





Análisis Metagenómico de Comunidades Microbianas en la Biodigestión Anaeróbica de Deyecciones Bovinas: Implicaciones Biotecnológicas para la Biorremediación de Suelos Contaminados

Metagenomic Analysis of Microbial Communities in the Anaerobic Biodigestion of Cattle Manure: Biotechnological Implications for the Bioremediation of Contaminated Soils

Roberto Johan Barragán-Monrroy^{1‡} , Juan Alberto López-Sabando¹ ,
Ximena Paola Cervantes-Molina¹ , Carla María Sabando-Cedeño¹  y
Mariela Alexi Díaz-Ponce¹ 

¹ Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Quito km 1.5, Vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. 120501 Quevedo, Los Ríos, Ecuador; (R.J.B.M.), (J.A.L.S.), (X.P.C.M.), (C.M.S.C.), (M.A.D.P.).

[‡] Autor para correspondencia: roberto.barragan2014@uteq.edu.ec

RESUMEN

La digestión anaeróbica constituye una herramienta biotecnológica clave para el aprovechamiento energético y la gestión sostenible de residuos pecuarios, generando biogás y biofertilizantes que reducen las emisiones de gases de efecto invernadero. Este estudio tuvo como objetivo analizar las comunidades microbianas presentes en la biodigestión anaeróbica de deyecciones bovinas mediante secuenciación metagenómica, evaluando su potencial para la biorremediación de suelos contaminados. La investigación se desarrolló durante 60 días en el rancho Hermanos JBZ cantón El Empalme, Ecuador, utilizando un biodigestor metálico a escala piloto de 200 L, alimentado con una mezcla estiércol:agua en proporción 1:1 y operado bajo condiciones mesofílicas controladas (30–38 °C). Se realizaron tres muestreos del biol (días 0, 30 y 60) para el análisis de diversidad bacteriana, aplicando protocolos de extracción de ADN basados en columnas, amplificación del gen 16S rRNA (regiones V3–V4, primers 341F/805R) y secuenciación mediante plataforma Illumina. Los datos fueron procesados bioinformáticamente para la anotación taxonómica y la determinación de abundancia relativa de géneros. Los resultados revelaron una sucesión microbiana típica de los procesos anaeróbicos: predominio inicial de bacterias fermentativas como *Bacteroides* (4.11%) y *Lysinibacillus*, seguidas por *Treponema* (8.97%) y arqueas metanogénicas (*Methanocorpusculum*, *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter*) en la fase final. Estas comunidades demostraron funciones complementarias en la degradación de materia orgánica, producción de metano, estabilización del carbono y potencial inmovilización de metales. Si bien no se evaluó experimentalmente la aplicación del digestato, la integración de los datos metagenómicos con literatura reciente sustenta su valor como bioenmienda microbiana. En conjunto, los resultados aportaron evidencia científica sobre la utilidad de los consorcios microbianos de biodigestores como agentes de restauración de suelos, fortaleciendo los principios de la bioeconomía circular y los objetivos de desarrollo sostenible 7, 12 y 13.

Palabras clave: bacterias, biodigestores, digestato, metanogénesis

SUMMARY

Anaerobic digestion is a key biotechnological tool for energy recovery and the sustainable management of livestock waste, generating biogas and biofertilizers that reduce greenhouse gas emissions. The objective of this study was to analyze the microbial communities present during the anaerobic biodigestion of cattle



Cita recomendada:

Barragán-Monrroy, R. J., López-Sabando, J. A., Cervantes-Molina, X. P., Sabando-Cedeño, C. M., & Díaz-Ponce, M. A., (2026). Análisis Metagenómico de Comunidades Microbianas en la Biodigestión Anaeróbica de Deyecciones Bovinas: Implicaciones Biotecnológicas para la Biorremediación de Suelos Contaminados. *Terra Latinoamericana*, 44, 1-14. e2436. <https://doi.org/10.28940/terralatinoamericana.v44i.2436>

Recibido: 23 de octubre de 2025.
Aceptado: 12 de diciembre de 2025.
Artículo. Volumen 44.
Abril de 2026.

Editor de Sección:
Dr. Fernando Abasolo Pacheco



Copyright: © 2026 by the authors.
Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC ND) License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

manure through metagenomic sequencing, evaluating their potential for the bioremediation of contaminated soils. The research was conducted over 60 days at the Hermanos JBZ ranch in El Empalme, Ecuador, using a 200 L pilot-scale metal biodigester fed with a 1:1 mixture of manure and water and operated under controlled mesophilic conditions (30–38 °C). Three biol samples were collected (days 0, 30, and 60) for bacterial diversity analysis, applying column-based DNA extraction protocols, amplification of the 16S rRNA gene (V3–V4 regions, primers 341F/805R), and sequencing using the Illumina platform. The data were processed using bioinformatic tools for taxonomic annotation and determination of the relative abundance of genera. The results revealed a microbial succession typical of anaerobic processes, with an initial predominance of fermentative bacteria such as *Bacteroides* (4.11%) and *Lysinibacillus*, followed by *Treponema* (8.97%) and methanogenic archaea (*Methanocorpusculum*, *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter*) in the final phase. These communities demonstrated complementary functions in organic matter degradation, methane production, carbon stabilization, and potential metal immobilization. Although the application of digestate was not experimentally evaluated, the integration of metagenomic data with recent literature supports its value as a microbial bioamendment. Overall, the results provide scientific evidence on the usefulness of microbial consortia from biodigesters as soil restoration agents, reinforcing the principles of the circular bioeconomy and Sustainable Development Goals 7, 12, and 13.

Index words: bacteria, biodigesters, digestate, methanogenesis.

INTRODUCCIÓN

La digestión anaeróbica constituye una de las estrategias biotecnológicas más eficientes para el manejo sostenible de residuos orgánicos, especialmente aquellos generados por la actividad pecuaria. Este proceso, impulsado por comunidades microbianas complejas de bacterias y arqueas, transforma la materia orgánica en biogás y biofertilizantes, reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y mitigando los impactos ambientales asociados al manejo inadecuado de estiércoles. El metano (CH₄) posee un potencial de calentamiento global 28 veces superior al del dióxido de carbono (CO₂), por lo que su control es una prioridad ambiental (IPCC, 2021; Grossi, Goglio, Vitali, y Williams, 2019).

En América Latina, la ganadería es una fuente importante de emisiones de metano y de contaminación por residuos pecuarios, pero también representa una oportunidad para la generación de energía renovable mediante biodigestores (Kadam *et al.*, 2024; Sevillano, Pesantes, Peña, Martínez y Gómez, 2021). Los productos derivados del proceso, como el biol y el digestato, son ricos en nutrientes y microorganismos que pueden contribuir a la recuperación de suelos degradados (Pastorelli *et al.*, 2024).

Los avances en metagenómica han permitido caracterizar con mayor precisión las comunidades microbianas que intervienen en la digestión anaeróbica, revelando géneros funcionales como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Treponema* y arqueas metanogénicas de los géneros *Methanosarcina*, *Methanospirillum* y *Methanocorpusculum*, los cuales participan en las fases de hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (Harirchi *et al.*, 2024).

Además de su rol en la producción de biogás, estos microorganismos poseen potencial biotecnológico para la biorremediación de suelos. *Clostridium* puede reducir hierro, manganeso y ciertos metales pesados, favoreciendo la inmovilización de contaminantes; *Bacteroides* y *Treponema* degradan compuestos orgánicos complejos, y las arqueas metanogénicas contribuyen al reciclaje del carbono y la estabilización del suelo (Pande, Pandey, Sati, Bhatt y Samant, 2022; Ayilara y Babalola, 2023).

En este sentido, el análisis metagenómico no solo optimiza la eficiencia de los biodigestores, sino que también proporciona información valiosa sobre las posibles aplicaciones edáficas de las comunidades identificadas, alineándose con los principios de la economía circular y los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS 7, 12 y 13). Bajo este marco, la presente investigación propone un análisis integral de la biodigestión anaeróbica de deyecciones bovinas, enfatizando la caracterización metagenómica de las comunidades microbianas y su potencial aplicación en la biorremediación de suelos contaminados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

La presente investigación se realizó durante 60 días en el área de ganadería del rancho "Hermanos JBZ", ubicado en el cantón El Empalme, provincia del Guayas. Geográficamente, se localiza en la zona 17 sur, con coordenadas UTM WGS 1984: X = 636976.04 y Y = 9890500.11 (Figura 1).

Caracterización de la Generación de Deyecciones bovinas del Rancho "Hermanos JBZ" del Cantón El Empalme, Provincia del Guayas

Para la caracterización de las heces producidas por los bovinos en la ganadería del rancho "Hermanos JBZ", se implementó como base el método de observación directa, el cual fue respaldado con un registro documentado y fotografiado. Se utilizó un formato para registrar y cuantificar diariamente durante un mes el peso de las deyecciones bovinas, tal como lo sugieren Aremanda, Debretsion, Tesfalem y Menghisteab, (2023), quienes mencionan que este proceso es esencial para la planificación y gestión de su manejo y aprovechamiento.

Para la toma del peso de las deyecciones, se procedió a recolectar diariamente los desechos generados en el área de ordeño, en el cual estaban 17 vacas simultáneamente en un periodo de 1 hora, posterior a la recolección, se procedió al pesado total de las deyecciones generadas en el día, esto con la ayuda de una balanza digital, durante 28 días consecutivos.

Construcción del Biodigestor

Un biodigestor a escala piloto es un tanque cerrado de tamaño pequeño, en el cual se deposita materia orgánica mezclada con agua, con la finalidad de descomponerla en ausencia de oxígeno para generar biogás y biol como producto final (Mejía y Peralta, 2019¹). Para la elaboración y construcción del biodigestor a escala piloto se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

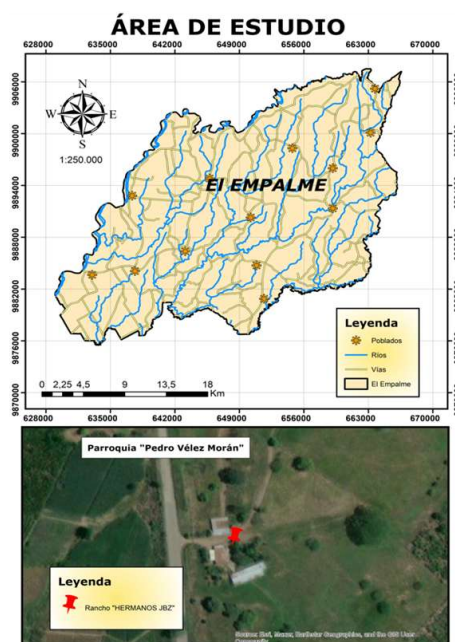


Figura 1. Localización del área de estudio. Ubicación geográfica del rancho Hermanos JBZ. Figure 1. Location of the study area. Geographic location of the Hermanos JBZ ranch.

¹ Mejía, G., & Peralta, J. (2019). *Producción de biogás mediante biodigestor a escala piloto con residuos semi-sólidos (excreta y rumen) del camal de Calceta, Bolívar*. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Medio Ambiente. Ecuador. Disponible en <https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1000/1/TTMA46.pdf>

- Adaptación de un tanque metálico
- Instalación de llave de paso en la campana de almacenamiento del biodigestor
- Instalación de manubrio para darle movimiento a la materia orgánica interna
- Instalación de llave de paso en la parte inferior del biodigestor
- Instalación de llaves de paso para salida del biogás
- Instalación de termohigrómetro digital

Llenado del Biodigestor

Las deyecciones bovinas fueron recolectadas en gavetas plásticas y fueron pesadas en una balanza previamente calibrada y encerada, para posteriormente ser colocadas en el biodigestor, de tal manera que se cumpla la relación 1:1 (deyecciones + agua) (Cuadro 1), el biodigestor tuvo una distribución del 75% destinado para el material orgánico y el 25% restante será destinado para el almacenamiento del biogás producido (Lara, 2016²), posteriormente, cuando el biodigestor estuvo en funcionamiento, se tomaron estos valores como base para realizar los cálculos de volumen del sustrato, densidad de las deyecciones y estimación del espacio disponible para producción de biogás, conforme a las ecuaciones presentadas en el apartado metodológico.

Determinación de la Cantidad de Sustrato

Para calcular la cantidad de sustrato, se consideró que el 75% de la capacidad del tanque estuvo ocupada por el sustrato, mientras que el 25% restante estaba destinada al biogás. Luego, se procedió a realizar el cálculo utilizando la ecuación 1 como referencia.

$$V_s = C_c * 0.75 \quad (1)$$

Donde V_s corresponde al volumen del sustrato (L) y C_c a la capacidad del recipiente (L).

Determinación de la Densidad del Estiércol Bovino

Para el cálculo del volumen del estiércol contenido en el tanque se tomó como referencia la ecuación 2 y 3 establecidas por Ayala, Jijón y Chacha (2022).

$$V = (\pi r^2 / 4) * h \quad (2)$$

Donde V corresponde al volumen del estiércol (m^3), π al valor de pi (3.1416), r al radio del balde (m) y h a la altura (m).

Una vez calculado el volumen del estiércol se procedió a aplicar la ecuación 2, la cual corresponde al cálculo de la densidad del estiércol, misma que contiene como variables la masa del estiércol y el volumen:

Cuadro 1. Relación estiércol: agua.
Table 1. Manure:water ratio.

Nº	Tipo de deyección	Agua
1	Bovino fresco	1:1
2	Bovino seco	1:2
3	Porcino	1:2
4	Aves	1:1
5	Equino	1:2
6	Desechos humanos	1:1
7	Desechos vegetales	1:0,5 - 1:2

² Lara, M. (2016). *Diseño de un biodigestor para la producción de biogás generado por las excretas de ganado vacuno, en el criadero jersey chugllin*. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Biotecnología. Riobamba, Ecuador. Disponible en <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6261/1/236T0242.pdf>

$$\rho = \frac{M}{V} \quad (3)$$

Donde ρ corresponde a la densidad (kg m^{-3}), M a la masa del estiércol (kg) y V al volumen (m^3).

Identificación de la Diversidad Bacteriana en el Proceso de Biodigestión Anaeróbica Mediante Análisis Metagenómico

Para el análisis metagenómico, se tomó como referencia la metodología utilizada por Wang *et al.* (2019), a la cual se le atribuyeron cambios en dependencia del análisis de interés de esta investigación, para lo cual el análisis de secuenciación genética incluyó: Amplificación del gen 16S del ARN ribosomal regiones V3 - V4; 341F: CCTACGGGNGGCWGCAG a 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC. Se tomaron tres muestras en diferentes tiempos de biodigestión anaeróbica (día 0, día 30, día 60) tomando como referencia los siguientes criterios técnicos:

Obtención de muestras. Para la obtención de muestras se utilizó un kit especializado para muestras de biol, se tomaron las muestras del biol directamente de la llave de paso previamente colocada en el biodigestor, y fueron colocadas en tubos Falcon de 15 ml, posterior a aquello se procedió a sellar los tubos con cinta ParaFilm para después ser colocado en un *cooler*, el cual contenía bloques de hielo seco en su interior para conservar una temperatura de 2 a 8 °C y así tener calidad en la muestra.

Extracción de material genético. Se utilizó el método de extracción basado en columnas de sílice, empleando el kit Qiagen DNeasy PowerSoil®, siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (90 V, 30 min) y la cuantificación se realizó por fluorometría utilizando un fluorímetro Qubit™ 4.0 con el kit Qubit dsDNA HS Assay, bajo condiciones controladas de temperatura (22-25 °C) y calibración previa del equipo.

Index PCR. Con el material genético cualificado se procedió a la amplificación de la región de interés que se especifica con anterioridad, la unión de adaptadores a ambos lados de este o estos fragmentos generados, mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Después de cada proceso de amplificación se realizó una limpieza de los fragmentos deseados mediante el método basado en perlas (DeAngelis, Wang y Hawkins, 1995). La evaluación de la calidad y la cantidad de las librerías (fragmentos de ADN amplificados e indexados) preparados para la secuenciación preparadas se realizó mediante electroforesis en gel y cuantificación fluorométrica respectivamente.

La Figura 2 muestra el flujo de procesamiento bioinformático aplicado a los datos metagenómicos obtenidos mediante secuenciación Illumina en formato *paired-end* (FASTQ). Inicialmente, se ejecutó un control de calidad para eliminar lecturas con puntuaciones deficientes y artefactos de secuenciación; posteriormente, se aplicó el proceso de eliminación de ruido (*denoising*) para corregir errores asociados a la amplificación por PCR.

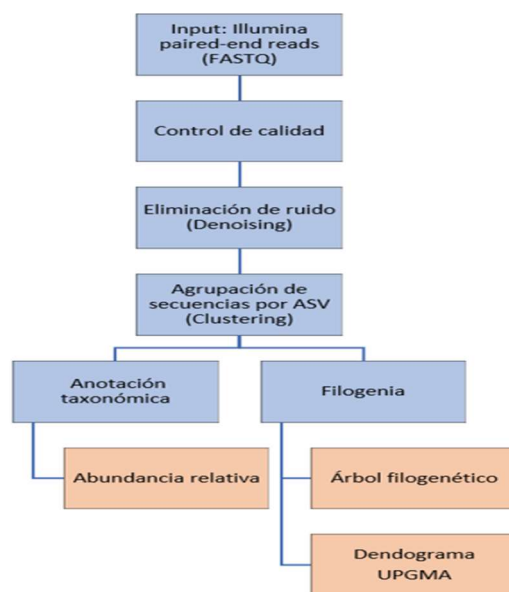


Figura 2. Flujo de trabajo de análisis metagenómico.
Figure 2. Metagenomic analysis workflow.

Las secuencias depuradas fueron agrupadas como variantes de secuencia de amplicón (ASV) mediante algoritmos de *clustering*, lo que permitió una resolución taxonómica precisa. A partir de esta etapa, se desarrollaron dos vertientes analíticas principales: la anotación taxonómica, mediante bases de datos especializadas, que facilitó el cálculo de la abundancia relativa de los géneros dominantes, y el análisis filogenético, mediante la construcción de árboles filogenéticos y la elaboración de un dendrograma tipo UPGMA, con el fin de evaluar la similitud genética entre las comunidades microbianas presentes en los diferentes tiempos de muestreo.

Análisis de Datos

El procesamiento y análisis de los datos metagenómicos se efectuó mediante herramientas bioinformáticas para la anotación taxonómica y la visualización de la estructura microbiana en las diferentes etapas del proceso de biodigestión anaeróbica. Las secuencias obtenidas fueron depuradas mediante filtrado de calidad aplicando un umbral Phred > Q30, se eliminaron secuencias quiméricas mediante el algoritmo DADA2, se normalizaron empleando rarefacción para homogeneizar la profundidad de lectura entre muestras y se clasificaron taxonómicamente utilizando la base de datos SILVA v138 con un nivel de similitud $\geq 97\%$, lo que permitió garantizar la fiabilidad en la asignación taxonómica. Posteriormente, se calcularon los valores de abundancia relativa de cada taxón, los cuales se representaron gráficamente para evaluar la distribución de los géneros bacterianos predominantes en los tres tiempos de muestreo (días 0, 30 y 60). La comparación de la composición bacteriana entre las muestras se realizó mediante un dendrograma UPGMA basado en la distancia UniFrac no ponderada, con el fin de determinar la similitud filogenética entre las comunidades microbianas. Este análisis permitió identificar agrupamientos según la evolución temporal del proceso, evidenciando la cercanía entre las comunidades de los días 30 y 60 respecto a la muestra inicial. Asimismo, se elaboró una representación gráfica de la dinámica temporal de los géneros bacterianos dominantes, con el propósito de visualizar los cambios sucesionales en la comunidad microbiana a lo largo del proceso de biodigestión. Estas visualizaciones se realizaron utilizando software estadístico especializado QIIME 2 versión 2023.2 (QIIME 2 Development Team, 2023), RStudio, paquete phyloseq (McMurdie y Holme, 2013) y se interpretaron en función de las fases metabólicas del sistema (hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis), permitiendo correlacionar la abundancia de los principales géneros bacterianos y arqueas con las transformaciones biológicas observadas durante el proceso.

Para el análisis bioinformático se utilizaron QIIME2 como plataforma principal de procesamiento, la base de datos SILVA para la asignación taxonómica, FastQC para la evaluación inicial de calidad, Trimmomatic y DADA2 para el filtrado y eliminación de ruido, respectivamente, complementándose los análisis estadísticos y visualizaciones con RStudio (paquetes phyloseq, vegan y ggplot2).

La secuenciación produjo 55 377, 136 716 y 113 421 lecturas crudas para los días 0 (BJL_001), 30 (BJL_002) y 60 (BJL_003), respectivamente; de ellas, entre el 76.03% y el 85.16% fueron retenidas tras el filtrado de calidad (Phred ≥ 20), y entre el 56,29 % y el 65,05 % correspondieron a secuencias no quiméricas, garantizando así una profundidad adecuada para el análisis metagenómico.

Implicaciones Biotecnológicas y Potencial Biorremediador de las Comunidades Bacterianas Identificadas

Una vez identificados los géneros microbianos dominantes mediante el análisis metagenómico (bacterias y arqueas), se procedió a realizar una revisión sistemática de literatura científica reciente, con el fin de interpretar sus posibles funciones ecológicas y biotecnológicas, especialmente en procesos de biorremediación de suelos y tratamiento biológico de materia orgánica.

Esta revisión se efectuó a partir de bases de datos indexadas Scopus, Web of Science y ScienceDirect, empleando combinaciones de palabras clave con base a los resultados obtenidos del análisis metagenómico. Los artículos seleccionados permitieron establecer una correspondencia funcional entre los microorganismos detectados en el biodigestor y los reportados en la literatura como agentes de degradación de materia orgánica, reducción de contaminantes, y estabilización microbiológica del suelo. Este análisis bibliográfico tuvo carácter interpretativo y complementario, sin implicar experimentación directa sobre suelos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la Generación de Deyecciones Bovinas del Rancho "Hermano JBZ" del Cantón El Empalme, Provincia del Guayas

En el Cuadro 2, se muestran las deyecciones producidas por 17 vacas en la sala de ordeño del rancho, en un periodo de 1 hora de permanencia durante 28 días consecutivos, la cual reflejó un valor promedio de 22.12 ± 6.30 kg día⁻¹; lo que representaría 1.30 kg por vaca en una hora, en total 31.2 kg de estiércol al día por bovino.

Cuadro 2. Registro de recolección diaria de estiércol bovino (kg).
Table 2. Daily cattle manure collection record (kg).

Sem.	Lun.	Mar.	Miér.	Jue.	Vie.	Sáb.	Dom.	Total	Prom.	D.E.
								Kg		
1	34.06	16.14	22.60	31.68	16.66	25.08	15.20	161.42	23.06	7.64
2	20.64	18.44	30.14	16.30	26.66	15.50	28.70	138.38	19.77	6.07
3	20.44	18.45	34.11	20.56	22.12	17.63	16.36	149.67	21.38	5.94
4	15.65	34.12	22.50	23.80	25.74	22.32	25.85	169.98	24.28	5.52
							Total	619.45	22.12	6.30

Por lo tanto, la producción de estiércol total del rancho, con 63 bovinos en todas las edades fisiológicas es de 1965.6 kg día⁻¹ y la producción de estiércol diaria en el rancho Hermanos "JBZ" fue de 22.12 kg por las 17 vacas en la sala de ordeño en un periodo de 1 hora, lo que significa que, cada vaca excreta 1.30 kg en ese periodo y en un total diario representaría un 31.2 kg, valor similar al que detalla Pérez-Bravo, Bautista-Vargas, Hernández-Sánchez, y Enrique-Padilla (2017) el cual menciona que, un bovino adulto genera 20 - 30 kg día⁻¹, pudiendo elevarse hasta 45 kg; esto depende de la disponibilidad de alimento y etapa fisiológica del bovino (Speksnijder *et al.*, 2022).

Construcción del Biodigestor

Se obtuvo un biodigestor a escala piloto compuesto por un tanque metálico hermético con capacidad de 200 litros, el cual presentó dimensiones de 89 cm de altura y 59 cm de diámetro. La estructura incorporó tres llaves de paso: dos ubicadas en la parte superior para la conducción y liberación del biogás generado, y una localizada en la zona inferior destinada a la extracción del biol.

El sistema contaba con un orificio de acceso para la mezcla de materia orgánica y agua, fabricado durante la construcción del tanque, y se equipó con un termohigrómetro que permitió registrar diariamente la humedad y las temperaturas interna y externa del dispositivo. Además, se observó la adecuada integración de un mecanismo de agitación central, compuesto por un manubrio con aspas orientadas hacia el interior y exterior del biodigestor, el cual facilitó la mezcla homogénea del sustrato durante la fase experimental.

Por último, se instaló en la parte superior central del tanque, un manubrio con aspas en sentido interno y externo del biodigestor, con el objetivo de agitar y mezclar la materia orgánica contenida en el biodigestor.

La Figura 3 presenta el modelo final del biodigestor construido, así como los componentes funcionales empleados durante su operación.

Determinación de la Cantidad de Sustrato

Para conocer la cantidad de sustrato a utilizar para el proceso de digestión anaerobia, se tomó en consideración la capacidad de almacenamiento del tanque, 200 litros, de la misma manera se tomó en consideración que, el 75% de la capacidad del tanque debe ser utilizada para la materia orgánica y el 25% restante para el biogás, como se expresa a continuación:

$$V_s = C_c * 0.75$$

$$V_s = 200L * 0.75 = 150L$$

Se requirieron 150 litros de materia orgánica para alimentar el biodigestor, esta cantidad se incorporó equitativamente, añadiendo 75 litros de agua y 75 kg de estiércol, según la relación 1:1.



Figura 3. Biodigestor a escala piloto.
Figure 3. Pilot-scale biodigester.

Determinación de la Densidad del Estiércol Bovino

La cantidad de estiércol recolectada fue de 75 kg en estado fresco, se obtuvo mediante recolección manual durante cuatro días consecutivos, seleccionando la materia prima que no contenga tierra, maleza u otro tipo de contaminante. El primer día se recolectaron 16.22 kg, en el segundo día 22.69 kg, en el tercer día 17.34 kg; y en el cuarto día se recolectó 18.75 kg para completar los 75 kilogramos.

Para determinar las deyecciones del biodigestor, se utilizaron los datos previamente obtenidos, la masa de 75 kg de estiércol, y la altura que ocuparon los desechos (estiércol + agua residual) fue de 0.69 m. El cálculo se efectuó de la siguiente manera:

$$\rho = \frac{75 \text{ kg}}{\pi * \frac{(0.295 \text{ m})^2}{4} * 0.69 \text{ m}} = 98.94 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$$

La densidad del estiércol presente en el biodigestor a escala piloto, corresponde a 98.94 kg m⁻³.

Diversidad Bacteriana en el Proceso de Biodigestión Anaeróbica Mediante Análisis Metagenómico

Los resultados de la anotación taxonómica de las bacterias presentes en la biodigestión anaeróbica se presentan en valores de abundancia relativa por muestra (muestra BJL_001, día 0 de biodigestión; BJL_002, día 30 de biodigestión; BJL_003, día 60 de biodigestión), considerando los diez taxones principales a nivel de género.

Abundancia relativa por géneros bactericidas. En el Cuadro 3 se presenta la abundancia relativa por géneros bacterianos en la muestra inicial del proceso de biodigestión anaeróbica (día 0). En esta etapa, la mayoría de las bacterias detectadas no se encuentran clasificadas en una taxonomía específica; sin embargo, el género *Bacteroides* mostró una relevancia destacada con una abundancia relativa del 4.11%, ubicándose como el tercer taxón dominante. Este grupo microbiano, común en el tracto digestivo de los bovinos según Molotla-Torres (2022³), resulta coherente con el origen de la muestra, ya que las heces fueron recolectadas inmediatamente después de su excreción. De acuerdo con Cai *et al.*, (2016), *Bacteroides* desempeña un papel esencial durante la fase acidogénica del proceso, al contribuir en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), precursores clave en la generación de metano (CH₄). Asimismo, se identificó la presencia de microorganismos del reino Archaea, principales responsables de la producción de metano, destacando los géneros *Methanobrevibacter*, *Picrophilus* y *Methanocorpusculum*, con conteos de 85, 7 y 7 respectivamente, lo que confirma su papel como precursores del biogás en el sistema de gestión anaeróbica.

³ Molotla Torres, D. E. (2022). *Evaluación del efecto de lactoferrina bovina sobre la abundancia de bacterias de la microbiota implicadas con la homeostasis intestinal en ratones BALB/c sometidos a estrés*. Tesis de para obtener el grado de Maestro en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México.

Cuadro 3. Abundancia relativa en la muestra inicial (BJL_001) del proceso de biodigestión anaeróbica.
Table 3. Relative abundance in the initial sample (BJL_001) of the anaerobic biodigestion process.

Taxonomía	Abundancia relativa (%)
UCG-005	7.001
UCG-010	6.764
Bacteroides	4.113
Lysinibacillus	3.879
Rikenellaceae	3.841
Christensenellaceae	3.276
Alistipes	3.077
Prevotellaceae	2.191
Rombutsia	2.076
Clostridia	1.999

Por su parte, el género *Lysinibacillus*, con una abundancia relativa de 3.879%, ha demostrado capacidad para degradar proteínas, lo cual resulta relevante en la fase de proteólisis, como indican Donoso-Bravo *et al.* (2018), Asimismo, el género *Rikenellaceae* con una abundancia relativa de 3,840%, participa activamente en la fermentación de proteínas y carbohidratos, favoreciendo la formación de ácidos orgánicos durante el proceso de biodigestión anaeróbica (Rusanowska *et al.* 2025).

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de la muestra B JL_002 (día 30 de biodigestión), donde el grupo *Bacteroidales* registró la mayor abundancia relativa (8.969%). De acuerdo con Agustini, da Costa y Gutterres (2020), la presencia de este grupo se correlaciona positivamente con la producción de biogás, lo que resalta su importancia en la biodigestión anaeróbica de residuos sólidos. También se observó el género *Treponema*, con una abundancia relativa de 5.062%; según Stolze *et al.* (2016), este microorganismo posee genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos y genera como productos finales hidrógeno (H₂) y ácidos grasos volátiles (AGVs), compuestos esenciales para la actividad de las arqueas metanogénicas. Por su parte, el género *Bacteroides* alcanzó una abundancia relativa de 5.023%, evidenciando un incremento conforme avanzó la biodigestión; tal como señalan Lim, Park, Tong y Yu (2020), este género está estrechamente asociado con la producción de AGVs, H₂ y CO₂ durante la fase de acidogénesis, contribuyendo de manera decisiva a las etapas previas a la metanogénesis.

Cuadro 4. Abundancia relativa de la muestra 2 (BJL_002) del proceso de biodigestión anaeróbica.
Table 4. Relative abundance of sample 2 (BJL_002) from the anaerobic biodigestion process.

Taxonomía	Abundancia relativa (%)
Bacteroidales	8.969
Treponema	5.063
Bacteroides	5.023
Ruminofilibacter	3.146
Ruminiclostridium	3.038
Christensenellaceae	2.905
BBMC-4	2.431
Candidatus_Moranbacteria	2.101
DEV114	1.906
Acetivibrio	1.897

En el Cuadro 5 se presentan los valores de abundancia relativa correspondientes a la muestra B JL_003 (día 60 de biodigestión anaeróbica). En esta fase, el género *Treponema* registró la mayor abundancia relativa (8.97%), consolidándose como el taxón dominante. La asignación taxonómica se realizó mediante comparación de secuencias con la base de datos SILVA v138, utilizando un umbral de similitud $\geq 97\%$, lo cual permitió identificar la presencia de microorganismos pertenecientes al reino *Archaea*, entre los que destacaron *Methanocorpusculum* (652 secuencias), seguido de *Methanosarcina* (377) y *Methanobrevibacter* (36), evidenciando su contribución directa a la producción de metano en esta etapa del proceso. El incremento de *Treponema* sugiere una intensificación de la fase fermentativa y una mayor generación de hidrógeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2) y ácidos grasos volátiles (AGVs), compuestos fundamentales para la actividad de las arqueas *metanogénicas* (Stolze *et al.*, 2016). Asimismo, el género *Rikenellaceae*, detectado inicialmente en el día 0, reapareció con una abundancia relativa de 5.06%, favoreciendo la descomposición de biomasa rica en carbohidratos (Ahlberg-Eliasson, Westerholm, Isaksson y Schnürer, 2021). Por su parte, *Ruminofilobacter* mostró un incremento respecto al día 30 (5.02%), resultado coherente con lo reportado por Günel, İnce, Uzun, Erdem y İnce (2025), quienes evidenciaron su elevada abundancia en reactores con altos sólidos totales, confirmando su participación en la degradación de materia orgánica compleja durante la fase *metanogénica* avanzada.

En la Figura 4 se observa la distribución de la abundancia relativa de géneros bacterianos en el proceso de biodigestión anaeróbica en los tres periodos diferentes durante 60 días, la cual muestra una variabilidad en las bacterias presentes en el proceso. Las bacterias no clasificadas (otros) predominan entre los otros géneros, sin embargo, los géneros como *Treponema*, *Bacteroidales*, *Bacteroides* y *Rikenellaceae* destacan por su presencia dominante en las diferentes muestras, siendo los géneros *Treponema* y *Bacteroidales*, dominantes entre las clasificadas en la muestra 4 y 5 respectivamente. Por otra parte, géneros como UCG-005 y *Rombutsia*, presentan una baja abundancia relativa en las muestras.

Similitud entre Comunidades Bacterianas del Proceso de Biodigestión Anaeróbica

En la Figura 5, se muestra un dendograma UPGMA basado en la distancia UniFrac no ponderada evidencia la similitud filogenética entre las comunidades bacterianas presentes en los diferentes tiempos de biodigestión anaeróbica (días 0, 30 y 60). Se observa una clara separación entre la muestra inicial (BJL_001, día 0) y las muestras correspondientes a los días 30 (BJL_002) y 60 (BJL_003), lo cual indica un cambio sustancial en la estructura microbiana a medida que avanza el proceso. La agrupación cercana entre B JL_002 y B JL_003 refleja una composición bacteriana más homogénea en las fases intermedia y final, asociada a la estabilización del sistema y al predominio de géneros adaptados a condiciones estrictamente anaerobias, como *Treponema*, *Rikenellaceae* y arqueas *metanogénicas* (*Methanocorpusculum*, *Methanosarcina*).

La Figura 6 muestra la variación temporal de los géneros bacterianos predominantes en los tres periodos de muestreo (días 0, 30 y 60), evidenciando la dinámica ecológica del sistema durante la biodigestión anaeróbica.

Cuadro 5. Abundancia relativa de la muestra 3 (BJL_003) del proceso de biodigestión anaeróbica.
Table 5. Relative abundance of sample 3 (BJL_003) from the anaerobic biodigestion process.

Taxonomía	Abundancia relativa (%)
<i>Treponema</i>	8.969
<i>Rikenellaceae</i>	5.063
<i>Ruminofilobacter</i>	5.023
<i>Bacteroidales</i>	3.146
BBMC-4	3.038
<i>Christensenellaceae</i>	2.905
DEV114	2.431
<i>Roseimarinus</i>	2.101
<i>Ruminiclostridium</i>	1.906
<i>Bacteroides</i>	1.897

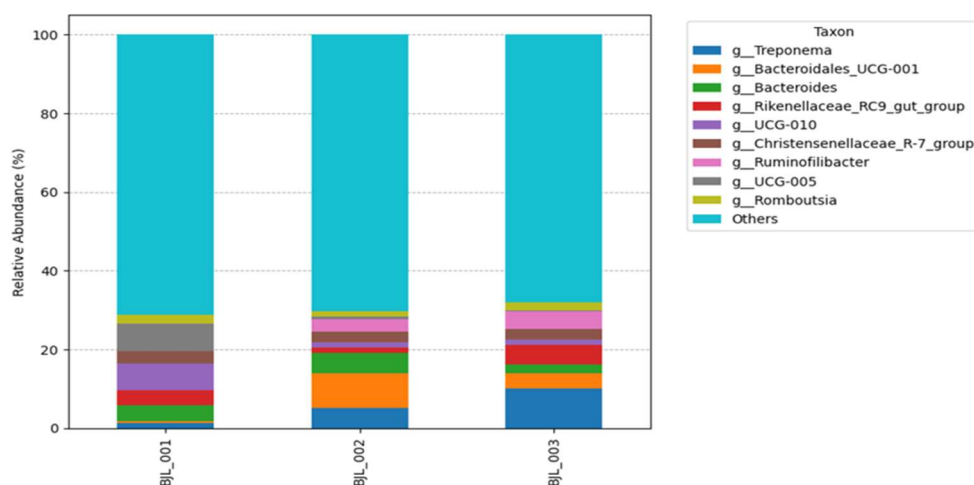


Figura 4. Distribución de la abundancia relativa de géneros bacterianos en el proceso de biodigestión anaeróbica.

Figure 4. Distribution of the relative abundance of bacterial genera in the anaerobic biodigestion process.

En la etapa inicial se observa el predominio de bacterias fermentativas como *Bacteroides* y *Lysinibacillus*, implicadas en la degradación primaria de compuestos orgánicos y la producción de ácidos grasos volátiles. Hacia el día 30, el incremento de *Bacteroidales* y la aparición de *Treponema* indican la transición hacia una fase intermedia caracterizada por la intensificación de la fermentación y la formación de intermediarios como H_2 y CO_2 . En el día 60, la comunidad microbiana alcanza un estado de mayor estabilidad con la consolidación de *Treponema*, *Rikenellaceae* y *Ruminofilobacter*, géneros asociados a la degradación de materia orgánica compleja y al soporte metabólico para arqueas metanogénicas. Esta tendencia confirma una sucesión ecológica progresiva desde comunidades fermentativas hacia consorcios metanogénicos maduros, en los cuales las interacciones sinérgicas entre bacterias y arqueas optimizan la conversión del sustrato en biogás y la estabilización del carbono, reflejando la eficiencia biológica del biodigestor durante el proceso completo.

Implicaciones Biotecnológicas y Potencial Biorremediador de las Comunidades Bacterianas Identificadas

El análisis metagenómico realizado en el proceso de biodigestión anaeróbica reveló comunidades microbianas con potencial funcional significativo para la biorremediación de suelos contaminados, particularmente a través de procesos de fermentación, metanogénesis y transformación de compuestos orgánicos. En la etapa inicial

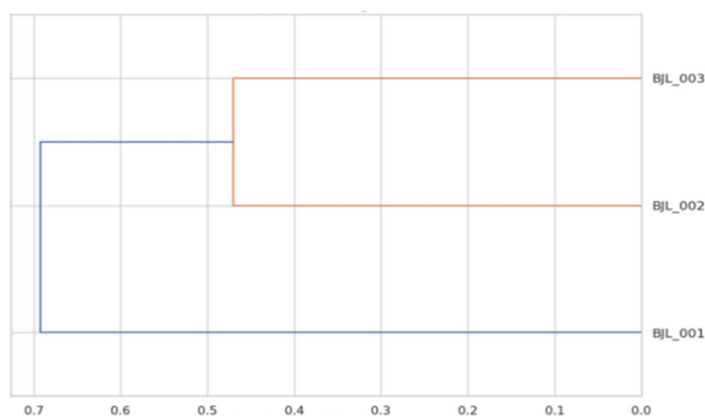


Figura 5. Dendrograma UPGMA basado en la distancia UniFrac no ponderada de los grupos bacterianos del proceso de biodigestión anaeróbica en respuesta a los diferentes días de biodigestión.

Figure 5. UPGMA dendrogram based on the unweighted UniFrac distance of bacterial groups in the anaerobic biodigestion process in response to different days of biodigestion.

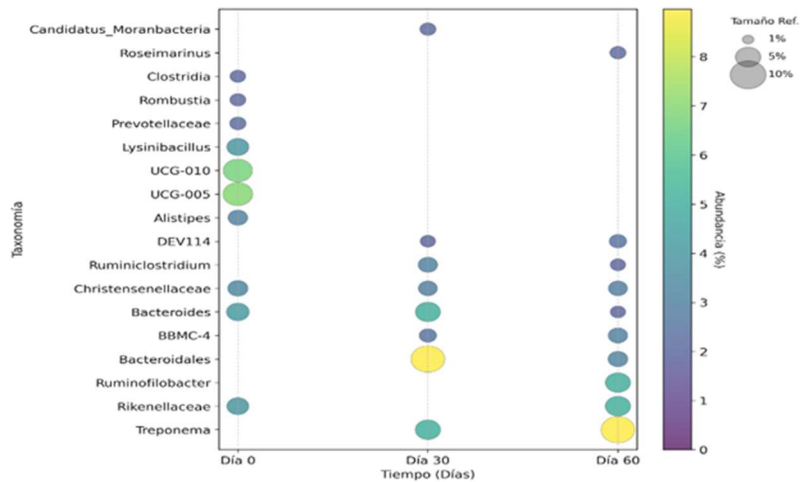


Figura 6. Dinámica bacteriana en el biodigestor en diferentes tiempos.
Figure 6. Bacterial dynamics in the biodigester at different times.

(día 0), predominó el género *Bacteroides* (4.11%), mientras que en la fase final (día 60) se observó una mayor abundancia de *Treponema* (8.97%) y arqueas metanogénicas como *Methanocorpusculum*, *Methanosarcina* y *Methanobrevibacter*. Esta transición refleja una sucesión microbiana típica de los biodigestores, donde las bacterias fermentativas preparan el sustrato para las arqueas metanogénicas en la fase de estabilización (Giongo *et al.*, 2020).

Las *Bacteroides* está implicado en la fermentación de compuestos orgánicos complejos, generando ácidos grasos volátiles (AGV) e hidrógeno, que a su vez pueden alimentar rutas reductoras microbianas en el suelo, favoreciendo la mineralización de materia orgánica y la disponibilidad de carbono intermedio para degradadores secundarios; esta función fermentativa y el papel del digestato como portador de microbiota funcional están documentados en revisiones recientes sobre la diversidad y aplicaciones del microbioma del digestato (Roopnarain, Akindolire, Rama y Ndaba, 2023).

Las *Treponema* observado con alta abundancia en la fase final participa en la fermentación de carbohidratos generando H_2 , que puede ser consumido por arqueas metanogénicas u otros microorganismos reductores en condiciones anóxicas del suelo, contribuyendo a la atenuación de contaminantes orgánicos; estos acoples tróficos y su relevancia en digestatos y suelos se discuten en síntesis sobre digestato-suelo (Van Midden, Harris, Shaw, Sizmur y Pawlett, 2023).

Las arqueas metanogénicas, particularmente *Methanocorpusculum* y *Methanosarcina*, participan en los ciclos finales de estabilización del carbono al transformar intermediarios en metano dentro del digestato; este "cierre" parcial del ciclo del carbono reduce el carbono fácilmente disponible que podría generar emisiones no deseadas tras la aplicación al suelo, y además el digestato puede modular la microbiota edáfica y aumentar su abundancia o mantenerla estable dependiendo de su calidad y del contexto edáfico (Van Midden *et al.*, 2023).

En suelos con metales traza, la enmienda con digestato puede favorecer la inmovilización o retención superficial de dichos metales mediante cambios de pH, CEC y condiciones redox, y esa inmovilidad puede reforzarse con fitogestión mediante cultivos energéticos (ej., *Panicum virgatum*, *Pennisetum alopecuroides*), reduciendo la migración vertical de Pb, Zn y Cu (Bonet-García *et al.*, 2023).

En conjunto, los microorganismos identificados en la digestión anaeróbica respaldan, con evidencia científica reciente, un potencial biotecnológico real para la restauración biológica de suelos contaminados, actuando como consorcios sinérgicos capaces de promover la fermentación primaria, la provisión de intermediarios metabólicos, la estabilización del carbono y la inmovilización de metales. Estas funciones microbianas pueden traducirse en mejoras en la calidad biológica y funcional del suelo, incrementando la diversidad microbiana, la actividad enzimática y la capacidad de retención de nutrientes cuando el digestato se aplica adecuadamente como enmienda orgánica (Van Midden *et al.*, 2023).

Por lo tanto, el aprovechamiento de estos consorcios microbianos derivados de la digestión anaeróbica representa una estrategia biotecnológica sostenible que integra la gestión de residuos pecuarios con la recuperación de suelos degradados, en coherencia con los objetivos de la bioeconomía circular y la sostenibilidad ambiental siempre que se ajusten dosis y condiciones edáficas al contexto del sitio (Roopnarain *et al.*, 2023).

CONCLUSIONES

La caracterización metagenómica de las comunidades microbianas en la biodigestión anaeróbica de deyecciones bovinas permitió evidenciar la dinámica sucesional y funcional de los consorcios microbianos responsables de la transformación de materia orgánica y la producción de biogás. En las primeras etapas del proceso predominaron bacterias fermentativas como *Bacteroides* y *Lysinibacillus*, implicadas en la degradación de compuestos orgánicos complejos y la generación de ácidos grasos volátiles, mientras que en las fases intermedia y final se incrementaron los géneros *Treponema*, *Rikenellaceae* y arqueas metanogénicas como *Methanocorpusculum* y *Methanosarcina*, evidenciando una transición metabólica hacia rutas de metanogénesis y estabilización del carbono.

Los resultados confirman que el proceso de digestión anaeróbica constituye un sistema biológico eficiente y autorregulado, donde la cooperación metabólica entre bacterias y arqueas optimiza la conversión de residuos pecuarios en bioenergía y biofertilizantes. Además, la composición microbiana identificada sugiere un potencial biorremediador relevante, dado que los géneros detectados presentan funciones asociadas a la inmovilización de metales, la reducción de contaminantes orgánicos y la regeneración del microbiota del suelo cuando el digestato se utiliza como enmienda orgánica.

En términos biotecnológicos, los hallazgos refuerzan la viabilidad del aprovechamiento integral del estiércol bovino no solo como fuente de energía renovable, sino también como insumo para la recuperación de suelos degradados, en concordancia con los principios de la economía circular y los Objetivos de Desarrollo Sostenible 7, 12 y 13. Se recomienda en futuras investigaciones evaluar experimentalmente el efecto del digestato en diferentes tipos de suelos y concentraciones, a fin de validar su impacto real sobre la calidad edáfica y la disponibilidad de nutrientes.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

No aplicable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

FINANCIACIÓN

No aplicable.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: R.J.B.M. y J.A.L.S.; Metodología: R.J.B.M.; Software: J.A.L.S.; Validación: X.P.C.M., C.M.S.C. y M.A.D.P.; Análisis formal: M.A.D.P.; Investigación: R.J.B.M.; Recursos: X.P.C.M.; Curación de datos: C.M.S.C.; Escritura - preparación del borrador original: J.A.L.S.; Escritura - revisión y edición: X.P.C.M.; Visualización: R.J.B.M.; Supervisión: R.J.B.M.; Administración del proyecto: R.J.B.M.

AGRADECIMIENTOS

No aplicable.

LITERATURA CITADA

- Agustini, C. B., da Costa, M., & Gutterres, M. (2020). Biogas from Tannery Solid Waste Anaerobic Digestion Is Driven by the Association of the Bacterial Order Bacteroidales and Archaeal Family Methanosaetaceae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 192(2), 482-493. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03326-6>
- Ahlberg-Eliasson, K., Westerholm, M., Isaksson, S., & Schnürer, A. (2021). Anaerobic digestion of animal manure and influence of organic loading rate and temperature on process performance, microbiology, and methane emission from digestates. *Frontiers in Energy Research*, 9, 740314. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.740314>
- Aremanda, R. B., Debretson, S., Tesfalem, S., & Menghisteab, R. (2023). Competence of Cow Manure as a Sustainable Feedstock for Bioenergy and Biofertilizer Production. *International Journal on Food, Agriculture and Natural Resources*, 4(2), 59-67. <https://doi.org/10.46676/ij-fanres.v4i2.135>
- Ayala, S., Jijón, P., & Chacha, P. (2022). Estudio de un sistema de energía renovable para la producción de biogás a partir del estiércol de ganado en la hacienda Nueva Esperanza (Cotopaxi, Ecuador). *Espacios*, 43(05), 64-72. <https://doi.org/10.48082/espacios-a22v43n05p05>
- Ayilara, M. S., & Babalola, O. O. (2023). Bioremediation of environmental wastes: the role of microorganisms. *Frontiers in Agronomy*, 5, 1183691. <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1183691>
- Bonet-Garcia, N., Baldasso, V., Robin, V., Gomes, C. R., Guibaud, G., Alves, M. J., ... & Almeida, C. M. R. (2023). Metal mobility in an anaerobic-digestate-amended soil: the role of two bioenergy crop plants and their metal phytoremediation potential. *Frontiers in Environmental Science*, 11, 1267463. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1267463>
- Cai, M., Wilkins, D., Chen, J., Ng, S. K., Lu, H., Jia, Y., & Lee, P. K. (2016). Metagenomic reconstruction of key anaerobic digestion pathways in municipal sludge and industrial wastewater biogas-producing systems. *Frontiers in Microbiology*, 7, 778. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00778>
- DeAngelis, M. M., Wang, D. G., & Hawkins, T. L. (1995). Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Research*, 23(22), 4742. <https://doi.org/10.1093/nar/23.22.4742>
- Donoso-Bravo, A., Sadino-Riquelme, C., Gómez, D., Segura, C., Valdebenito, E., & Hansen, F. (2018). Modelling of an anaerobic plug-flow reactor. Process analysis and evaluation approaches with non-ideal mixing considerations. *Bioresource Technology*, 260, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.082>
- Giongo, A., Granada, C. E., Borges, L. G., Pereira, L. M., Trindade, F. J., Mattiello, S. P., ... & Medina-Silva, R. (2020). Microbial communities in anaerobic digesters change over time and sampling depth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 1177-1190. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00272-7>
- Grossi, G., Goglio, P., Vitali, A., & Williams, A. G. (2019). Livestock and climate change: impact of livestock on climate and mitigation strategies. *Animal Frontiers*, 9(1), 69-76. <https://doi.org/10.1093/af/vfy034>
- Gülen, G., İnce, O., Uzun, Ö., Erdem, E. I., & İnce, B. (2025). Enhancing biomethane production from cattle manure by integrating rumen bacteria: a microbial analyses with next-generation sequencing and quantitative PCR. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(23), 30359-30373. <https://doi.org/10.1007/s13399-025-06783-3>
- Harirchi, S., Wainaina, S., Sar, T., Nojourni, S. A., Parchami, M., Parchami, M., ... & Taherzadeh, M. J. (2022). Microbiological insights into anaerobic digestion for biogas, hydrogen or volatile fatty acids (VFAs): a review. *Bioengineered*, 13(3), 6521-6557. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2035986>
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). (2021). *Climate change 2021: The physical science basis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Kadam, R., Jo, S., Lee, J., Khanthong, K., Jang, H., & Park, J. (2024). A review on the anaerobic co-digestion of livestock manures in the context of sustainable waste management. *Energies*, 17(3), 546. <https://doi.org/10.3390/en17030546>
- Lim, J. W., Park, T., Tong, Y. W., & Yu, Z. (2020). The microbiome driving anaerobic digestion and microbial analysis. In Z. Yu (Ed.), *Advances in bioenergy* (pp. 1-61). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2020.04.001>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Pande, V., Pandey, S. C., Sati, D., Bhatt, P., & Samant, M. (2022). Microbial interventions in bioremediation of heavy metal contaminants in agroecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 13, 824084. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.824084>
- Pastorelli, R., Casagli, A., Rocchi, F., Tampio, E., Laaksonen, I., Becagli, C., & Lagomarsino, A. (2024). Effects of anaerobic digestates and biochar amendments on soil health, greenhouse gas emissions, and microbial communities: A mesocosm study. *Applied Sciences*, 14(5), 1917. <https://doi.org/10.3390/app14051917>
- Pérez-Bravo, S. G., Bautista-Vargas, M. E., Hernández-Sánchez, A., & Enrique-Padilla, J. (2017). Evaluación del potencial de generación de estiércol como materia prima para la producción de biogás en la Zona Altamira, Tamualipas. *Revista de Sistemas Experimentales*, 4(10), 34-40.
- QIIME 2 Development Team (2023). *QIIME 2 (version 2023.2)*. Seattle, WA, USA: QIIME 2 Development Team.
- Roopnarain, A., Akindolire, M. A., Rama, H., & Ndaba, B. (2023). Casting light on the micro-organisms in digestate: Diversity and untapped potential. *Fermentation*, 9(2), 160. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020160>
- Rusanowska, P., Zieliński, M., Kisielewska, M., Dudek, M., Paukzto, Ł., & Dębowski, M. (2025). Methane Production, Microbial Community, and Volatile Fatty Acids Profiling During Anaerobic Digestion Under Different Organic Loading. *Energies*, 18(3), 575. <https://doi.org/10.3390/en18030575>
- Sevillano, C. A., Pesantes, A. A., Peña-Carpio, E., Martínez, E. J., & Gómez, X. (2021). Anaerobic digestion for producing renewable energy—the evolution of this technology in a new uncertain scenario. *Entropy*, 23(2), 145. <https://doi.org/10.3390/e23020145>
- Speksnijder, D. C., Hopman, N. E., Kusters, N. E., Timmerman, A., Swinkels, J. M., Penterman, P. A., ... & Zomer, A. L. (2022). Potential of ESBL-producing *Escherichia coli* selection in bovine feces after intramammary administration of first generation cephalosporins using in vitro experiments. *Scientific Reports*, 12(1), 15083. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15558-z>
- Stolze, Y., Bremges, A., Rummig, M., Henke, C., Maus, I., Pühler, A., ... & Schlüter, A. (2016). Identification and genome reconstruction of abundant distinct taxa in microbiomes from one thermophilic and three mesophilic production-scale biogas plants. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0565-3>
- Van Midden, C., Harris, J., Shaw, L., Sizmur, T., & Pawlett, M. (2023). The impact of anaerobic digestate on soil life: A review. *Applied Soil Ecology*, 191, 105066. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105066>
- Wang, S., Ma, F., Ma, W., Wang, P., Zhao, G., & Lu, X. (2019). Influence of temperature on biogas production efficiency and microbial community in a two-phase anaerobic digestion system. *Water*, 11(1), 133. <https://doi.org/10.3390/w11010133>