD which was determined by the specific qPCR assays with the corresponding set in triplicate.

## Declaration of Competing Interest

None.

## Acknowledgements

Funding: This study was supported by the Junta de Extremadura and the European Social Fund for the financial support received through the aid destined to the training of predoctoral personnel PD18050 (Consolación Sánchez-Sánchez), by the Junta de Extremadura and the European Union (FEDER funds) through the projects with Ref.: GR18081 and GR21180 and by the European Union through the project with Ref.: 0475\_LOCALCIR\_4\_E.



## References

- Ali, S.S., Wu, J., Xie, R., Zhou, F., Sun, J., Huang, M., 2017. Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reti culitermes chinensis*. PLoS One 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181141>.
- Asakawa, S., Nagaoka, K., 2003. *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus olentangyi* and *Methanoculleus oldenburgensis* are subjective synonyms. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53 (5), 1551–1552.
- Aubertheau, E., Stalder, T., Mondamert, L., Ploy, M.C., Dagot, C., Labanowski, J., 2017. Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. Sci. Total Environ. 579, 1387–1398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.136>.
- Baloch, H.A., Nizamuddin, S., Siddiqui, M.T.H., Riaz, S., Jatoti, A.S., Dumbre, D.K., Mubarak, N.M., Srinivasan, M.P., Griffin, G.J., 2018. Recent advances in production and upgrading of bio-oil from biomass: a critical overview. J. Environ. Chem. Eng. 6, 5101–5118. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.07.050>.
- Bauer, C., Korthals, M., Gronauer, A., Leubuh, M., 2008. Methanogens in biogas production from renewable resources - a novel molecular population analysis approach. Water Sci. Technol. 58, 1433–1439. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.514>.
- Bernaldez, V., Cordoba, J.J., Andrade, M.J., Alia, A., Rodriguez, A., 2017. Selection of reference genes to quantify relative expression of ochratoxin A-related genes by *Penicillium nordicum* in dry-cured ham. Food Microbiol. 68, 104–111.
- Boone, D., Whitman, W., Rouviere, P., 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In: Ferry, J.G. (Ed.), *Methanogenesis*. Chapman and Hall, New York, pp. 35–80.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. 25, 169–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>.
- Cadillo-Quiroz, H., Brauer, S.L., Goodson, N., Yavitt, J.B., Zinder, S.H., 2014. *Methanobacterium paludis* sp. nov. and a novel strain of *Methanobacterium lacus* isolated from northern peatlands. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 1473–1480. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059964-0>.
- Cleland, D., Krader, P., Emerson, D., 2008. Use of the DiversiLab repetitive sequence-based PCR system for genotyping and identification of *Archaea*. J. Microbiol. Methods 73, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.12.008>.
- Desiderio, T.M., Stacy, N.I., Ossiboff, R.J., Iredale, M., Archer, L.L., Alexander, A.B., Heard, D.J., Crevasse, S.E., Craft, W.F., Fredholm, D.V.E., Donnelly, K.A., Rosenberg, J.F., Childress, A.L., Russell, K., 2021. Identification of a novel mortality-associated Helicobacter species in gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*), qPCR test development and validation, and correlation with mortality in a wildlife rehabilitation population. Vet. Microbiol. 259, 109136. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109136>.
- Díaz-Báez, M., Espitia-Vargas, S., Molina-Pérez, F., 2002. Digestión anaerobia: Una aproximación a la tecnología. Universidad Nacional de Colombia.
- Doan, N.T.L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Le Thanh, B., Vandamme, P., 2012. Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in northern Vietnam. Lett. Appl. Microbiol. 55, 265–273. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03287.x>.
- Franke-Whittle, I.H., Goberna, M., Insam, H., 2009. Design and testing of real-time PCR primers for the quantification of *Methanoculleus*, *Methanosarcina*, *Methanothermobacter*, and a group of uncultured methanogens. Can. J. Microbiol. 55, 611–616. <https://doi.org/10.1139/W08-157>.
- Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N.H.H., Simonsson, M., 2008. Method evaluation of fusarium DNA extraction from mycelia and wheat for downstream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. J. Microbiol. Methods 73, 33–40.
- Gang, L., Angelidaki, I., 2013. Co-digestion of manure and whey for in situ biogas upgrading by the addition of H<sub>2</sub>: process performance and microbial insights. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 1373–1381. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4547-5>.
- García, J.L., Patel, B.K.C., Ollivier, B., 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. Anaerobe. 6, 205–226. <https://doi.org/10.1006/anae.2000.0345>.
- Gujer, W., Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. Water Sci. Technol. 15, 127–167. <https://doi.org/10.2166/wst.1983.0164>.
- Hagen, L.H., Vivekananda, V., Linjordet, R., Pope, P.B., Eijsink, V.G.H., Horn, S.J., 2014. Microbial community structure and dynamics during co-digestion of whey permeate and cow manure in continuous stirred tank reactor systems. Bioresour. Technol. 171, 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.095>.
- Hori, T., Haruta, S., Ueno, Y., Ishii, M., Igarashi, Y., 2006. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acids in a thermophilic anaerobic digester. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1623–1630. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1623-1630.2006>.
- Jagadish, A., Khajje, D., Tony, M., Nilsson, A., de Miranda, J.R., Terenius, O., Dubey, H., Mishra, R.K., Ponnucula, K.M., 2021. Development and optimization of a TaqMan assay for *Nosema bombycis*, causative agent of pébrine disease in Bombyx mori silkworm, based on the  $\beta$ -tubulin gene. J. Microbiol. Methods 186, 106238. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106238>.
- Kaplan, E., Aktaş, D., Dögen, A., Hilmioglu-Polat, S., Gümrall, R., Hagen, F., Ilkit, M., de Hoog, G.S., 2021. Development and analysis of qPCR for the identification of arthroconidial yeasts of the genus *Magnusiomyces*. Mycopathologia 186, 41–51. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00510-4>.
- Karakashev, D., Batstone, D.J., Angelidaki, I., 2005. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. Appl. Environ. Microbiol. 71, 331–338. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.331-338.2005>.
- Kim, K., Lim, J., Lee, C., 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. Biotechnol. Adv. 31, 1358–1373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.010>.
- Klocke, M., Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Souidi, K., Mumme, J., Linke, B., 2008. Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. Syst. Appl. Microbiol. 31, 190–205. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.02.003>.
- Krakat, N., Westphal, A., Schmidt, S., Scherer, P., 2010. Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1842–1850. <https://doi.org/10.1128/AEM.02397-09>.
- Lázaro, Sales M., Dall’Agnol, M., Macedo de Oliveira, A., Fernandes Camargos, M., Fonseca Jr., A., Karlisson Pimenta dos Reis, J., 2020. RT-qPCR for the diagnosis of the vesiculovirus Cocal virus. Arch. Virol. 165, 1843–1847.
- Lee, I.S., Parameswaran, P., Rittmann, B.E., 2011. Effects of solids retention time on methanogenesis in anaerobic digestion of thickened mixed sludge. Bioresour. Technol. 102, 10266–10272. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.079>.
- Munk, B., Bauer, C., Gronauer, A., Leubuh, M., 2010. Population dynamics of methanogens during acidification of biogas fermenters fed with maize silage. Eng. Life Sci. 10, 496–508. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000056>.
- Nettman, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., Klocke, M., 2010. Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. Appl. Environ. Microbiol. 76, 2540–2548. <https://doi.org/10.1128/AEM.01423-09>.
- Parameswaran, P., Torres, C.I., Lee, H.S., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., 2009. Syntrophic interactions among anode respiring bacteria (ARB) and non-ARB in a biofilm anode: electron balances. Biotechnol. Bioeng. 103, 513–523. <https://doi.org/10.1002/bit.22267>.
- Paszczyński, A.J., Paidisetti, R., Johnson, A.K., Crawford, R.L., Colwell, F.S., Green, T., Delwiche, M., Lee, H., Newby, D., Brodie, E.L., Conrad, M., 2011. Proteomic and targeted qPCR analyses of subsurface microbial communities for presence of methane monooxygenase. Biodegradation 22, 1045–1059. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9462-4>.
- Probst, K., Boutin, S., Bandilla, M., Heeg, K., Dalpke, A.H., 2021. Fast and automated detection of common carbapenemase genes using multiplex real-time PCR on the BD MAX™ system. J. Microbiol. Methods 185, 106224.
- Raskin, L., Poulsen, L.K., Noguera, D.R., Rittmann, B.E., Stahl, D.A., 1994. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1241–1248. <https://doi.org/10.1128/aem.60.4.1241-1248.1994>.
- Reitschuler, C., Lins, P., Illmer, P., 2014. Primer evaluation and adaption for cost-efficient SYBR Green-based qPCR and its applicability for specific quantification of methanogens. World J. Microbiol. Biotechnol. 30, 293–304. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1450-x>.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Martín, A., Córdoba, J.J., 2012. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. Food Microbiol. 31, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.009>.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J., 2015. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. Methods Mol. Biol. 1275, 31–56.
- Rodríguez, A., Medina, A., Córdoba, J.J., Magaña, N., 2016. Development of a HOG-based real-time PCR method to detect stress response changes in mycotoxigenic moulds. Food Microbiol. 57, 109–115.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol. Biol. 132, 365–386. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>.
- Saikaly, P.E., Hicks, K., Barlaz, M.A., de los Reyes III, F., 2010. Transport behavior of surrogate biological warfare agents in a simulated landfill: effect of leachate recirculation and water infiltration. Environ. Sci. Technol. 44, 8622–8628. <https://doi.org/10.1021/es101937a>.
- Sameh, S.A., Jianzhong, S., 2019. Effective thermal pretreatment of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for the enhancement of biomethanation: VIT® gene probe technology for microbial community analysis with special reference to methanogenic Archaea. J. Environ. Chem. Eng. 7, 102853. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.102853>.
- Schlüter, A., Bekel, T., Diaz, N.N., Dondrup, M., Eichenlaub, R., Gartemann, K.H., Krahn, I., Krause, L., Krömeke, H., Kruse, O., Mussgnug, J.H., Neuweger, H., Niehaus, K., Pühler, A., Runte, K.J., Szczepanowski, R., Tauch, A., Tilker, A., Viehöver, P., Goesmann, A., 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. J. Biotechnol. 136, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.05.008>.
- Sean, T., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., Nguyen, M., 2010. A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. Methods 50, S1–S5. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2010.01.005>.
- Shigematsu, T., Tang, Y., Kawaguchi, H., Ninomiya, K., Kijima, J., Kobayashi, T., et al., 2003. Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. J. Biosci. Bioeng. 96, 547–558. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70148-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70148-6).
- Shin, S.G., Zhou, B.W., Lee, S., Kim, W., Hwang, S., 2011. Variations in methanogenic population structure under overloading of pre-acidified high-strength organic wastewaters. Process Biochem. 46, 1035–1038. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.009>.

- Sobhy, H., Colson, P., 2012. Gemi: PCR primers prediction from multiple alignments. *Comp. Funct. Genom.*
- Steinberg, L.M., Regan, J.M., 2020. mcrA-targeted real-time quantitative PCR method to examine methanogen communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4435–4442. <https://doi.org/10.1128/AEM.02858-08>.
- Sturza, R., Mitin, V., Mitina, I., Buga, A., Zgardan, D., Behta, E., 2021. Development and validation of SYBR green-based qPCR technique of detection and quantification of *salmonella enterica*. *Nutr. Food Sci.* 12, 997–1007. <https://doi.org/10.4236/fns.2021.1211073>.
- Tang, Y., Ontiveros-Valencia, A., Feng, L., Zhou, C., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B. E., 2013. A biofilm model to understand the onset of sulfate reduction in denitrifying membrane biofilm reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 763–772. <https://doi.org/10.1002/bit.24755>.
- Timmers, P.H.A., Widjaja-Greefkes, H.C.A., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2017. Evaluation and optimization of PCR primers for selective and quantitative detection of marine ANME subclusters involved in sulfate-dependent anaerobic methane oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 5847–5859.
- Truchado, P., Gil, M.I., Kostic, T., Allende, A., 2016. Optimization and validation of a PMA qPCR method for *Escherichia coli* quantification in primary production. *Food Control* 62, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.014>.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S., 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89, 670–679. <https://doi.org/10.1002/bit.20347>.
- Yu, Y., Kim, J., Hwang, S., 2006. Use of real-time PCR for group-specific quantification of aceticlastic methanogens in anaerobic processes: population dynamics and community structures. *Biotechnol. Bioeng.* 93, 424–433. <https://doi.org/10.1002/bit.20724>.
- Zhang, T., Fang, H., 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 281–289. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0333-6>.