



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

## **CARACTERIZACIÓN FERMENTATIVA DE BIODIGESTORES DE CERDAZA Y AISLAMIENTO DE UNA ARQUEOBACTERIA METANOGENICA**

**MARÍA GUADALUPE DOMÍNGUEZ ORDÓÑEZ**

**T E S I S**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2014**

La presente tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN FERMENTATIVA DE BIODIGESTORES DE CERDAZA Y AISLAMIENTO DE UNA ARQUEOBACTERIA METANOGENICA** realizada por la estudiante **MARÍA GUADALUPE DOMÍNGUEZ ORDÓÑEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO



DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR



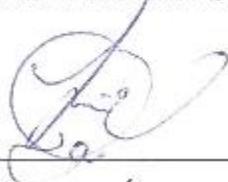
DR. JOSÉ RICARDO BÁRCENA GAMA

ASESOR



DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR



DR. DAVID HERNÁNDEZ SÁNCHEZ

ASESOR



DR. SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo del 2014

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** quien ha sido mi guía en todo momento, por darme una gran familia que es lo mejor que tengo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico brindado durante mis estudios de doctorado.

Al **Dr. Mario Antonio Cobos Peralta** por su apoyo, confianza, amistad y por haberme permitido participar en este proyecto de investigación y con ello brindarme la oportunidad de complementar mi formación.

A los integrantes de mi comité: **Dr. José Ricardo Bárcena Gama, Dr. Ronald Ferrera Cerrato, Dr. David Hernández Sánchez y Dr. Sergio Segundo González Muñoz** por su apoyo en la realización de esta tesis, además por las observaciones realizadas para mejorar este documento.

A **todos los profesores** de Ganadería y **personal de apoyo** del laboratorio de Microbiología Ruminal por su colaboración en mi formación académica y realización de mi investigación.

“Yo no estudio para saber más  
sino para ignorar menos”

Sor Juana Inés De la Cruz

## DEDICATORIA

A mis padres **Leonel** y **María Flavia** quienes no sólo me dieron la vida, sino que gracias a ellos, a su apoyo, consejos y reprimendas he logrado uno de mis más anhelados triunfos, terminar mis estudios de Doctorado, ellos quienes son mi más grande orgullo y ejemplo a seguir.

A mis hermanos **Leonel, Ramón, Joel, Magdalena, Claudio, Demetrio** y **Cecilia**, quienes a pesar de nuestras diferencias siempre me apoyaron en todo cuanto pudieron.

A mi cuñada y amiga **Noemi** que además de brindarme su amistad me considero una integrante más en su familia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio **Mayra, Felipe, Daniel, José Carlos, Iván y Paulino** por su apoyo en la realización de esta investigación y por todo el tiempo que hemos compartido.

A **Ezequías Castillo**, pareja y amigo incondicional quien me ha apoyado en cada decisión, te amo.

# CONTENIDO

Página

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>CONTENIDO</b> .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>2. CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 Producción de biogás y CH <sub>4</sub> .....	2
2.2 Factores que afectan la producción de biogás y CH <sub>4</sub> .....	3
2.2.1 Sustrato .....	3
2.2.2 Antibióticos en heces .....	4
2.2.3 Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) .....	5
2.2.4 Concentración de NH <sub>3</sub> .....	6
2.2.5 Relación carbono: nitrógeno (C:N) .....	7
2.2.6 Temperatura .....	7
2.2.7 pH .....	8
2.2.8 Potencial de óxido reducción .....	9
2.2.9 Sólidos totales .....	10
2.2.10 Población de arqueobacterias metanogénicas .....	11
2.3 Alternativas para mejorar la producción de CH <sub>4</sub> .....	11
2.3.1 Dilución del contenido de NH <sub>3</sub> .....	12
2.3.2 Uso de aditivos inorgánicos .....	12
2.3.3 Uso de inóculos .....	13
2.4 Arqueobacterias metanogénicas .....	14
2.4.1 Características de las arqueobacterias metanogénicas .....	14
2.4.2 Factor 420 .....	17
2.4.3 Coenzima M .....	17
2.4.4 Metanogénesis .....	18
2.5 Métodos de conservación de inóculos .....	21
2.5.1 Congelación .....	21
2.5.2 Liofilización .....	22
2.6 Uso de crioprotectores .....	23
2.6.1 Glicerol .....	23
2.6.2 Tween 80 .....	24
2.6.3 Carbón activado .....	25
2.7 Literatura citada .....	26

3. CAPÍTULO II. AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE UNA ARQUEOBACTERIA METANOGÉNICA .....	35
3.1 Resumen .....	35
3.2 Abstract.....	36
3.3 Introducción .....	37
3.4 Materiales y métodos.....	38
3.4.1 Aislamiento y conservación de la arqueobacteria.....	38
3.4.2 Producción de biogás .....	41
3.4.3 Determinación de CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> y AGV .....	42
3.4.4 Conteo de arqueobacterias metanogénicas .....	43
3.4.5 Medición del potencial de óxido-reducción y pH.....	43
3.4.6 Identificación molecular mediante el gen ADNr 16S .....	44
3.4.7 Diseño experimental y análisis estadístico .....	45
3.5 Resultados y discusión .....	46
3.5.1 Características de la arqueobacteria metanogénica.....	46
3.5.2 Identificación molecular .....	48
3.5.3 Efecto del carbón activado en la conservación de la arqueobacteria .....	49
3.6 Conclusiones .....	52
3.7 Literatura citada .....	52
4. CAPÍTULO III. INOCULACIÓN DE BIODIGESTORES DE CERDAZA CON ARQUEOBACTERIAS METANOGÉNICAS.....	56
4.1 Resumen .....	56
4.2 Abstract.....	57
4.3 Introducción .....	58
4.4 Materiales y métodos.....	59
4.4.1 Fuente de inóculo .....	59
4.4.2 Producción de biogás .....	59
4.4.3 Determinación de CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> y AGV .....	61
4.4.4 Conteo de bacterias totales, metanogénicas y celulolíticas .....	62
4.4.5 Medición del potencial de óxido-reducción y pH.....	63
4.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico .....	63
4.5 Resultados y discusión .....	64
4.5.1 Producción de biogás, CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> en biodigestores de cerdaza .....	64
4.5.2 AGV generados en biodigestores con cerdaza .....	67
4.5.3 Concentración de bacterias totales, celulolíticas y arqueobacterias metanogénicas en biodigestores de cerdaza.....	68
4.5.4 Potencial de Óxido-reducción y pH de biodigestores de cerdaza.....	69
4.6 Conclusiones .....	69
4.7 Literatura citada .....	70

5.	CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN DE BIODIGESTORES DE CERDAZA CON UN pH Y POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUCCIÓN SIMILAR .....	73
5.1	Resumen .....	73
5.2	Abstract.....	74
5.3	Introducción .....	75
5.4	Materiales y métodos.....	76
5.4.1	Fuente de inóculo .....	76
5.4.2	Producción de biogás .....	76
5.4.3	Determinación de CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> y AGV .....	78
5.4.4	Determinación de NH <sub>3</sub> .....	78
5.4.5	Conteo de bacterias totales, metanogénicas y celulolíticas .....	79
5.4.6	Medición del potencial de óxido-reducción y pH.....	80
5.4.7	Diseño experimental y análisis estadístico .....	81
5.5	Resultados y discusión .....	81
5.5.1	Producción de biogás, CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> en biodigestores de cerdaza .....	81
5.5.2	AGV y NH <sub>3</sub> generados en biodigestores con cerdaza.....	83
5.5.3	Concentración de bacterias totales, celulolíticas y arqueobacterias metanogénicas en los biodigestores de cerdaza .....	84
5.5.4	Potencial de óxido-reducción y pH de biodigestores de cerdaza.....	86
5.6	Conclusiones .....	87
5.7	Literatura citada .....	87
6.	CONCLUSIONES GENERALES .....	90

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Producción específica de CH <sub>4</sub> usando diferentes fuentes.....	3
Cuadro 2. Composición del biogás. ....	4
Cuadro 3. Diferencias en el tipo de respiración y moléculas acarreadoras a diferentes potenciales de óxido-reducción.....	10
Cuadro 4. Sólidos totales en biodigestores con excretas animales. ....	10
Cuadro 5. Características morfológicas y metabólicas de las principales familias de arqueobacterias metanogénicas.....	16
Cuadro 6. Reacciones para la producción de CH <sub>4</sub> utilizando diferentes sustratos. ....	19
Cuadro 7. Concentraciones usadas de glicerol en el proceso de conservación de diferentes organismos.....	24
Cuadro 8. Uso del tween 80 como crioprotector de bacterias durante la congelación.....	24
Cuadro 9. Composición del medio de cultivo selectivo usado para el aislamiento de una arqueobacteria metanogénica.....	39
Cuadro 10. Características de las arqueobacterias metanogénicas liofilizadas y activadas.....	50
Cuadro 11. Producción de AGV en medios inoculados con arqueobacterias metanogénicas liofilizadas. ....	51
Cuadro 12. Biogás producido por una arqueobacteria metanogénica liofilizada con carbón activado después de 96 h de incubación. ....	51
Cuadro 13. Composición del medio de cultivo para conteo de bacterias celulolíticas. ....	63

Cuadro 14. Producción de biogás, CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> a 24, 48 y 72 h de fermentación por cada 100 g de cerdaza, con diferentes inóculos.....	65
Cuadro 15. Proporción de AGV generados en biodigestores de cerdaza fermentada por 72 h.....	67
Cuadro 16. Bacterias totales, arqueobacterias metanogénicas y celulolíticas cuantificadas en biodigestores de cerdaza después de 72 h de fermentación. ..	68
Cuadro 17. Potencial de óxido-reducción y pH de biodigestores con cerdaza fermentada por 72 h.....	69
Cuadro 18. Composición de la solución para ajustar las excretas de cerdo a 5 % de MS. ....	77
Cuadro 19. Composición del medio de cultivo para conteo de bacterias celulolíticas. ....	80
Cuadro 20. Producción de biogás, CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> a 24, 48 y 72 h de fermentación de 100 g de cerdaza con diferentes inóculos.....	82
Cuadro 21. Proporción de AGV y NH <sub>4</sub> generados en biodigestores de cerdaza fermentada por 72 h.....	84
Cuadro 22. Concentración de bacterias totales, celulolíticas y arqueobacterias metanogénicas en biodigestores de cerdaza después de 72 h de fermentación. ....	85
Cuadro 23. Potencial de óxido-reducción y pH de biodigestores con cerdaza fermentada por 72 h.....	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la coenzima F <sub>420</sub> . .....	17
Figura 2. Estructura de la CoM (Ácido 2-mercaptoetanosulfónico).....	18
Figura 3. Metanogénesis .....	20
Figura 4. Morfología y tinción de la arqueobacteria metanogénica aislada. ....	46
Figura 5. Fluorescencia y morfología de la arqueobacteria metanogénica aislada. .....	46
Figura 6. Dimensiones de la arqueobacteria metanogénica aislada, vista e un microscopio confocal usando un láser de 405 nm. ....	47
Figura 7. Imagen 3D de una arqueobacterias metanogénica aislada vista en un microscopio confocal usando un láser de 405 nm. ....	48
Figura 8. Secuencia de nucleótidos obtenidos del análisis de ADNr 16S de una arqueobacteria metanogénica aislada del rumen. ....	49
Figura 9. Sistema de captación de biogás.....	60

# 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El proceso de digestión anaerobia de excretas animales es recomendado para reducir la emisión de gases efecto invernadero, debido a que el biogás generado es una fuente de energía alterna que puede sustituir a las fuentes convencionales, las cuales generan problemas ambientales (Shi *et al.*, 2011). La digestión anaerobia favorece también el aprovechamiento energético de los residuos orgánicos como fertilizante (Flotats *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2011).

Diferentes condiciones operacionales como son: temperatura, pH y tiempo de retención pueden afectar las características de la digestión anaerobia, donde los componentes orgánicos son descompuestos por varios microorganismos (Shi *et al.*, 2011). En el Capítulo I se presenta una revisión para describir los principales factores que afectan la producción de biogás y en particular de metano (CH<sub>4</sub>), así como, algunas alternativas para incrementar la producción de ambos.

El uso de inóculos es una alternativa para incrementar la producción de CH<sub>4</sub>; sin embargo, debido a los problemas que causa mantener una fuente viva de inóculo, se buscan alternativas como la preservación de microorganismos, desarrollando metodologías como la congelación de cultivos a -20 o -40 °C, la preservación en nitrógeno líquido a -196 °C (Arcos *et al.*, 2004) y la liofilización. Los métodos de conservación se describen en el Capítulo 2 así como las ventajas de usar crioprotectores para evitar la ruptura de las membranas celulares con los cristales de hielo que se forman durante la conservación de los inóculos.

En el Capítulo 3 se presenta un estudio cuyo objetivo fue aislar una arqueobacteria metanogénica que pueda promover la síntesis de CH<sub>4</sub> en biodigestores. En el Capítulo 4 y 5 se presentan los resultados del uso del carbón activado como crioprotector durante el proceso de liofilización, y el efecto

de una arqueobacteria como inóculo en biodigestores de cerdaza sobre la producción de CH<sub>4</sub>, ácidos grasos volátiles (AGV) y población bacteriana en biodigestores de cerdaza.

## 2. CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Producción de biogás y CH<sub>4</sub>

La fermentación anaerobia reduce significativamente el volumen total del material fermentado generando biogás (compuesto por CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>) y un fertilizante (sólido y líquido) libre de patógenos (Marchaim, 1992; Gilroyed *et al.*, 2010). Los principales factores que eliminan los patógenos o reducen su viabilidad durante la fermentación anaerobia son temperatura, tiempo de retención, competencia microbiana, pH e interacciones químicas (Smith *et al.*, 2005).

Durante la fermentación anaerobia termofílica las bacterias patógenas son destruidas por temperaturas superiores a 45 °C y esta es una de sus principales ventajas, pero hay desventajas como la reducción de la estabilidad del proceso, mayor deshidratación del material fermentado y elevados gastos de energía para mantener dichas temperaturas (Gallert y Winter, 1997; Salsali *et al.*, 2006). En el proceso de fermentación se remueven sólo los gases generados (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S) que representan 5 a 10 % del volumen total del material inicial y se conservan en el efluente nutrientes minerales (N, P, K) que son esenciales para las plantas. Lo anterior lo convierte en un valioso abono orgánico, prácticamente libre de olores, patógenos, y de fácil aplicación (Marchaim, 1992; Cepero *et al.*, 2012).

## 2.2 Factores que afectan la producción de biogás y CH<sub>4</sub>

Existen diversos factores que influyen tanto en la producción de biogás como de CH<sub>4</sub>, tales como el tipo de sustrato, presencia de antibióticos, concentración de AGV, concentración de amoníaco (NH<sub>3</sub>), relación carbono: nitrógeno (C:N), temperatura, pH, potencial de óxido reducción, concentración de sólidos totales y la población bacteriana (Thy *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2011).

### 2.2.1 Sustrato

Para la producción de biogás se usan como sustrato excretas animales, desechos sólidos municipales, residuos de la industria de alimentos, residuos altamente contaminantes de la industria del bioetanol y azúcar, y residuos vegetales (Martins *et al.*, 2009). Los sustratos ideales son los desechos orgánicos húmedos de origen agrícola, industrial, doméstico y municipal, así como las excretas de origen humano y animal (Rivas *et al.*, 2009).

La producción de CH<sub>4</sub> es variable según el material usado en el biodigestor como se muestra en el Cuadro 1 (Luna-del Risco *et al.*, 2011). La producción de CH<sub>4</sub> tiene un límite que depende fundamentalmente de la naturaleza del material usado en el biodigestor.

Cuadro 1. Producción específica de CH<sub>4</sub> usando diferentes fuentes.

Fuente	Producción acumulada de CH <sub>4</sub> , L kg SV <sup>-1</sup> *
Ensilado de forrajes	320
Ensilado de maíz	339
Mezcla de ensilado	392
Heno	321
Excretas de cerdo	247
Excretas de bovino	0.37-0.61

\*Sólidos volátiles; Fuente: Luna-del Risco *et al.* (2011).

La composición del biogás (Cuadro 2) depende del tipo de proceso y de la naturaleza de la materia orgánica a ser fermentada y el contenido de CH<sub>4</sub> varía de 40 a 70 % (Cepero *et al.*, 2012). El potencial energético de 1 m<sup>3</sup> de CH<sub>4</sub> puro es similar al generado por 1.1 L de gasolina, 1.7 L de bioetanol o 0.93 m<sup>3</sup> de gas natural; sin embargo, sí se considera que el biogás contiene sólo 40 a 70 % de CH<sub>4</sub>, sería necesario purificarlo para obtener esos rendimientos (Martins *et al.*, 2009).

Cuadro 2. Composición del biogás.

Componente	Fórmula	Composición, %
Metano	CH <sub>4</sub>	40-70
Dióxido de carbono	CO <sub>2</sub>	30-60
Hidrogeno	H <sub>2</sub>	0.1
Nitrógeno	N <sub>2</sub>	0.5
Monóxido de carbono	CO	0.1
Oxígeno	O <sub>2</sub>	0.1
Sulfuro de hidrógeno	H <sub>2</sub> S	0.1

Fuente: Cepero *et al.* (2012).

### 2.2.2 Antibióticos en heces

Los antibióticos son usados en granjas porcinas para prevenir y tratar infecciones, y como promotores de crecimientos (Álvarez *et al.*, 2010). Estos antibióticos pueden ser metabolizados mediante diferentes rutas y eventualmente son excretados manteniendo la misma estructura química o como epímeros o isómeros (Martínez-Carballo *et al.*, 2007; Osman, 2008; Álvarez *et al.*, 2010). Entre el 17 y 76 % de los antibióticos administrados a los animales son excretados vía urinaria o fecal, en su forma original o como metabolitos producidos en el tubo gastrointestinal, y los residuos de antibióticos en las excretas pueden tener un efecto adverso en la operación de los sistemas

de tratamiento de la excreta porque los antibióticos reducen la actividad de bacterias inhibiendo la fermentación de los sólidos totales (Shi *et al.*, 2011).

La concentración de antibióticos en excretas pueden disminuir hasta 75 % si se realiza una fermentación anaerobia de las heces (Osman, 2008). Pero la presencia de antibióticos en las excretas afecta la producción de CH<sub>4</sub> en los biodigestores, según Álvarez *et al.* (2010), quienes adicionaron 10, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup> de oxitetraciclina y clortetraciclina a excretas de cerdos, y la producción de CH<sub>4</sub> disminuyó 56.2, 59.8 y 62.3 %, respectivamente, en los biodigestores.

Sanz *et al.* (1996) agregaron eritromicina, ampicilina, cloranfenicol, higromicina B, kanamicina, novobiocina, rifampicina, clortetraciclina, gentamicina, neomicina, penicilina G, espectinomicina, estreptomina, tilosina y doxiciclina en biodigestores y observaron que la clortetraciclina y estreptomina tuvieron un mayor efecto sobre la producción de CH<sub>4</sub> porque actúan sobre las arqueobacterias metanogénicas. Los otros antibióticos provocaron una menor disminución de CH<sub>4</sub>.

### 2.2.3 Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

Los AGV son intermediarios claves en la mineralización de materia orgánica compleja. La oxidación completa del propionato y butirato pueden contribuir 20 a 43 % de la formación total de CH<sub>4</sub> dependiendo del tipo de biodigestor y componentes de la materia orgánica (Stams *et al.*, 2012).

La concentración de AGV en biodigestores es importante en la producción de CH<sub>4</sub> y puede afectar la eficiencia. Wang *et al.* (2009) al evaluaron diferentes concentraciones de acetato, propionato y butirato, y la mayor producción de CH<sub>4</sub> se obtuvo con el tratamiento con la mayor concentración de acetato y la menor de propionato; además, las concentraciones altas de butirato no cambiaron la producción de CH<sub>4</sub>.

El propionato afecta negativamente la producción de CH<sub>4</sub> efecto observado por Barreado y Evison (1991) y Kumar *et al.* (2002) al adicionar diferentes concentraciones de propionato en biodigestores, donde la producción de biogás y en especial de CH<sub>4</sub> se redujo a medida que incrementaba la concentración de propionato.

#### 2.2.4 Concentración de NH<sub>3</sub>

El NH<sub>3</sub> es esencial para el crecimiento de los microorganismos presentes en biodigestores, sin embargo, concentraciones elevadas inhiben la fermentación anaerobia porque son tóxicas para las arqueobacterias metanogénicas y en menor medida para las eubacterias presentes (Kayhanian, 1994; Sasaki *et al.*, 2011). La concentración adecuada en condiciones mesofílicas es de 80-150 mg N-NH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> a pH de 7.5. Mientras que, en condiciones termofílicas a un pH de 7.2 es de 250 mg N-NH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> (Gallert y Winter, 1997). La concentración de NH<sub>3</sub> libre incrementa a temperaturas altas y pH alcalino (Sasaki *et al.*, 2011).

Niveles altos de NH<sub>3</sub> en biodigestores causan fallas, donde las arqueobacterias metanogénicas son inhibidas y los AGV acumulados lo que disminuye el pH e inhibe todas las etapas del proceso de digestión (Nielsen y Angelidaki, 2008). El ion amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) inhibe también la producción de CH<sub>4</sub>, aunque su forma no ionizada es más tóxica por su capacidad de penetrar a través de la membrana celular (Benabdallah *et al.*, 2009).

La toxicidad por NH<sub>3</sub> es un problema, principalmente, durante la degradación anaerobia de materiales con alto contenido de proteína, como lo observaron Krylova *et al.* (1997) al adicionar diferentes concentraciones de NH<sub>3</sub> en biodigestores de pollinaza, al adicionar más de 10 g dm<sup>-3</sup> NH<sub>3</sub> la producción de CH<sub>4</sub> disminuyó 80 a 90 % y el biogás 50 a 60 %, además, las arqueobacterias metanogénicas se inhibieron, pero no las bacterias hidrolíticas y acetogénicas,.

### 2.2.5 Relación carbono: nitrógeno (C:N)

La relación C:N debe mantenerse en una proporción de 20 a 30 partes del primer elemento por cada parte del segundo, debido a que se ha observado que durante la digestión anaerobia los microorganismos utilizan de 20 a 30 veces más carbono que nitrógeno, entonces es necesario mantener dicha proporción en el contenido de los biodigestores para su adecuado funcionamiento (Santosh *et al.*, 2004).

Cuando la proporción de nitrógeno aumenta, la producción de biogás disminuye por la formación de  $\text{NH}_3$ , que se genera durante la degradación anaeróbica de urea o proteínas. El  $\text{NH}_3$  libre puede inhibir la fermentación anaerobia y ser tóxico para las arqueobacterias metanogénicas (Gallert y Winter, 1997).

### 2.2.6 Temperatura

La temperatura dentro del biodigestor afecta el proceso de producción del biogás, que ocurre en intervalos de temperatura de 5 a 60 °C (Osorio *et al.*, 2007). Hay diferentes intervalos de temperatura en los que se lleva a cabo la fermentación anaerobia; psicrófilico (<30 °C), mesofílico (30-40 °C) y termofílico (50-60 °C), aunque los microorganismos anaerobios son más activos en temperaturas mesofílicas y termofílicas (Santosh *et al.*, 2004).

La digestión anaerobia no se afecta si la temperatura aumenta en unos pocos grados, sin embargo, una disminución retardaría la síntesis de  $\text{CH}_4$ , sin perjudicar la actividad de las bacterias acidificantes, lo que permite una excesiva acumulación de ácidos y posible falla en el biodigestor debido a que las arqueobacterias metanogénicas son más sensibles a la temperatura que los demás microorganismos presentes en un biodigestor, a causa de que su velocidad de crecimiento es más lenta (Osorio *et al.*, 2007).

A temperaturas más altas el pH incrementa por la reducida solubilidad del  $\text{CO}_2$ , que genera una mayor proporción de  $\text{NH}_3$  libre el cual inhibe la fermentación anaerobia y es tóxico para las arqueobacterias metanogénicas (Gallert y Winter, 1997) efecto que evaluaron Angelidaki y Ahring (1993) al agregar altas concentraciones de  $\text{NH}_3$  en biodigestores donde la tasa de crecimiento de arqueobacterias metanogénicas se redujo en 50 %.

Álvarez y Lidén (2008) evaluaron el efecto de cambiar la temperatura en biodigestores, observaron que al disminuir de 35 a 25 °C se redujo 30 % la producción de biogás y 20 % el  $\text{CH}_4$ , mientras que, si la temperatura disminuye de 25 a 18 °C la reducción del biogás fue de 51 % y de  $\text{CH}_4$  47 % por lo cual la proporción de  $\text{CH}_4$  en el biogás incrementa al disminuir la temperatura, ellos concluyen que la digestión anaerobia es un proceso que depende de la temperatura y que la mayor producción de biogás fue a 35 °C.

La disminución en la producción de biogás durante los meses de invierno es un serio problema en la aplicación de estos sistemas en países con clima frío (Martins *et al.*, 2009), aunque adaptaciones a largo plazo de las comunidades microbianas, especialmente de las arqueobacterias metanogénicas, son esenciales para el tratamientos de estiércol a bajas temperaturas (Santosh *et al.*, 2004).

### 2.2.7 pH

El pH afecta el crecimiento de las comunidades microbianas durante la fermentación anaerobia, el pH de un biodigestor debe mantenerse de 6.8 a 7.2 (Santosh *et al.*, 2004). En cada fase del proceso los microorganismos presentan máxima actividad en un intervalo de pH diferenciado, aunque siempre alrededor de la neutralidad. En residuos con bajo poder amortiguador de pH (baja alcalinidad) es necesario controlarlo exteriormente, a fin de evitar su disminución debida a los ácidos generados (Flotats *et al.*, 2001); el  $\text{CO}_2$  y los AGV

producidos durante el proceso de fermentación también disminuyen el pH del biodigestor (Santosh *et al.*, 2004).

La disminución de la temperatura en un biodigestor seguida por el su restablecimiento genera una menor producción de biogás y la acumulación de AGV que bajan el pH (Budiyono *et al.*, 2010).

Cuando incrementa la cantidad de sustrato agregado, disminuye el pH por la mayor producción de AGV; el pH puede ser un indicador si el sistema está siendo sobrecargado, la disminución del pH inhibe el crecimiento de las arqueobacterias metanogénicas y en consecuencia la reducción en la producción de biogás. Cuando la concentración de  $\text{NH}_3$  incrementa debido a la digestión de nitrógeno el pH incrementa a valores superiores a 8 (Kumar *et al.*, 2010).

#### 2.2.8 Potencial de óxido reducción

La digestión anaerobia es un proceso que requiere condiciones anaerobias estrictas (potencial óxido-reducción  $< -200$  mV) y depende de la actividad coordinada de un complejo grupo de microorganismos para transformar la materia orgánica en  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  principalmente (Appels *et al.*, 2008).

Los microorganismos anaerobios sobreviven y degradan los sustratos más eficientemente cuando el potencial de óxido-reducción de su ambiente está entre  $-200$  y  $-400$  mV, alguna cantidad de oxígeno disuelto en los digestores incrementa el potencial de óxido-reducción y afecta la actividad anaerobia incluyendo hidrólisis, acetogénesis y metanogénesis (Cuadro 3; Gerardi, 2003).

Cuadro 3. Diferencias en el tipo de respiración y moléculas acarreadoras a diferentes potenciales de óxido-reducción

Potencial de óxido-reducción, mV	Molécula acarreadora de electrones	Condición	Respiración
>+50	O <sub>2</sub>	Aerobia	Aerobia
+50 a -50	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> o NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anaerobia	Anóxica
<-50	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Anaerobia	Fermentación, sulfato reducción
<-100	Componentes orgánicos	Anaerobia	Fermentación, producción de ácidos
<-300	CO <sub>2</sub>	Anaerobia	Fermentación, producción de CH <sub>4</sub>

Fuente: Gerardi (2003).

#### 2.2.9 Sólidos totales

La materia fermentable con la que se alimenta el biodigestor debe tener de 5 a 10 % de sólidos totales. Concentraciones inferiores a 5 % provocan inestabilidad del sistema mientras que cuando los sólidos superan el 10 % provocan una sobrecarga del fermentador (Cuadro 4; Santosh *et al.*, 2004).

Cuadro 4. Sólidos totales en biodigestores con excretas animales.

Tipo de excreta	ST, %	Fuente
Cerdaza	10	Sophin y Preston, 2001
Cerdaza	6.9	Thy <i>et al.</i> , 2003
Bovino	10	Yuan <i>et al.</i> , 2011
Bovino	6	Xiong <i>et al.</i> , 2011

Budiyono *et al.* (2010) evaluaron diferentes contenidos de sólidos totales en biodigestores con excretas de bovino, el mayor rendimiento en producción de biogás fue en aquellos biodigestores con 7.4 y 9.2 % de sólidos totales, en

contraste, Tekin y Coskun (2003) determinaron que con 5 % de sólidos totales en biodigestores alimentados con orujo de oliva se produjo la mayor cantidad de biogás y CH<sub>4</sub>, y disminuyeron a medida que incrementaron las concentraciones a 10 y 15 %.

#### 2.2.10 Población de arqueobacterias metanogénicas

El rendimiento de un biodigestor está determinado principalmente por la estructura de la comunidad microbiana presente en el mismo (Rivas *et al.*, 2009); para que se produzca biogás en un biodigestor debe existir una proporción óptima entre la población de arqueobacterias metanogénicas y bacterias anaerobias (Angelidaki *et al.*, 1997).

La actividad de las arqueobacterias normalmente es calculada por comparación entre el sustrato consumido y la cantidad de CH<sub>4</sub> producido durante el proceso de fermentación; lo cual no siempre es cierto según Solero *et al.* (2001), quienes relacionaron la producción de CH<sub>4</sub> con la biomasa y con la población de arqueobacterias usando la fluorescencia; ellos concluyen que la producción de CH<sub>4</sub> tiene una relación logarítmica con la cantidad de arqueobacterias presentes en el sistema, pero no hay correlación para la producción de CH<sub>4</sub> asociada a la biomasa.

### 2.3 Alternativas para mejorar la producción de CH<sub>4</sub>

Para incrementar la producción de biogás hay diferentes métodos como el uso de aditivos, inóculos, y cambios en variables operacionales como la temperatura, el tiempo de retención y el tamaño de partícula del sustrato (Martins *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Dilución del contenido de NH<sub>3</sub>

La dilución del contenido del biodigestor es un método para reducir la concentración de NH<sub>3</sub>; Nielsen y Angelidaki (2008) evaluaron diferentes estrategias para disminuir el tiempo de recuperación de un biodigestor inhibido por altas concentraciones (1.2 g-NH<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) de NH<sub>3</sub>, de los tratamientos que usaron el más viable fue la adición de excretas frescas que además de recuperar el proceso por la dilución del NH<sub>3</sub>, también incrementaron la producción de CH<sub>4</sub>.

Sasaki *et al.* (2011) utilizaron fibras de carbón en biorreactores termofílicos para promover la tolerancia de las bacterias a altas concentraciones de NH<sub>3</sub>, ellos observaron que en los biorreactores que contenían fibras de carbón y concentración de NH<sub>3</sub> de 850 a 1500 mg L<sup>-1</sup>, la producción de biogás y contenido de CH<sub>4</sub> incrementaron y la concentración de AGV disminuyó.

### 2.3.2 Uso de aditivos inorgánicos

Algunos aditivos inorgánicos favorecen la producción de biogás, porque retienen las bacterias en los biodigestores, la adición de cationes metálicos incrementa la densidad de bacteria debido a que favorece la formación de agregados, incluso plantas con mayor contenido de metales pesados (Cr, Cu, Ni y Zn) tienen mayor rendimiento de CH<sub>4</sub> con relación a los que tienen menores concentraciones (Santosh *et al.*, 2004).

La inmovilización de las arqueobacterias metanogénicas se ha llevado a cabo usando carbón en los biodigestores, con el fin de mantener una alta población de éstas y evitar su pérdida durante la liberación del efluente (Nomura *et al.*, 2008).

### 2.3.3 Uso de inóculos

Cepas de algunas bacterias y hongos que generan enzimas degradadoras de celulosa tal como exoglucanasas, endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas promueven el incremento en la producción de biogás. Entre las principales enzimas parece ser que la actividad endoglucanasa es de mayor importancia en la hidrólisis de la celulosa y síntesis de  $\text{CH}_4$  (Santosh *et al.*, 2004).

Diferentes tipos de inóculos pueden ser usados para favorecer la producción de biogás durante la fermentación anaerobia, como las tres bacterias (fibrolíticas, xilanolíticas y lignolíticas) aisladas por Wahyudi *et al.* (2010) y usadas como inóculo en biodigestores, con las que incrementaron la eficiencia de la producción de biogás y  $\text{CH}_4$ , encontrando mejores resultados al usar mezclas de las tres bacterias.

La *Pseudomonas aeruginosa* degrada lípidos y produce ácidos grasos y glicerol, el glicerol generado puede ser convertido a biocombustible y también a biogás. En un experimento realizado por Potivichayanon *et al.* (2011) adicionaron un inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* en desperdicio de pastelería con la que la concentración de glicerol incrementó de 12.83 a 48.10 % y al adicionar este desperdicio a los biodigestores, la síntesis de  $\text{CH}_4$  incrementó (de 0.86 a 24.9 %) y el efecto fue mayor cuando además del pretratamiento se mezcló con excretas de cerdos (44.33 % de  $\text{CH}_4$  y 63.71 % de  $\text{CO}_2$ ).

Budiyono *et al.* (2010) evaluaron diferentes concentraciones de inóculo de fluido ruminal para potencializar la producción de biogás, para ello usaron 100 g de excretas de bovinos mezcladas con cantidades variables de agua y fluido ruminal, de acuerdo con sus resultados, el fluido ruminal adicionado en biodigestores en un intervalo de 25 a 50 % presentó los mejores rendimientos en producción de biogás, generando hasta dos veces más con relación al tratamiento sin líquido ruminal.

El uso de líquido ruminal como inóculo mejora la producción de biogás además reduce el tiempo de estabilización del biodigestor y disminuye los sólidos volátiles totales, efectos que reportan Silva *et al.* (2004) al evaluar la adición de líquido ruminal a un biodigestor de residuos sólidos municipales, con lo que redujeron hasta 23 % los sólidos volátiles totales e incrementaron 39 % la producción de CH<sub>4</sub> usando 15 %, dicho efecto lo atribuyen a la actividad de la población bacteriana en el líquido ruminal. Concentraciones inferiores al 10 % no tuvieron efectos en la producción de CH<sub>4</sub> ni en la disminución de sólidos volátiles totales.

## **2.4 Arqueobacterias metanogénicas**

Las arqueobacterias metanogénicas son microorganismos altamente especializados, no solo en los sustratos que utilizan sino también en sus productos metabólicos finales y son más sensibles a cambios en sus condiciones ambientales que otros grupos de microorganismos presentes en los procesos de digestión anaerobia (Barreado y Evison, 1991; Gallert y Winter, 1997).

### **2.4.1 Características de las arqueobacterias metanogénicas**

La baja cantidad de arqueobacterias metanogénicas aisladas se debe a sus requerimientos nutricionales específicos y a que crecen en potenciales de óxido-reducción inferiores a -300 mV y pH de 6.0 a 8.0 (Kumar *et al.*, 2009); en cultivos puros la exposición de éstos a O<sub>2</sub> causa severa inhibición del crecimiento o la muerte (Yuan *et al.*, 2009). Sesenta y seis especies de arqueobacterias metanogénicas fueron aisladas de hábitats anaerobios como rellenos sanitarios, suelos inundados, lagos salados, pantanos y del tubo gastrointestinal de diferentes animales (McAllister *et al.*, 1996; Boadi *et al.*, 2004). Solamente *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter*

*ruminantium*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter millerae*, y *Methanosarcina barkeri*, fueron aisladas del rumen y sólo *M. ruminantium* y *M. barkeri* están en poblaciones superiores a  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  (Zhou *et al.*, 2011).

Las arqueobacterias metanogénicas comprenden un grupo inusual y altamente especializado, son microorganismos anaerobios estrictos que no generan estructuras de resistencia, su pared celular carece de peptidoglicano (Weimer y Zeikus, 1978; Yuan *et al.*, 2009), su membrana está formada por una monocapa lipídica, los enlaces que tiene son éteres a diferencia de las bacterias que tienen enlaces ésteres, los principales lípidos en las arqueas son diéteres de glicerol (grupos fitanos) y tienen isopropano (Madigan *et al.*, 2009).

Aunque las arqueobacterias metanogénicas tienen características en común, también tienen características que las diferencian entre familias (Cuadro 5), como la forma, sustratos, hábitat, y tinción Gram (Dworkin *et al.*, 2006).

Cuadro 5. Características morfológicas y metabólicas de las principales familias de arqueobacterias metanogénicas.

Familia	Características
Metanobacteriaceae	Bacilos largos o cortos; utilizan H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> y algunas formato o alcoholes como sustratos para metanogénesis; cocos que utilizan sólo H <sub>2</sub> o metanol, la mayoría son Gram positivos; contienen pseudomureína; no motiles; contenido de GC, 23-61 %.
Metanotermaceae	Bacilos; los sustratos para metanogénesis son H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> ; Gram positivos; contienen pseudomureína; no motiles; termofílicos extremos; contenido de GC, 33-34 %.
Metanococcaceae	Cocos irregulares; los sustratos para metanogénesis son H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> y formato; Gram negativos; motiles; contenido de GC, 29-34 %.
Metanomicrobiaceae	Bacilos, espirilos, placas o cocos irregulares; utilizan H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> algunas formato o alcoholes como sustratos para metanogénesis; Gram negativos; motiles y no motiles; contenido de GC, 39-61 %.
Metanosarcinaceae	Pseudosarcina, cocos irregulares; utilizan H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> , acetato, compuestos metílicos como sustratos para metanogénesis, nunca formato; cocos que utilizan sólo H <sub>2</sub> o metanol; la mayoría son Gram positivos o negativos; frecuentemente no motiles; contenido de GC, 36-52 %.

Fuente: Dworkin *et al.* (2006).

Todas las arqueobacterias metanogénicas contienen dos coenzimas que no se encuentran en bacterias: factor 420 (F<sub>420</sub>) y la coenzima M (CoM; Weimer y Zeikus, 1978; Dwayne *et al.*, 1999; Krishnakumar *et al.*, 2008).

## 2.4.2 Factor 420

El  $F_{420}$  (Figura 1) es una coenzima metanogénica de bajo peso molecular que fluoresce sólo cuando se encuentra en estado oxidado y no muestra fluorescencia en su forma reducida (Mink y Dugan, 1976; Shima *et al.*, 2002).

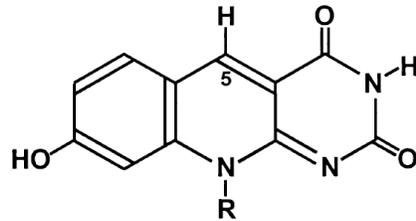


Figura 1. Estructura de la coenzima  $F_{420}$  (Fuente: Shima *et al.*, 2002).

Todas las arqueobacterias tienen coenzima  $F_{420}$ , que es un cofactor necesario para enzimas como hidrogenasa y formato deshidrogenasa; el nombre de esta coenzima es debido a su absorbancia de 420 nm, esto permite que las arqueobacterias florezcan a 470 nm (Hook *et al.*, 2010).

Cuatro formas diferentes de la coenzima  $F_{420}$  fueron descritas, todas ellas contienen un cromóforo llamado deaza-riboflavin con una cadena compuesta de dos a cinco residuos de ácido glutámico, la de dos residuos es la forma que se encuentra en las arqueobacterias metanogénicas hidrogenotrópicas, y las metilotrópicas contiene cadenas con residuos de cuatro y cinco ácidos glutámicos (Reynolds y Colleran, 1987).

## 2.4.3 Coenzima M

La CoM es el cofactor más pequeño conocido en la naturaleza (Figura 2). El cofactor es metilado con un grupo sulfidriilo para formar  $CH_3-S-CoM$ , que es el sustrato para la metil reductasa que cataliza el paso final en la vía metanogénica (Ferry, 2002).

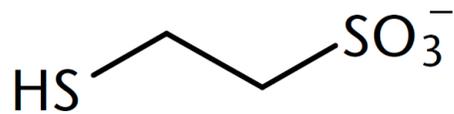


Figura 2. Estructura de la CoM (Ácido 2-mercaptoetanosulfónico; Ferry, 2002).

La CoM se encuentra en todas las arqueobacterias metanogénicas y está involucrada en los últimos pasos de la formación de CH<sub>4</sub>, acepta grupos metilo de la metilcobalamina para formar metilcoenzima M que es posteriormente desmetilado reductivamente, para formar CH<sub>4</sub>. Mientras que muchas arqueobacterias metanogénicas pueden sintetizar CoM, algunas otras como *M. ruminantium* la obtiene del fluido ruminal que la contiene y que a su vez es sintetizada por otras arqueobacterias metanogénicas (Krishnakumar *et al.*, 2008).

#### 2.4.4 Metanogénesis

El CH<sub>4</sub> se produce fundamentalmente por la descomposición anaerobia de la materia orgánica en los sistemas biológicos. Los procesos agrícolas como el cultivo de arroz inundado, la fermentación entérica en los animales y la descomposición de los desechos de éstos, y de los desechos municipales, emiten CH<sub>4</sub>. El CH<sub>4</sub> también es emitido durante la producción y distribución de gas natural y petróleo, y es liberado como subproducto en la extracción del carbón y en la combustión incompleta de los energéticos fósiles (Cuatecontzi y Gasca, 2004).

Las arqueobacterias metanogénicas obtienen la energía para su crecimiento de la conversión de un limitado número de sustratos para producir CH<sub>4</sub>, emplean generalmente H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, sin embargo, hay por lo menos diez sustratos que se convierten en CH<sub>4</sub> por la acción de una u otra arqueobacterias metanogénica, éstos incluyen formato, acetato, metanol, metilmercaptano, metilamina, dimetilsulfido y algunos alcoholes como isobutanos, ciclopentanol y etanol que

pueden ser utilizados pero por un menor grupo de arqueobacterias metanogénicas (Colombatto, 2007; Cuadro 6).

Cuadro 6. Reacciones para la producción de CH<sub>4</sub> utilizando diferentes sustratos.

Sustrato	Reacción
Monóxido de carbono	$4\text{CO}+5\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4+3\text{HCO}_3^-+3\text{H}^+$
Formato	$4\text{HCOO}^-+4\text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4+3\text{CO}_2+2\text{H}_2\text{O}$
Hidrógeno/CO <sub>2</sub>	$4\text{H}_2+\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CH}_4+3\text{H}_2\text{O}$
Etanol	$2\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}+\text{HCO}_3^- \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^-+\text{H}^++\text{CH}_4+\text{H}_2\text{O}$
Hidrógeno/metanol	$\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4+\text{H}_2\text{O}$
Metanol	$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4+\text{HCO}_3^-+\text{H}_2\text{O}+\text{H}^+$
Trimetilamina	$4\text{CH}_3\text{NH}^++9\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_3+3\text{HCO}_3^-+4\text{NH}_4+3\text{H}^+$
Dimetilsulfido	$2(\text{CH}_3)_2\text{S}+3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4+\text{HCO}_3^-+2\text{H}_2\text{S}+\text{H}^+$
Acetato	$\text{CH}_3\text{COO}^-+\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4+\text{HCO}_3^-$
Piruvato	$4\text{CH}_3\text{COCOOH}+2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 5\text{CH}_4+7\text{CO}_2$

Fuente: Sowers y Ferry (2002).

El CH<sub>4</sub> es producido por tres vías que varían en el compuesto de carbono utilizado como sustrato, así como la fuente del potencial reductor. La vía hidrogenotrófica es la más común, se encuentra en todos los órdenes de las arqueobacterias metanogénicas. Se trata de la reducción de CO<sub>2</sub> con H<sub>2</sub> como un donador de electrones, y está compuesta por siete pasos (Figura 3). El formato también se puede convertir a CH<sub>4</sub> a través de esta vía y actúa como una fuente de CO<sub>2</sub> (Baptiste *et al.*, 2005).

La metanogénesis inicia cuando el CO<sub>2</sub> es enlazado al metanofurano, primer acarreador de C<sub>1</sub>, y lo reduce a formilmetanofurano, esta reacción es catalizada por la enzima formilmetanofurano deshidrogenasa. El grupo metil del formilmetanofurano es transferido a tetrahidrometanopterin (H<sub>4</sub>MPT), segundo acarreador de C<sub>1</sub>, para generar formil H<sub>4</sub>MPT, dicha reacción es catalizada por la enzima formilmetanofurano formiltransferasa. El formil H<sub>4</sub>MPT es convertido a

$N^5, N^{10}$  metenil  $H_4MPT$  por la metenil  $H_4MPT$  ciclohidrolasa,  $N^5, N^{10}$  metenil  $H_4MPT$  es reducido por la metenil  $H_4MPT$  deshidrogenasa a  $N^5, N^{10}$  metilen  $H_4MPT$ . En el siguiente paso  $N^5, N^{10}$  metilen  $H_4MPT$  es reducida a  $N^5$  metil  $H_4MPT$  a expensas de  $F_{420}H_2$  por metilen  $H_4MPT$  reductasa. Posteriormente el grupo metil de  $N^5$  metil  $H_4MPT$  es transferido a la CoM para generar metil CoM, catalizado por CoM metiltransferasa, la CoM es el tercer acarreador de  $C_1$  en la metanogenesis. Finalmente metil CoM es reducido a  $CH_4$  por la metil CoM reductasa (Shima *et al.*, 2002).

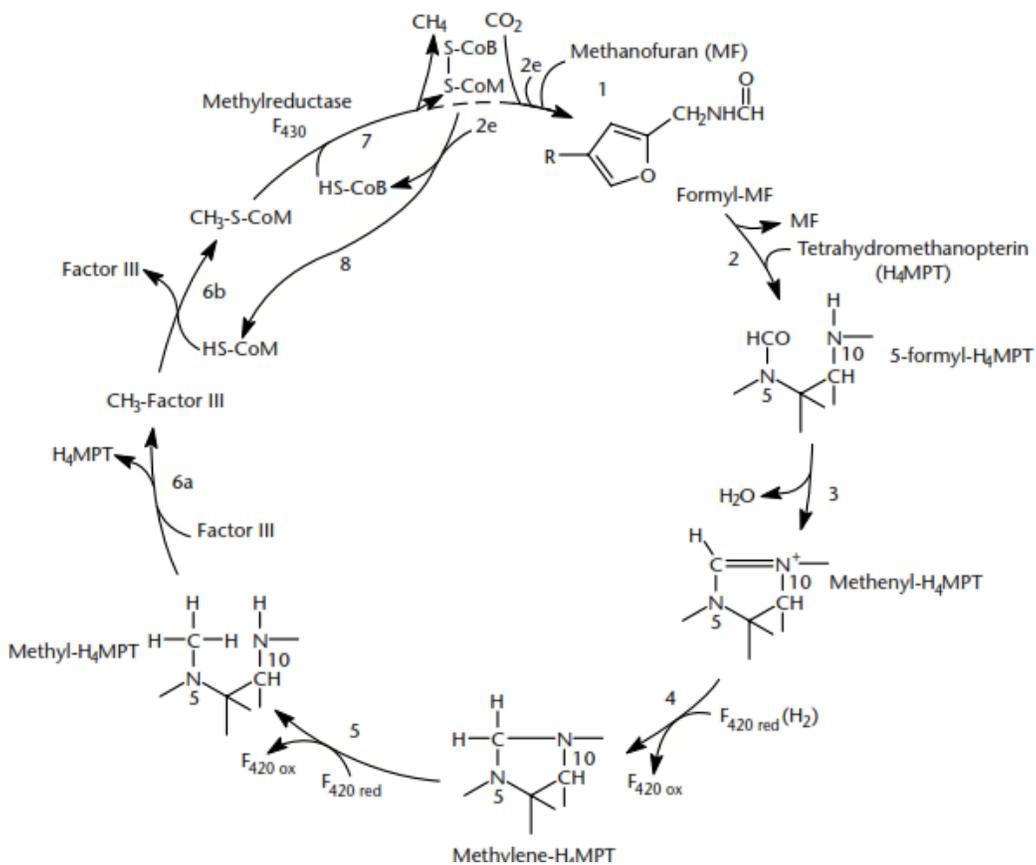


Figura 3. Metanogénesis (Ferry, 2002)

Las vías metabólicas para la producción de  $CH_4$ , sin tener en cuenta el sustrato utilizado, convergen a través de las actividades de una variedad de metiltransferasas a una reacción metabólica común en el que la CoM metilada (metil-CoM) se divide por la actividad reductora de metil-CoM reductasa (MCR)

dependiente del Ni para la formación de CH<sub>4</sub>. MCR, la principal enzima responsable de la producción microbiana de CH<sub>4</sub>, ya que cataliza la formación de heterodisulfide (Krishnakumar *et al.*, 2008).

## **2.5 Métodos de conservación de inóculos**

En laboratorios de microbiología es fundamental el mantenimiento y conservación de las colecciones de microorganismos con los que se trabajan. Hay métodos de mantenimiento y conservación de microorganismos cuya utilización va a depender del tiempo previsto y las características de los microorganismos. El mantenimiento *in vitro* de cultivos activos requiere una cantidad considerable de trabajo, y ocasiona inestabilidad genética de los aislados microbianos. Por esta razón, para la preservación de microorganismos se han desarrollado metodologías como la congelación de cultivos a -20 o -40 °C, la preservación en nitrógeno líquido a -196 °C (Arcos *et al.*, 2004) y la liofilización.

### **2.5.1 Congelación**

Los microorganismos pueden ser conservados para su posterior estudio o utilización a través de métodos como la congelación y liofilización. La congelación es un método físico-químico que permite conservar microorganismos viables sin sufrir cambios genotípicos. En este proceso se involucra el agua como microambiente y ella es la que cambia su estado de líquido a sólido; por otro lado la bacteria inmersa en este medio debe adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua le cause algún daño (Joo y Dupré, 2002).

Entre las adaptaciones de la célula bacteriana a los cambios ambientales están: la producción de enzimas resistentes al frío, sistemas de transporte a través de

membrana adaptadas a bajas temperaturas, aumento de la concentración de ácidos grasos en la misma cadena de fosfolípidos de la membrana celular, esta última para que continúe el estado semifluido de la membrana y evitar la congelación (Nedwell, 1999).

Sánchez y Corrales (2005) evaluaron la congelación como método de conservación bacteriana y concluyeron que la actividad bioquímica de la bacteria se afecta por el estrés térmico, pero que es un estado transitorio, cuando la causa de estrés es eliminada, los procesos moleculares son recuperados en su totalidad; sin embargo, el estrés producido por el procedimiento de congelación debe ser mitigado al momento de la descongelación y el medio que se provea a los microorganismos debe ser líquido para que facilite el intercambio molecular iónico y se restituya la actividad bioquímica de la membrana rápidamente.

### 2.5.2 Liofilización

La liofilización es un método utilizado para conservar microorganismos; sin embargo, algunas bacterias son sensibles a esta técnica porque los niveles de supervivencia disminuyen significativamente después de ser sometidas a este proceso, e incluso su mantenimiento prolongado hace que la viabilidad celular disminuya aún más. Tal es el caso de las especies del género *Mycobacterium* (Espinosa *et al.*, 2001).

Los factores que afectan la viabilidad de los microorganismos liofilizados, son: la naturaleza de la cepa, condiciones de cultivo, fase de crecimiento, concentración celular, formulación de los medios protectores contra la liofilización, variables de la liofilización y el modo de rehidratación (Espinosa *et al.*, 2001).

Para la liofilización se recomienda al glicerol como crioprotector, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, también es recomendable el uso de inositol para la mayoría de las bacterias, y la leche descremada para

los hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos como las bacterias lácticas pueden ser más convenientes otros crioprotectores, como el glutámico-glutamato, o mezclas de glucosa con caldo de hígado. No es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido (DMSO), porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar las células microbianas (García y Uruburu, 2000).

## **2.6 Uso de crioprotectores**

Los microorganismos pueden ser protegidos del proceso de congelación-deshielo con el uso de compuestos que son solubles, no tóxicos y capaces de penetrar en las células (crioprotectores), y actúan previniendo el aumento de las concentraciones de electrolitos y en consecuencia la menor muerte de microorganismos (Sánchez y Corrales, 2005).

### **2.6.1 Glicerol**

Compuestos como leche descremada, peptonas, glutamato de sodio y azúcares pueden utilizarse como crioprotectores (Sánchez y Corrales, 2005), aunque el que se utiliza más frecuentemente es el glicerol a concentraciones de 5 a 20 % (Cuadro 7). También pueden utilizarse DMSO y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa e inositol. La elección depende del tipo de microorganismos a conservar (García y Uruburu, 2000), por ejemplo Malik (1992) recomienda el uso de carbón activado para microorganismos sensibles al oxígeno.

Cuadro 7. Concentraciones usadas de glicerol en el proceso de conservación de diferentes organismos.

Bacteria	Concentración, %	Fuente
Arqueoacterias metanogénicas	10	Castro <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i>	20	Sung y Joung, 2007
<i>Legionella pneumophila</i>	20	Rodgers y Davey, 1982
<i>Aerobacter aerogenes</i>	10	Postgate y Hunter, 1961
Bacterias ácido-lácticas	15	Rault <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptococcus thermophilus</i>	5	Beal <i>et al.</i> , 2001.
<i>Bacillus licheniformis</i> SJ4628	20	Hancocks <i>et al.</i> , 2010

### 2.6.2 Tween 80

El tween 80 es un surfactante que evita el daño de los microorganismos durante la congelación, y no sólo porque protege a las bacterias durante la congelación, sino porque ayuda a reactivarlas en menor tiempo. Hancocks *et al.* (2010) evaluaron el efecto de dos concentraciones de glicerol (20 y 25 %), DMSO (15 %) y tween 80 (20 %) en la duración de la fase *lag*, observaron que el tiempo más corto de esta fase se dio al usar tween 80 debido a su contenido de ácido oleico que mejora la proporción de ácidos grasos insaturados en el citoplasma y membrana de las células que les permite resistir al daño durante la congelación. Diferentes concentraciones de tween 80 han sido usadas para la conservación de microorganismos como se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Uso del tween 80 como crioprotector de bacterias durante la congelación.

Bacteria	Concentración, %	Fuente
<i>Bacillus licheniformis</i> SJ4628	15	Hancocks <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus licheniformis</i> SJ4628	20	Hancocks <i>et al.</i> , 2010
<i>Escherichia coli</i>	1	Hubálek, 2003.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	Loiko <i>et al.</i> , 2008

### 2.6.3 Carbón activado

El carbón activado es conocido por su uso como adsorbente de drogas y otras sustancias tóxicas (pesticidas, agentes farmacéuticos, micotoxinas, fitotoxinas, y toxinas bacterianas) del tubo digestivo humano, aunque el uso más común es para la purificación de agua, Camper *et al.* (1986) evaluaron carbón activado como filtro para limpiar agua y observaron que las bacterias presentes en el agua quedaban atrapadas en éste, muchas de estas bacterias patógenas. Aunque en un estudio realizado por Knutson *et al.* (2005) en el que inoculan *E. coli* O157:H7 y *Salmonella typhimurium* en ovinos y luego los trataron con carbón activado, no encontraron efectos del carbón sobre la población de dichas bacterias, aunque *in vitro* si hay resultados positivos.

El carbón activado tiene diversos usos, uno de ellos y no tan estudiado es su uso como crioprotector debido a su alta porosidad permite ingresar a las bacterias que se albergan y protegen de las condiciones adversas del ambiente, Harbec y Turcotte (1996) preservaron *Neisseria gonorrhoeae* a -20 °C en medios que contenían 0.6 % de carbón activado y les dio buenos resultados al conservar esa cepa por un periodo de doce meses.

La adsorción bacteriana del carbón depende de factores físico-químicos como el tamaño de poro, pH y presencia de iones, tal como lo reportan Rivera-Utilla *et al.* (2001) quienes evaluaron el uso de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  que se adhieren al carbón por la diferencia de cargas y luego atraen a las bacterias, siendo más eficiente el  $\text{Fe}^{3+}$  con el que reportan una adsorción superior al 87 %. Egli *et al.* (1989) usaron el carbón activado para fijar un cultivo de arqueobacterias metanogénicas y reducir el daño a las mismas por condiciones ambientales.

## 2.7 Literatura citada

- Álvarez, J. A., L. Otero, J. M. Lema, and F. Omil. 2010. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresource Technology* 101: 8581-8586.
- Álvarez, R. and G. Lidén. 2008. The effect of temperature variation on biomethanation at high altitude. *Bioresource Technology* 99: 7278-7284.
- Angelidaki, I. and B. K. Ahring. 1993. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 560-564.
- Angelidaki, I., L. Ellegaard, and B. K. Ahring. 1997. Modelling anaerobic co-digestion of manure with olive oil mill effluent. *Water Science and Technology* 36: 263-269.
- Appels, L., J. Baeyens, J. Degréve, and R. Dewil. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 755-781.
- Arcos, M. L., F. Ossal, y T. E. Diaz. 2004. Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Revista CORPOICA* 5: 60-63.
- Bapteste, E., C. Brochier, and Y. Boucher. 2005. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* 1: 353-363.
- Barredo, M. S. and L. M. Evison. 1991. Effect of propionate toxicity on Methanogen-enriched sludge *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at different pH values. *Applied and Environmental Microbiology* 57(6): 1764-1769.
- Beal, C., F. Fonseca, and G. Corrieu. 2001. Resistance to freezing and frozen storage of *Streptococcus thermophiles* is related to membrane fatty acid composition. *Journal Dairy Science* 84: 2347-2356.
- Benabdallah, T. H., S. Astals, A. Galí, S. Mace, and J. Mata-Álvarez. 2009. Ammonia influence in anaerobic digestion of OFMSW. *Water Science and Technology* 59: 1153-1160.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Massé. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 319-326.

- Budiyono, I., N. Widiassa, S. Johari, and Sunarso. 2010. Increasing biogas production rate from cattle manure using rumen fluid as inoculums. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 10: 68-75.
- Camper, A. K., M. W. LeChevallier, S. C. Broadway, and G. A. McFeters. 1986. Bacteria Associated with granular activated carbon particles in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 52(3): 434-438.
- Castro, H., M. Queirolo, M. Quevedo, and L. Muxí. 2001. Preservation methods for the storage of anaerobic sludges. *Biotechnology Letters* 24: 329-333.
- Cepero, L., V. Savran, D. Blanco, M. R. Díaz, J. Suárez, and A. Palacios. 2012. Production of biogas and biofertilizers from biodigester effluents. *Pastos y Forrajes* 35: 216-226.
- Colombatto, D. 2007. Potencial de la monensina para reducir las emisiones de metano por parte de la ganadería. <http://www.produccion-animal.com.ar/sustentabilidad/61-monensina.pdf>, Consultada el 11 de mayo del 2011.
- Cuatecontzi, D. H. y J. Gasca. 2004. Los gases reguladores por la conversión marco de las naciones unidas sobre el cambio climático. *Cambio Climático una Visión desde México*. Compiladores: Julia Martínez y Adrián Fernández. SEMARNAT-INE.
- Dwayne, A. E., I. R. Krumholz, R. S. Tanner, and J. M. Suflita. 1999. Estimation of methanogen biomass by quantitation of Coenzyme M. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12): 5541-5545.
- Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, and E. Stackebrandt. 2006. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Archaea*. Third Edition, Springer Editorial 1081 pp.
- Egli, C., M. Thüer, D. Suter, A. M. Cook, and T. Leisinger. 1989. Monochoro- and dichloroacetic acids as carbon and energy sources for a stable, methanogenic mixed culture. *Archives of Microbiology* 153: 218-223.
- Espinosa, M., E., M. E. Carballo, T. Moreira, E. Martí, y A. Ramírez. 2001. Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores de esteroides conservadas por liofilización durante 10 años. *Biología Aplicada* 18: 85-87.
- Ferry, J. G. 2002. *Methanogenesis Biochemistry*. Encyclopedia of Life Sciences. Mcmillan Publishers.

- Flotats, X., E. Campos, J. Palatsi y A. Bonmatí. 2001. Digestión anaerobia de purines de cerdo y co-digestión con residuos de la industria alimentaria. *Monografías de Actualidad* 65: 51-65.
- Gallert, C. and J. Winter. 1997. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 405-410.
- García, L. M. D., y F. Uruburu F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad* 30: 6-12.
- Gerardi, H. M. 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. A John Wiley and Sons, Inc., Publication, pp 177.
- Gilroyed, H. B., T. Reuter, A. Chu, X. Hao, W. Xu, and T. McAllister. 2010. Anaerobic digestion of specified risk materials with cattle manure for biogas production. *Bioresource Technology* 101: 5780-5785.
- Hancocks, N. H., C. R. Thomas, S. M. Stocks, and C. J. Hewitt. 2010. An investigation into the preservation of microbial cell banks for  $\alpha$ -amylase production during 5 L fed-batch *Bacillus licheniformis* fermentations. *Biotechnology Letters* 32:1405-1412.
- Harbec, P. S. and P. Turcotte. 1996. Preservation of *Neisseria gonorrhoea* at -20 degrees C. *Journal of Clinical Microbiology* 34(5): 1143-1146.
- Hook, S. E., A. G. Wright, and W. McBride, 2010. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* 2010: 1-11.
- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205-229.
- Joo, R., y E. Dupré. 2002. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la motilidad espermática de la macha *Mesoderma donacium* (Mollusca, Bivalvia). *Investigaciones Marinas* 30: 75-79.
- Kayhanian, M. 1994. Performance of high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *Journal of Chemical and Biotechnology* 59: 349-352.
- Knutson, H. J., M. A. Carr, L. A. Branham, C. B. Scott, and T. R. Callaway. 2005. Effects of activated charcoal on blinding *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in sheep. *Small Ruminant Research* 65: 101-105.

- Krishnakumar, A. M., D. Sliwa, J. A. Endrizzi, E. S. Boyd, S. A. Ensing, and J. W. Peters. 2008. Getting a Handle on the Role of Coenzyme M in Alkene Metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72 (3): 445-456.
- Krylova, N. I., R. E. Khabiboulline, R. P. Naumova, and M. A. Nagel. 1997. The influence of ammonium and methods for removal during the anaerobic treatment of poultry manure. *Journal Chemical Technology and Biotechnology* 70: 99-105.
- Kumar, A., A. Kumar, R. Kumar, and J. S. Sudarsan. 2010. Biogas manure (BGM) from mixed kitchen waste: a trial study. *Journal of Environmental Research and Development* 5(1): 164-171.
- Kumar, R. D., C. W. Kant, S. A. Imteyaz, D. K. Vrat, and L. Singh. 2002. Effect of propionate toxicity on methanogenesis of night soil at psychrophilic temperature. *Boiresource Technology* 87: 299-303.
- Kumar, S., A. Kumar, M. Puniya, S. S: Dagar, S. Kumar, K. Singh, and G. Wyn. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *Journal Microbiology Biotechnology* 25: 1557-1566.
- Loiko, N. G., A. L. Mulyukin, A. N. Kozlova, A. P. Kaplun, V. V. Sorokin, I. A. Borzenkov, Y. A. Nikolaev, A. S. Kaprel, and G. I. El-Registran. 2008. Effect of, hexylresorcinol, a chemical analogue of bacterial anabiosis autoinducer on the stability of membrane structures. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45: 162-168.
- Luna-delRisco, M., A. Normak, and K. Orupold. 2011. Biochemical methane potential of different organic wastes and energy crops from Estonia. *Agronomy Research* 9: 331-342.
- Madigan, T. M., J. M. Martinko y J. Parker. 2009. *Biología de los microorganismos*. 12v<sup>a</sup> ed. Editorial. PEARSON Prentice Hall. Madrid, España. pp 1011.
- Malik, K. A. 1992. Liquid-drying of microorganisms using a simple apparatus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 80-82.
- Marchaim, U. 1992. Biogas processes for sustainable development. Roma FAO pp 51-88.
- Martínez–Carballo, E., C. González-Barreiro, S. Scharf, and O. Gans. 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Australia. *Environmental Pollution* 148: 570-579.

- Martins, N. L. C., A. Converti, and T. C. Vessoni. 2009. Biogas production: new trends for alternative energy sources in rural and urban zones. *Chemical Engineering and Technology* 32(8): 1147-1153.
- McAllister, T. A., E. K. Okine, G. W. Mathison, and K. J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science* 76: 231–243.
- Mink, R. W. and P. R. Dugan. 1976. Tentative identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 713-717.
- Nedwell, D. B. 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *Microbiology Ecology* 30: 101-111.
- Nielsen, H. B. and I. Angelidaki. 2008. Strategies for optimizing recovery of the biogas process following ammonia inhibition. *Bioresource Technology* 99: 7995-8001.
- Nomura, T., T. Nagao, A. Yoshihara, H. Tokomoto, and Y. Konishi. 2008. Selective immobilization of acetoclastic methanogens to support material. *Powder and Particle Journal* 26: 246-253.
- Osman, A. A. 2008. Degradation and metabolization of chlortetracycline during the anaerobic digestion of manure from medicated calves. *Journal of Hazardous Materials* 158: 485-490.
- Osorio, J., H. Ciro y H. González. 2007. Evaluación de un sistema de biodigestión en serie para clima frío. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 60: 4145-4162.
- Postgate, J. R. and J. R. Hunter. 1961. On the survival of frozen bacteria. *Journal Genetic Microbiology* 26: 367-378.
- Potivichayanon, S., T. Sungmon, W. Chaikongmao, and S. Kamvanin. 2011. Enhancement of biogas production from bakery waste by *Pseudomonas aeruginosa*. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 80: 529-532.
- Rault, A., C. Béal, S. Ghorbal, J. Ogier, and M. Bouix. 2007. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* 55: 35-43.

- Reynolds, P. J. and E. Colleran. 1987. Evaluation and improvement of methods for coenzyme F420 analysis in anaerobic sludge. *Journal of Microbiological Methods* 7: 115-130.
- Rivas, S. O., M. Faith, V. y R. Guillén, W. 2009. Biodigestores: factores químicos, físicos y biológicos relacionados con su productividad. *Tecnología en Marcha* 23: 39-46.
- Rivera-Utrilla, J., I. Bautista-Toledo, M. A. Ferro-García, and C. Moreno-Castilla. 2001. Activated carbon surface modifications by adsorption of bacteria and their effect on aqueous lead adsorption. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76: 1209-1215.
- Rodgers, G. F. and M. R. Davey. 1982. Ultrastructure of the cell envelope layers and surface details of *Legionella pneumophila*. *Journal of General Microbiology* 128: 1547-1557.
- Salsali, H. R., W. J. Parker, and S. A. Sattar. 2006. Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. By volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 279-286.
- Sánchez, L, L. C., y L. C. Corrales R. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Bulletin of the World Health Organization* 79: 43-47.
- Santosh, Y., T. R. Sreekrishnan, S. Koholi, and V. Rana. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques- a review. *Bioresource Technology* 95: 1-10.
- Sanz, J. L., N. Rodríguez, and R. Amils. 1996. The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46: 587-592.
- Sasaki, K., M. Morita, S. Hirano, N Ohmura, and Y. Igarashi. 2011. Decreasing ammonia inhibition in thermophilic methanogenic bioreactors using carbon fiber textiles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1555-1561.
- Shi, J. C., X. D. Liao, Y. B. Wu, and J. B. Liang. 2011. Effect of antibiotics on methane arising from anaerobic digestion of pig manure. *Animal Feed Science and Technology* 166: 457-463.
- Shima, S., E. Warkentin, R. K. Thauer, and U. Ermler. 2002. Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93(6): 519-530.

- Silva, L. W., V. Duarte, and S. Prasad. 2004. Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. *Bioresource Technology* 94: 261-266.
- Smith, S. R., N. L. Lang, k. H. M. Cheung, and K. Spanoudaki. 2005. Factors controlling pathogen destruction during anaerobic digestion of biowastes. *Water Management* 25: 417-425.
- Solero, R., L. I. Romero, and D. Sales. 2001. Analysis of the methane production in thermophilic anaerobic reactors: use of autofluorescence microscopy. *Biotechnology Letters* 23: 1889-1892.
- Sophin, P. and T. R. Preston. 2001. Effect of processing pig manure in a biodigester as fertilizer input for ponds growing fish in polyculture. *Livestock Research for Rural Development* 13(6) *in:* <http://www.lrrd.cipav.org.co/lrrd13/6/pich136.htm>. Consultada el 23 de septiembre del 2013.
- Sowers, K. R. and J. G. Ferry. 2002. Methanogenesis in the marine environment. *In The Encyclopedia of Environmental Microbiology*. G. Bitton.. New York: John Wiley and Sons, pp 1913-1923.
- Stams, J. m. A., D. Z. Sousa, R. Kleerebezem, and C. M. Plugge. 2012. Role of syntrophic microbial communities in high-rate methanogenic bioreactors. *Water Science and Technology* 66: 352-367.
- Sung, J. K. and H. J. Joung. 2007. Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the Antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653. *The Journal of Microbiology* 45: 510-514.
- Tekin, A. R. and A. D. Coskun. 2003. Biogas production from olives pomace. *Resource Conservation and Recycling* 30: 301-313.
- Thy, S., T. R. Preston, and J. Ly. 2003. Effect of retention time on gas production and fertilizer value of biodigester effluent. *Livestock Research for Rural Development* 15(7) *in:* <http://www.lrrd.org/lrrd15/7/sant157.htm>. Consultada el 26 de abril del 2013.
- Wahyudi, A., L. Hendraningsih, and A. Malik. 2010. Potency of fibrolytic bacteria isolated from Indonesian sheep's colon as inoculum for biogas and methane production. *African Journal of Biotechnology* 9(20): 2994-2999.

- Wang, Y., Y. Zhang, J. Wang, and L. Meng. 2009. Effects of volatile fatty acid concentrations on methane yield and methanogenic bacteria. *Biomass and Bioenergy* 33: 834-853.
- Weimer, P. J. and J. G. Zeikus. 1978. One metabolism in methanogenic bacteria. *Archives of Microbiology* 119: 49-57.
- Xiong, X., P. Ning, G. Qu, K. Huang, and C. Zhou. 2011. Study of mesophilic anaerobic digestion of cow manure. *Energy Procedia* 11: 3792-3798.
- Yuan, S., T. Rui, and Y. X. Hong. 2011. Research and analyses of solar heating biogas fermentation system. *Procedia Environmental Sciences* 11: 1386-1391.
- Yuan, Y., R. Conrad, and Y. Lu. 2009. Responses of methanogenic archaeal community to oxygen exposure in rice field soil. *Environmental Microbiology Reports* 1: 347-354.
- Zhou, M., T. A. McAllister, and L. L. Guan. 2011. Molecular identification of rumen methanogens: technologies, advances and prospects. *Animal Feed Science and Technology* 166: 76-86.



### 3. CAPÍTULO II. AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE UNA ARQUEOBACTERIA METANOGENICA

María Guadalupe Domínguez Ordóñez. Dra.

Colegio de Postgraduados, 2014

#### 3.1 Resumen

El objetivo de este experimento fue obtener una arqueobacteria metanogénica en cultivo puro, aislarla, caracterizarla morfológicamente y conservarla mediante liofilización. El experimento fue realizado de enero a septiembre del 2012 en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Colegio de Postgraduados. Para el aislamiento se utilizó un medio de cultivo selectivo a base de formato y fluido ruminal clarificado (FOR-FR), la arqueobacteria aislada se caracterizó morfológicamente y se conservó mediante liofilización. Para la conservación se evaluaron tres alternativas 1) la arqueobacteria en medio de cultivo FOR-FR (A), 2) arqueobacteria en medio de cultivo FOR-FR con carbón activado adicionado antes de la inoculación (AC) y 3) arqueobacteria en medio de cultivo FOR-FR con carbón activado adicionado al finalizar la incubación (A+C). Después de la liofilización se evaluó la viabilidad microbiana en el medio de cultivo FOR-FR y la producción de CH<sub>4</sub> el cual se captó en viales con solución salina y se midió en un cromatógrafo de gases. El medio de cultivo FOR-FR permitió aislar una arqueobacteria que genera colonias puntiformes en un periodo de tres a cuatro semanas. La liofilización con carbón activado adicionado antes de la inoculación fue el método adecuado para conservar dicha arqueobacteria porque mantuvo la viabilidad y actividad de los microorganismos aislados a partir de las 72 h de incubación.

**Palabras clave:** medio de cultivo selectivo, liofilización, carbón activado, morfología.

# ISOLATION AND PRESERVATION OF METHANOGENIC ARCHAEBACTERIA

María Guadalupe Domínguez Ordóñez. Dra.

Colegio de Postgraduados, 2014

## 3.2 Abstract

The objective of this trial was to obtain methanogenic archaeobacteria in pure culture, isolate them, describe their morphology and preserve them through lyophilization. The trial was conducted from January to September of 2012 in the Ruminant Microbiology and Microbial Genetics laboratory of Colegio de Posgraduados. A selective culture medium based on formate and clarified ruminal fluid (FOR-RF) was used for the isolation process. The isolated archaeobacteria were subjected to morphological characterization and were preserved through lyophilization. Three approaches were evaluated for the preservation 1) archaeobacteria in FOR-RF culture medium (A), 2) archaeobacteria in FOR-RF culture medium with activated carbon added before the inoculation (AC), 3) archaeobacteria in culture medium FOR-RF with activated carbon added at the end of the incubation (A+C). After lyophilization, microbial viability and CH<sub>4</sub> production were evaluated from culture medium FOR-RF, CH<sub>4</sub> was collected in vials containing saline and its concentration was measured using gas chromatography. Archaeobacteria developing a puntiform colony in a period ranging from three to four weeks were isolated from culture medium FOR-RF. Lyophilization with activated carbon added before inoculation was the appropriate method for the preservation of archaeobacteria because it maintained the viability and activity of the isolated microorganisms after 72 h of incubation.

**Key words:** selective culture medium, lyophilization, activated carbon, morphology

### 3.3 Introducción

Las arqueobacterias son un grupo distintivo de microorganismos con cofactores únicos (CoM y  $F_{420}$ ; Shima *et al.*, 2002). Las arqueobacterias metanogénicas son anaerobias estrictas por tanto crecen sólo en ambientes con un potencial de óxido-reducción menor a -300 mV (Kumar *et al.*, 2009). Sesenta y seis especies de arqueobacterias metanogénicas fueron aisladas de hábitats anaerobios como rellenos sanitarios, suelos inundados, lagos salados, pantanos y del tubo gastrointestinal de diferentes animales (McAllister *et al.*, 1996; Boadi *et al.*, 2004). Solamente *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanobrevibacter millerae*, y *Methanosarcina barkeri*, fueron aisladas del rumen y sólo *M. ruminantium* y *M. barkeri* están en poblaciones superiores a  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  (Zhou *et al.*, 2011).

Para obtener un cultivo puro de un microorganismo específico hay metodologías como la descrita por Fielding *et al.* (1987) en la cual se usan medios de cultivo selectivos y una serie de trasferencias para reducir la variedad de microorganismos presentes. Además se usa la técnica descrita por Hungate (1969) específica para microorganismos anaerobios.

Los medios de cultivo contienen diferentes nutrientes o factores de crecimiento que favorecen el desarrollo del microorganismo a aislar. Así, la hemina es una porfirina que forma un quelato complejo con el hierro III, y es necesaria para la formación de hemoproteínas en muchos microorganismos y hongos ruminales (Govea, 1998). Pero los medios de cultivo pueden tener compuestos, como los antibióticos, que limitan el desarrollo de otros microorganismos no deseables sin afectar al microorganismo objetivo del aislamiento (Shcherbakova *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2010).

Para conservar los microorganismos aislados existen diferentes métodos y la selección de un método depende, en parte, del tiempo previsto de conservación y método de congelación a usar, por ejemplo, preservación en nitrógeno líquido o liofilización (Arcos *et al.*, 2004). Por tanto, el objetivo de este experimento fue obtener, aislar, caracterizar y conservar una arqueobacteria metanogénica ruminal usando un medio de cultivo selectivo a base de formato y líquido ruminal.

### **3.4 Materiales y métodos**

#### 3.4.1 Aislamiento y conservación de la arqueobacteria

##### *Fuente del inóculo*

Para el aislamiento de la arqueobacteria metanogénica, se utilizó líquido ruminal de una vaca fistulada Holstein adulta de 600 kg, alimentada con paja de avena y concentrado (80:20). El líquido ruminal se extrajo a través de la cánula ruminal 2 h después de la alimentación matutina. El líquido ruminal se filtró a través de manta de cielo y se conservó a 39 °C en una incubadora Thermo Scientific® modelo Heratherm, hasta el momento de su uso.

##### *Aislamiento en medio de cultivo selectivo*

En el Cuadro 9 se presenta la composición del medio de cultivo anaerobio selectivo a base de formato y fluido ruminal clarificado (FOR-FR) usado para el aislamiento de la arqueobacteria metanogénica ruminal. El medio de cultivo se preparó con la metodología descrita por Cobos y Yokoyama (1995), se pusieron 9 mL en tubos de 18 x 150 mm y se incubaron a 39 °C por 48 h para comprobar esterilidad. Después se inocularon cinco tubos con 1 mL de líquido ruminal fresco en condiciones asépticas y bajo flujo de CO<sub>2</sub> y se incubaron 72 h a 39 °C.

De cada uno de los tubos de cultivo inoculados e incubados, 1 mL fue agregado en 9 mL de medio de cultivo fresco y se incubaron 72 h a 39 °C, al final de la

incubación se repitió el procedimiento anterior y estos últimos tubos se utilizaron para continuar el aislamiento en medios sólidos.

Cuadro 9. Composición del medio de cultivo selectivo usado para el aislamiento de una arqueobacteria metanogénica.

Componente	Por cada 100 mL
Agua destilada, mL	52.6
Líquido ruminal clarificado <sup>a</sup> , mL	30.0
Solución mineral I <sup>b</sup> , mL	5.0
Solución mineral II <sup>c</sup> , mL	5.0
Resazurina (solución al 0.1 %) <sup>d</sup> , mL	0.1
Trypticase-peptona, g	0.2
Extracto de levadura, g	0.1
Carbonato de Na (solución al 8 %) <sup>e</sup> , mL	5.0
Cisteína-sulfido <sup>f</sup> , mL	2.0
Formato de sodio, g	0.5
Antibiótico <sup>g</sup> , mL	1.0
Hemina <sup>h</sup> , mL	0.1

<sup>(a)</sup> El líquido ruminal fresco filtrado a través de manta de cielo fue centrifugado 10 min a 13 416 x g y esterilizado 15 min en autoclave a 121 °C.

<sup>(b)</sup> Contiene 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, por 1000 mL de agua destilada.

<sup>(c)</sup> Contiene 6 g KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>; 6g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO<sub>4</sub>; y 1.6 g CaCl-2H<sub>2</sub>O por 1000 mL de agua destilada.

<sup>(d)</sup> Disolver 100 mg de Resazurina en 100 mL de agua destilada. Esterilizar 15 min a 121°C y guardar en refrigeración.

<sup>(e)</sup> 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

<sup>(f)</sup> 2.5 g de L-cisteína (disuelta en NaOH 2N), 2.5 g de Na<sub>2</sub>S-9H<sub>2</sub>O. La mezcla es aforada a 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada y se agregar 0.1 mL de resazurina (solución al 0.1 % agua destilada).

<sup>(g)</sup> Cada mL contiene 250 mg de dihidroestreptomina y 20 mg de clorhidrato de procaina, además de vehículo.

<sup>(h)</sup> 0.010 g de hemina en 100 mL de NaOH al 0.005 N, se esteriliza 15 min a 121 °C.

El medio de cultivo sólido tuvo una composición similar a la descrita en el Cuadro 9, pero no se agregó el antibiótico y se adicionaron 2 g de agar por cada 100 mL de medio, se depositaron 9 mL del medio en viales de 18 x 150 mm, y se incubaron a 45 °C para evitar la solidificación del medio, luego se inocularon con 1 mL del medio de cultivo líquido en el que se realizó la última transferencia, después de la inoculación los tubos fueron rodados en agua fría para su solidificación (Hungate, 1969). Los tubos con el medio sólido se incubaron a 39 °C hasta la formación de colonias.

Con la finalidad de obtener un cultivo axénico, se seleccionaron las colonias que crecieron aisladamente en el medio sólido y se inocularon individualmente en medio líquido, se incubaron por 72 h a 39 °C y observaron en un microscopio de contraste Olympus modelo BX51 a una magnificación de 1000x para verificar pureza y con luz de una lámpara de Hg de un microscopio Microlux a 100x para observar su autofluorescencia.

La arqueobacteria se caracterizó mediante tinción Gram y observaciones microscópicas en un microscopio confocal Carl Zeiss, a una longitud de onda de excitación de 408 nm y un objetivo de 63x.

#### *Conservación de la bacteria*

El cultivo axénico de la arqueobacteria aislada fue liofilizado, y se evaluaron tres medios de cultivo para arqueobacterias: 1) la arqueobacteria en medio de cultivo FOR-FR (A), 2) arqueobacteria en medio de cultivo FOR-FR con carbón activado adicionado antes de la inoculación (AC) y 3) arqueobacteria en medio de cultivo FOR-FR con carbón activado adicionado al finalizar la incubación (A+C).

Quince viales de 50 mL con 24 mL de medio de cultivo fueron inoculados con 1 mL de la arqueobacteria crecida previamente a partir de una colonia, cinco de los quince viales contenían 0.4 % de carbón activado antes de la inoculación con 1 mL de la arqueobacteria crecida en medio FOR-FR. Los viales se incubaron 48

h a 39 °C. Al finalizar la incubación, se agregó 0.4 % de carbón activado en otros cinco viales y reposaron 2 h antes de ser congelados a -38 °C en un ultracongelador de rodillos Labconco, modelo Shell Freezer®. Después fueron colocados en una liofilizadora Labconco, modelo Freezone® de 6 L unida a una bomba de vacío Labconco, modelo 195®. El proceso de liofilización se llevó a cabo a -50 °C y -0.133 mBar de presión durante 24 h, al final los viales se sellaron con arillos de aluminio para almacenarse a temperatura ambiente hasta su uso.

La viabilidad de la arqueobacteria metanogénica liofilizada se evaluó con una prueba de producción de gas para lo cual se hidrataron 0.03 a 0.05 g de cada uno de los liofilizados en 25 mL de medio de cultivo FOR-FR y se incubaron 96 h a 39 °C. Al final de la incubación se cuantificó la producción de biogás, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, AGV, pH y potencial de óxido-reducción.

#### 3.4.2 Producción de biogás

Mangueras de Tygon® de aproximadamente 30 cm de largo y 0.25 mm de diámetro las cuales tenían en los extremos agujas fijadas con pegamento fueron conectadas a cada uno de los viales. En cada manguera se colocó una pinza para controlar el paso del biogás generado en el vial-biorreactor a través de la manguera.

Se utilizaron como trampas para capturar el biogás, viales serológicos llenos de solución salina ácida, que se preparó disolviendo 400 g de cloruro de sodio por litro de agua, después se agregaron 10 mL de anaranjado de metilo al 0.1 % por cada litro de solución y HCl 1 N, hasta que el pH fue inferior a 2. Finalmente los viales de 100 mL se llenaron y sellaron con arillos de aluminio.

La aguja del otro extremo de la manguera se introdujo en un vial con solución salina saturada la cual también tenía una aguja que le sirvió como válvula de

alivio. El vial con la solución salina se colocó de manera invertida sobre una probeta.

A las 24, 48, 72 y 96 h después de la inoculación se permitió el paso del biogás a través de la manguera y su ingreso al vial con solución salina, el biogás desplazó la solución salina a través de la válvula de alivio y se midió dicho volumen.

### 3.4.3 Determinación de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y AGV

De los viales donde se atrapo el biogás generado (viales con solución salina) se tomó una muestra de 30 µL de la fase gaseosa e inyectó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer, modelo Clarus 500. Se usó un detector de conductividad térmica (TCD), las temperaturas del horno, columna y TCD fueron de 80, 170 y 130°C respectivamente. El gas helio fue usado como gas acarreador. Los tiempos de retención fueron 0.73 y 1.05 min para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente.

Para la determinación de AGV se tomó 1 mL del medio FOR-FR inoculado con la arqueobacteria metanogénica e incubado por 96 h y se mezcló con 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % para obtener una proporción 4:1. Dicha mezcla se centrifugó a 20, 817 × g a 4°C por 10 min en una centrifuga Eppendorf modelo 5810R. El sobrenadante de los tubos fue depositado en viales para cromatografía y almacenado en congelación hasta su análisis. Los AGV se determinaron usando un cromatógrafo de gases PerkinElmer modelo Clarus 500 con automuestreador, se usó una columna capilar empacada Elite FFAP (PerkinElmer). Las temperaturas del horno, detector de ionización de flama (FID) e inyector fueron: 120, 250 y 250 °C respectivamente El gas nitrógeno fue usado como gas acarreador y el tiempo de retención fue 2.25, 2.75 y 3.25 min para el acetato, propionato y butirato respectivamente.

#### 3.4.4 Conteo de arqueobacterias metanogénicas

El conteo de arqueobacterias metanogénicas se realizó por epifluorescencia con ayuda de una cámara Petroff-Hausser (Halisser Scientific®) y un microscopio Olympus modelo BX51 a una magnificación de 1000X acoplado a una lámpara de mercurio. Para el conteo se utilizó 1 mL de cerdaza fermentada por 96 h mezclado con agua. Para calcular la concentración final se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Arqueobacterias metanogénicas, mL}^{-1} = (X) (FD) (2 \times 10^7)$$

Donde:

X = media de los conteos de arqueobacterias en los cuadros de la cámara Petroff-Hausser.

FD = factor de dilución usado.

$2 \times 10^7$  = factor de corrección equivalente a un volumen de 1 mL.

#### 3.4.5 Medición del potencial de óxido-reducción y pH

Se utilizaron 5 mL de la muestra de los biodigestores después de 96 h de incubación, para realizar la medición de pH se insertó el electrodo de un pHmetro Thermo Orion 720A+ directamente a la muestra y para la medición del potencial de óxido-reducción un electrodo REDOX conectado a un equipo Orion 710A.

### 3.4.6 Identificación molecular mediante el gen ADNr 16S

#### *Extracción de ADN*

La extracción de ADN de la arqueobacteria metanogénica aislada se realizó a partir de un cultivo de la bacteria en medio líquido incubado por 48 h, la concentración a ese tiempo fue de  $1 \times 10^8$  arqueobacterias  $\text{mL}^{-1}$ , las arqueobacterias se centrifugaron a  $9,391 \times g$  por 1.5 min en un vial Eppendorf de 2 mL, eliminando el sobrenadante y agregando nuevamente medio, estos pasos se repitieron hasta obtener un pellet de aproximadamente 0.1 g, las arqueobacterias fueron mezcladas con 30  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lisis (desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología de semillas del Colegio de Postgraduados) e incubadas a  $95^\circ\text{C}$  por 5 min; fueron centrifugadas a  $9,391 \times g$  por 2 min, el sobrenadante fue transferido a otro vial donde se cuantificó la concentración de ADN en el espectrofotómetro NanoDrop® (Modelo 2000c, Thermo, USA), el ADN se mantuvo a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### *Amplificación por PCR del gen ADNr 16S*

Se amplificó el gen ADNr 16S por medio la PCR utilizando 4 iniciadores universales 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 514F (5'-AGTAACAAGCAGAGGGCAAGTCTG-3'), 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') y 142R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

La PCR se realizó utilizando un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , conteniendo 0.3 unidades de la enzima *taq* DNA polimerasa (Invitrogen USA), 0.8 mM DNTP's, 100 ng de ADN, 20 pmol de cada iniciador, y 5  $\mu\text{L}$  de 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, USA). La amplificación se realizó en un termociclador Thermal Cycler DNA Engine® (BioRad, México), con un clico inicial de desnaturalización a  $95^\circ\text{C}$  por 2 min, seguida de 35 ciclos de: 2 min para

desnaturalización a 95°C, un alineamiento a 59°C por 1 min, y una extensión a 72°C por 1.5 min; y una extensión final a 72°C por 5 min. La verificación de la amplificación fue confirmada por medio de una electroforesis a 111 volts en gel de garosa al 1.5 % preparado con 1x TAE buffer (Tris Acetato-EDTA) durante una hora. Las bandas fueron observadas en un trasiluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX.

### *Secuenciación y análisis filogenético mediante el gen ADNr 16S*

La secuenciación del fragmento amplificado se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de Semillas del Colegio de Postgraduados, utilizando un equipo 3130 Genetic Analyzer.

Las secuencias generadas fueron ensambladas y editadas usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3.0, con el que se generó una secuencia consenso. La secuencia fue comparada con las secuencias registradas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 3.4.7 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron arqueobacterias liofilizada en medio: 1) FOR-FR, 2) FOR-FR con carbón activado adicionado antes de la inoculación y, 3) FOR-FR con carbón activado adicionado al finalizar la incubación; hubo cinco repeticiones por tratamiento.

Los datos del experimento se analizaron con el procedimiento GLM del SAS y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Para analizar los datos (presentados en sus unidades originales) de las arqueobacterias metanogénicas se hizo una transformación logarítmica usando la función  $\log(1)$  de SAS.

### 3.5 Resultados y discusión

#### 3.5.1 Características de la arqueobacteria metanogénica

El medio FOR-FR resulto efectivo para el aislamiento de una arqueobacteria metanogénica Gram(-) como se observa en la Figura 4.



Figura 4. Morfología y tinción de la arqueobacteria metanogénica aislada.

La arqueobacteria tiene forma de cocobacilos, los cuales en las primeras horas después de la inoculación se encuentran libres o formando cadenas cortas, y luego comienzan a generar cadenas más largas y ramificadas (Figura 5). La concentración microbiana en medio de cultivo fue de 5 a  $7 \times 10^8$  arqueobacterias  $\text{mL}^{-1}$ .

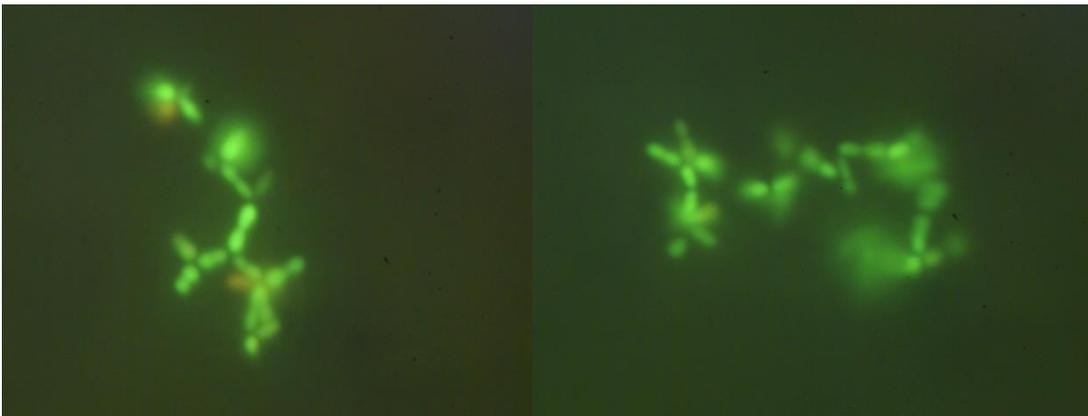


Figura 5. Fluorescencia y morfología de la arqueobacteria metanogénica observada en un microscopio Microlux a 100x.

La arqueobacteria generó colonias puntiformes ( $< 1$  mm) que crecieron en el medio con agar en un periodo de tres a cuatro semanas desde la inoculación, las colonias formadas fueron blancas lechosas, convexas y con borde liso. El desarrollo de las colonias fue menor al reportado por Kumar *et al.* (2011) al aislar arqueobacterias metanogénicas del rumen de búfalos, y se requirieron 90 d para observar colonias con un diámetro de 0.2 a 0.7 mm.

Las arqueobacterias metanogénicas se pueden distinguir fácilmente de las bacterias por la presencia de la coenzima  $F_{420}$  la cual florece sólo cuando se encuentra en estado oxidado y no muestra fluorescencia en su forma reducida (Shima *et al.*, 2002; Mink y Dugan, 1976). La arqueobacteria aislada mostró dicha fluorescencia cuando se observó en un microscopio de epifluorescencia Microlux con una lámpara INALH a una amplificación de 1000X (Figura 5).

Los cocobacilos midieron 1-1.5  $\mu\text{m}$  de largo y 0.58 a 0.60  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 6) lo cual se determinó usando un microscopio Confocal CarlZeiss LSM 700, con un láser de 405 nm, objetivo de 63x y con el programa Zen 2010.

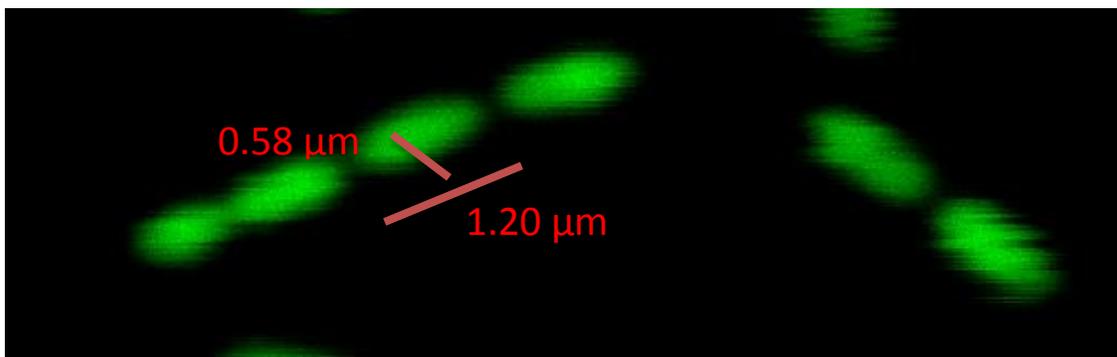


Figura 6. Dimensiones de la arqueobacteria metanogénica aislada, vista e un microscopio confocal usando un láser de 405 nm.

La arqueobacteria tiene un borde ligeramente redondeado que se une a la siguiente célula bacteriana para formar las cadenas (Figura 7).

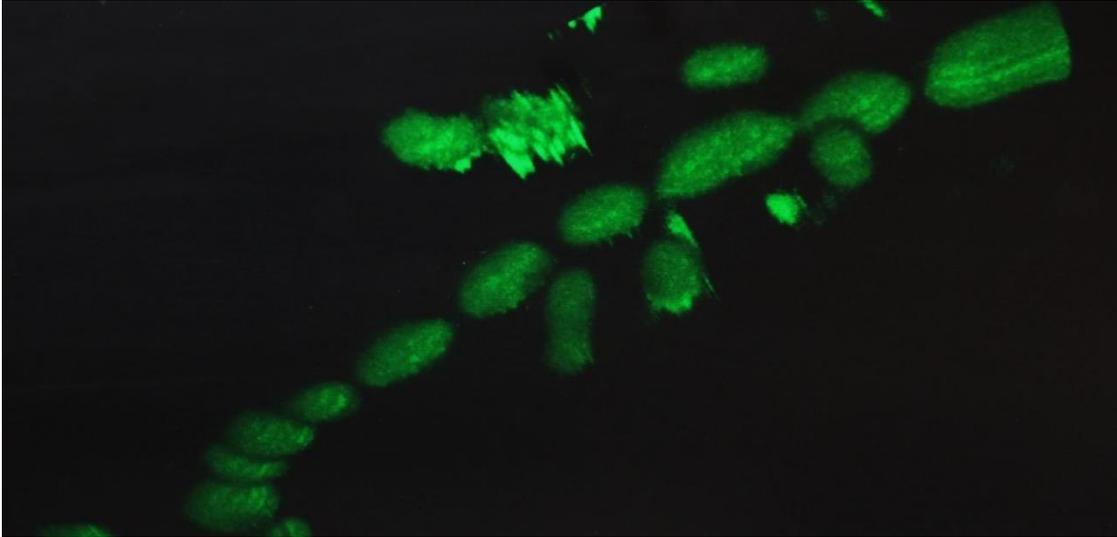


Figura 7. Imagen 3D de una arqueobacterias metanogénica aislada vista en un microscopio confocal usando un láser de 405 nm.

### 3.5.2 Identificación molecular

Para la identificación de microorganismos principalmente para aquellos de lento crecimiento, no cultivables o que tienen un fenotipo inusual, el gen ADNr 16S es particularmente importante (Woo *et al.*, 2008), porque la subunidad 16S de dicho gen contiene regiones altamente variables entre especies pero también tiene regiones conservadas a través del tiempo de una generación a otra en una misma especie (Clarridge, 2004). En este estudio se obtuvo una secuencia de 1258 pb del gen ADNr 16S (Figura 8) que se introdujeron en la base de datos del GenBank registrándose un 99 % de similitud con una bacteria no cultivada (KF699857.1) obtenida de un biodigestor anaerobio alimentado con desperdicios de comida. Sin embargo las características morfológicas, producción de CH<sub>4</sub> y emisión de fluorescencia no coinciden con el dominio en el cual se clasifica.

GCCCTATAGTTGGGAATACCTAAGGGAACTTTAGTTAATACCGAATAATGTTACGAGAGGCATCTC  
 TTGTGAAAGAAAGCGGCTTCTGCCGCGCTATTGGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAGGG  
 TAAAGGCCTACCAAGGCGAGGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAATGGGACTGAG  
 ACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAGTTTTCGGCAATGGGGGAAACCCTGACCG  
 AGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAGTAATGATTC  
 GAGAATGGAATGCTCGAAATTTGAAAGTACCTTACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC  
 CGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGTGAGCAGGCGGCCG  
 TTTAAGTCTGAAGTCAAATGCTGTGGCTTAACCACAGTTCGCTTTGGAAACTGGACGGCTAGAGTACG  
 AGAGAAGTAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGC  
 GAAGGCGGCTTACTAGATCGATACTGACGCTCAGTCACGAAAGCGTGGGTAGCAAATAGGATTAGAT  
 ACCCTAGTAGTCCACGCCGTAAACTATGAGAACTAGGTGTTTGGGATGACCAAGCGCCGAAGCTAAC  
 GCATTAAGTTCTCCGCTGGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGAGCCCG  
 CACAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGATACGCGAAGAACCCTACCAGGGCTTGACATACC  
 GATTAACAGTCTAGAGATAGATGAATATACGTCGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
 GTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTCCAACGAGCGCAACCCTTGCCTTAGTTACCATCATTAAAGTTGG  
 GGACTCTAAGGAGACCGCCGGTGTAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
 TATGTCCTGGGCGACACACGTGCTACAATGGTCGGAACAAAGAGCTGCTAACCCGCGAGGGTAAGCG  
 AATCTCAGAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATAGGAGTCTGCAACTCGACTCCTTGAAGCCGGAATTGCTA  
 GTAATCGCAGATCAGCCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTTGTACA¶

Figura 8. Secuencia de nucleótidos obtenidos del análisis de ADNr 16S de una arqueobacteria metanogénica aislada del rumen.

### 3.5.3 Efecto del carbón activado en la conservación de la arqueobacteria

La concentración microbiana antes de la liofilización fue similar ( $P > 0.5$ ) en los tratamientos en los cuales se les adicionó 0.4 % de carbón activado, esta concentración es menor (Cuadro 10) respecto al tratamiento sin carbón, indicando que las arqueobacterias se encuentran adheridas al carbón, y sólo algunas están en el medio líquido donde se recolectó la muestra para la cuantificación. Ciertos componentes del medio de cultivo pueden favorecer la adherencia de las arqueobacterias al carbón activado, según Rivera-Utilla *et al.* (2001) quienes evaluaron el uso de  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , los cuales se adhieren al carbón por la diferencia de cargas y luego atraen a las bacterias; el más eficiente fue el  $Fe^{3+}$  con una adsorción superior al 87 %.

Cuadro 10. Características de las arqueobacterias metanogénicas liofilizadas y activadas.

Característica	A+C	A	AC	EEM
Población inicial, $10^8 \text{ mL}^{-1}$	4.24 <sup>b</sup>	5.33 <sup>a</sup>	3.38 <sup>b</sup>	2.72
Población final, $10^8 \text{ mL}^{-1}$	-	-	4.56	-
pH final	7.07 <sup>b</sup>	7.07 <sup>b</sup>	8.38 <sup>a</sup>	0.09
Potencial de óxido-reducción final, mV	-95.68 <sup>a</sup>	-99.14 <sup>a</sup>	-177.70 <sup>b</sup>	2.87

A+C= Arqueobacteria más 0.4 % de carbón activado agregado después de la incubación.

A= Arqueobacteria sin carbón activado.

AC= Arqueobacterias más 0.4 % de carbón activado agregado previo a la inoculación.

Solamente las muestras inoculadas con arqueobacterias liofilizadas con carbón activado agregado antes de la inoculación tuvieron microorganismos viables ya que fueron las que generaron turbidez y produjeron  $\text{CH}_4$  en un período de 72 a 96 h, lo que indica que el carbón activado favorece la preservación de las arqueobacterias, microorganismos sensibles al oxígeno tal como lo reporta Malik (1992).

El pH inicial de los medios se ajustó a 7 y no se modificó en los medios que se inocularon con las arqueobacterias de los tratamientos A+C y A, en contraste con aquellos que fueron inoculados con la arqueobacteria AC en el que el pH se incrementó en 18 % sobrepasando el límite adecuado que va de 6 a 8 (Budiyono y Kusworo, 2012). Mientras que el potencial de óxido-reducción se incrementó en los tratamientos A+C y A y disminuyó AC (Cuadro 10), ya que inicialmente los medios tenían un potencial de óxido-reducción de -165 mV.

La concentración de AGV fue similar ( $P > 0.05$ ) en todos los tratamientos lo que indica que las arqueobacterias no interfieren en su producción. Los resultados también indican que la arqueobacteria metanogénica aislada es hidrogenotrófica, ya que no usa el acetato para producir  $\text{CH}_4$  (Cuadro 11).

Cuadro 11. Producción de AGV en medios inoculados con arqueobacterias metanogénicas liofilizadas.

Característica	A+C	A	AC	EEM
Acetato	28.48	28.89	28.82	1.07
Propionato	6.21	6.35	6.14	0.20
Butirato	3.83	3.85	3.68	0.10
AGV totales	38.54	39.10	35.65	1.38
Relación acetato: propionato	4.5:1	4.5:1	4.7:1	-

A+C= Arqueobacteria más 0.4 % de carbón activado agregado después de la incubación.

A= Arqueobacteria sin carbón activado.

AC= Arqueobacterias más 0.4 % de carbón activado agregado previo a la inoculación.

Las arqueas viables manifestaron actividad a partir de las 72 h, cuando iniciaron a producir CH<sub>4</sub>, sin embargo, su máxima actividad se observó hasta las 96 horas (Cuadro 12). La producción de CH<sub>4</sub> representó el 87 % del biogás y el resto fue CO<sub>2</sub>, no obstante hay que considerar que el gas usado para mantener las condiciones de anaerobiosis del medio fue CO<sub>2</sub> y que en su atmósfera tenían inicialmente dicho gas, que se mezcló con el CH<sub>4</sub> producido.

Cuadro 12. Biogás producido por una arqueobacteria metanogénica liofilizada con carbón activado después de 96 h de incubación.

Característica, 100 g Formato <sup>-1</sup>	AC
Biogás total, mL	1320
CH <sub>4</sub> , mL	1147.08
CO <sub>2</sub> , mL	172.92
CH <sub>4</sub> , mM	32.17
CO <sub>2</sub> , mM	4.77

AC= arqueobacteria liofilizada con carbón activado adicionado antes de la inoculación.

### 3.6 Conclusiones

El uso de medios selectivo a base de formato (FOR-LR) fue adecuado para aislar una arqueobacteria. La conservación de la arqueobacteria mediante liofilización es adecuada siempre y cuando se adicione carbón activado al medio de cultivo antes de inocular. Se recomienda un periodo de activación de la arqueobacteria liofilizada de 72 a 96 h. La identificación molecular no coincide con las características morfológicas y metabólicas de la arqueobacteria aislada.

### 3.7 Literatura citada

- Álvarez, J. A., L. Otero, J. M. Lema, and F. Omil. 2010. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresource Technology* 101: 8581-8586.
- Arcos, M. L., F. Ossal, y T. E. Diaz. 2004. Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Revista CORPOICA* 5: 60-63.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Massé. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 319-326.
- Budiyono, I. and T. D. Kusworo. 2012. Microalgae for stabilizing biogas production from cassava starch wastewater. *Journal of Waste Resources* 2: 17-21.
- Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 17(4): 840-862.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning, Proceedings of Workshop*. Wallace, R. J., and A. Lahlou-Kassi (eds.). Addis Abeba, Ethiopia. pp: 151-161.
- Fielding, E. R., D. B. Archer, E. M. Conway, and A. J. L. Macario. 1987. Isolation and characterization of methanogenic bacteria from landfills. *Applied and Environmental Microbiology* 3: 835-836.

- Govea, R. C. 1998. Efecto del azufre sobre la digestibilidad *in vitro* de celulosa por hongos ruminales de caprinos. Tesis de Maestría. Universidad de Colima. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 99 p.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *In: Methods in Microbiology*. Norris J. R. y D. W. Robins (Eds.), Academic Press. New York, USA. pp. 117-132.
- Kumar, S., A. K. Puniya, M. Puniya, S. D. Singh, S. S. Kumar, K. Singh, and G. G. Wyn. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *Journal Microbiology and Biotechnology* 25: 1557-1566.
- Kumar, S., S. S. Daga, and A. K. Puniya. 2011. Isolation and characterization of methanogens from rumen of Murrah buffalo. *Annals of Microbiology* 62(1): 345-350.
- Malik, K. A. 1992. Liquid-drying of microorganisms using a simple apparatus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 80-82.
- McAllister, T. A., E. K. Okine, G. W. Mathison, and K. J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal Animal Science* 76: 231-243.
- Mink, R. W., and P. R. Dugan. 1976. Tentative identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 33: 713-717.
- Rivera-Utrilla, J., I. Bautista-Toledo, M. A. Ferro-García, and C. Moreno-Castilla. 2001. Activated carbon surface modifications by adsorption of bacteria and their effect on aqueous lead adsorption. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76: 1209-1215.
- Shcherbakova, V. A., K. S. Laurinavichyu, A. M. Lysenko, N. E. Suzina, and V. K. Akimenko. 2003. Methanogenic sarcina from an anaerobic microbial community degrading *p*-toluene sulfonate. *Microbiology* 72: 547-553.
- Shima, S., E. Warkentin, R. K. Thauer, and U. Ermler. 2002. Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93(6): 519-530.
- Woo, P. C. Y., S.K. P. Lau, J. L. L. Teng, H. Tse, and K. Y. Yuen. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 14(10): 908-934.

Zhou, M., T. A. McAllister, and L. L. Guan. 2011. Molecular identification of rumen methanogens: technologies, advances and prospects. *Animal Feed Science and Technology* 166: 76-86.



## 4. CAPÍTULO III. INOCULACIÓN DE BIODIGESTORES DE CERDAZA CON ARQUEOBACTERIAS METANOGÉNICAS

María Guadalupe Domínguez Ordóñez. Dra.

Colegio de Postgraduados, 2014

### 4.1 Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* la cantidad de CH<sub>4</sub> generado en biodigestores de cerdaza inoculados con líquido ruminal o arqueobacterias metanogénicas. La fermentación de la cerdaza se realizó a 39 °C por 72 h. El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron: 1) testigo (T) = 2 g de cerdaza, 2) líquido ruminal (LR) = 2 g de cerdaza inoculada con 2.5 mL de líquido ruminal, 3) AML (arqueobacteria metanogénica liofilizada) = 2 g de cerdaza inoculada con 0.05 g de arqueobacteria metanogénica liofilizada y 4) AM (arqueobacteria metanogénica) = 2 g de cerdaza inoculada con 5 mL de arqueobacteria metanogénicas activada. La cerdaza fue ajustada a 5 % MS y las muestras fueron incubadas a 39°C por 72 h. La cantidad de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y biogás total se midió a 24, 48 y 72 h desde la inoculación. Después de 72 h se cuantificó la población de bacterias totales, celulolíticas, arqueobacterias, AGV, pH y potencial de óxido-reducción. La producción de biogás total a 24 y 48 h fue mayor ( $P < 0.05$ ) en los tratamientos LR y AM. A 72 h no se observaron diferencias entre los tratamientos y la producción de biogás se redujo en todos los tratamientos. La producción de CH<sub>4</sub> fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento AM. El tratamiento AM de 24 a 48 h redujo la producción de CH<sub>4</sub> en 57 %, mientras que LR y AML lo incrementaron. La población de arqueobacterias y bacterias totales fue superior en los biodigestores LR y AM. El uso de los inóculos evaluados tiene un efecto positivo en la producción de CH<sub>4</sub> en biodigestores de cerdaza.

**Palabras claves:** biogás, población bacteriana, AGV, fermentación *in vitro*.

# INOCULATION OF SWINE MANURE DIGESTERS WITH METHANOGENIC ARCHAEBACTERIA

María Guadalupe Domínguez Ordóñez. Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2014

## 4.2 Abstract

The objective of this study was to evaluate the amount of CH<sub>4</sub> generated in swine manure digesters *in vitro* inoculated with ruminal fluid or methanogenic archaeobacteria. The fermentation of swine manure was conducted at 39°C for 72 h in a complete randomized experimental design, treatments were: 1) control (C) = 2 g of swine manure, 2) ruminal fluid (RF) = 2 g of swine manure inoculated with 2.5 mL of ruminal fluid, 3) lyophilized methanogenic archaeobacteria (LMA) = 2 g of swine manure inoculated with 0.05 g of lyophilized methanogenic archaeobacteria, 4) methanogenic archaeobacteria (MA) = 2 g of swine manure inoculated with 5 mL of activated methanogenic archaeobacteria. Swine manure utilized was adjusted to 5% DM and samples were incubated at 39°C for 72 h. The amount of CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and total biogas was measured at 24, 48 and 72 h of incubation. After 72 h of incubation, total bacterial population, cellulolytic bacteria, archaeobacteria, VFA, pH and oxidation-reduction potential were measured. Total biogas production at 24 and 48 h was greatest ( $P < 0.05$ ) in treatment RF and MA. At 72 h, biogas production decreased and no difference was observed among treatments. CH<sub>4</sub> production was greatest ( $P < 0.05$ ) in treatment MA. From 24 to 48 h, CH<sub>4</sub> production in treatment MA decreased to 57 %; however, it increased in treatments RF and LMA. The populations of archaeobacteria and total bacteria were greater ( $P < 0.05$ ) in digesters RF and MA. Inocula evaluated in this trial had a positive effect on the production of CH<sub>4</sub> in pig manure digesters.

**Key words:** biogas, bacterial population, VFA, *in vitro* fermentation

### 4.3 Introducción

Durante el proceso de fermentación anaerobia se pueden obtener dos productos, el biogás y un fertilizante libre de patógenos, incluso tratándose de materiales riesgosos para la salud pública (Gilroyed *et al.*, 2010). La composición del biogás depende de la naturaleza de la materia orgánica fermentada, y la producción puede variar entre 40 a 70 % para el CH<sub>4</sub>, de 35 a 45 % para el CO<sub>2</sub>, de 0.5 a 7 % para el N<sub>2</sub>, y de 5 a 10 % para el H<sub>2</sub>, con trazas de H<sub>2</sub>S y O<sub>2</sub> (Martins *et al.*, 2009; Cepero *et al.*, 2012). Para incrementar la producción de biogás hay diferentes métodos como el uso de aditivos, inóculos, y cambios en variables operacionales como la temperatura, el tiempo de retención y el tamaño de partícula del sustrato (Martins *et al.*, 2009).

El uso de líquido ruminal como inóculo mejora la producción de biogás, además reduce el tiempo de estabilización del mismo, efectos reportados por Silva *et al.* (2004) al evaluar la adición de diferentes concentraciones de líquido ruminal a un biodigestor de residuos sólidos municipales. Los autores redujeron 23 % los sólidos volátiles totales e incrementaron 39 % la producción de CH<sub>4</sub> usando 15 % de inóculo, lo cual atribuyen a la alta población de bacterias en el líquido ruminal. Concentraciones inferiores al 10 % no afectan la producción de CH<sub>4</sub> y disminución de sólidos volátiles totales.

La actividad de las arqueobacterias normalmente es calculada por comparación entre el sustrato consumido y la cantidad de CH<sub>4</sub> producido durante el proceso de fermentación; lo cual no siempre es cierto según Solero *et al.* (2001), quienes relacionaron la producción de CH<sub>4</sub> con la biomasa y con la población de arqueobacterias usando la fluorescencia; ellos concluyen que la producción de CH<sub>4</sub> tiene una relación logarítmica con la cantidad de arqueobacterias presentes en el sistema, pero no hay correlación para la producción de CH<sub>4</sub> asociada a la biomasa. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la cantidad de CH<sub>4</sub> generado en biodigestores de cerdaza inoculados con líquido ruminal o

arqueobacterias metanogénica crecidas en medio de cultivo selectivo, y liofilizadas con carbón activado.

#### **4.4 Materiales y métodos**

##### 4.4.1 Fuente de inóculo

Los inóculos evaluados fueron: 1) líquido ruminal obtenido de una vaca Holstein adulta, alimentada con paja de avena y concentrado; 2) un cultivo puro de arqueobacterias metanogénicas liofilizadas con 0.4 % de carbón activado y; 3) la arqueobacteria metanogénica liofilizada, pero activada por 72 h en medio FOR-FR. El líquido ruminal se extrajo directamente a través de la cánula 2 h después de la alimentación matutina, se filtró a través de manta de cielo y conservó a 39 °C hasta el momento de su uso.

##### 4.4.2 Producción de biogás

En viales serológicos se depositaron 2 g de excreta de cerdo y ajustaron a 5 % de materia seca, se taparon y sellaron herméticamente para evitar la pérdida del biogás producido durante la fermentación. Estos viales fueron colocados en un baño María a 39°C. Los tratamientos fueron: 1) testigo (T) = 2 g de excretas, 2) líquido ruminal (LR) = 2 g de cerdaza más 2.5 mL de líquido ruminal para tener una población final de  $1 \times 10^7$  bacterias por mL de cerdaza, 3) arqueobacteria metanogénica liofilizada (AML)= 2 g de cerdaza más 0.05 g de la arqueobacteria aislada y liofilizada con carbón activado y; 4) arqueobacteria metanogénica activa (AM) = 2 g de cerdaza más 5 mL de un cultivo puro de la arqueobacteria liofilizada activada por 72 h en medio selectivo. Todos los inóculos se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^7$  bacterias por mL de cerdaza. Todos los tratamientos se ajustaron a 5 % de MS en un volumen final de 40 mL y se usaron seis repeticiones por cada tratamiento. Además se usaron dos viales que

sólo contenían agua para ajustar los datos por desplazamiento debido a la presión del vapor de agua.

Mangueras de Tygon® de aproximadamente 30 cm de largo y 0.25 mm de diámetro las cuales tenían en los extremos agujas fijadas con pegamento, fueron conectadas a cada uno de los viales. En cada manguera se colocó una pinza para controlar el paso del biogás generado en el vial-biorreactor a través de la manguera.

Viales serológicos llenos de solución salina ácida fueron utilizados como trampas para la captación del biogás, la solución salina se preparó diluyendo 400 g de cloruro de sodio en un litro de agua, después se agregaron 10 mL de anaranjado de metilo al 0.1 % y se ajustó el pH a 2. Finalmente los viales de 100 mL se llenaron y sellaron con arillos de aluminio.

La aguja del otro extremo de la manguera se introdujo en un vial con solución salina que tenía una aguja que sirvió como válvula de alivio. El vial con la solución salina se colocó de manera invertida sobre una probeta de 50 mL, que se usó para medir el volumen de solución salina desplazada por el biogás producido en los biodigestores de cada tratamiento (Figura 9).

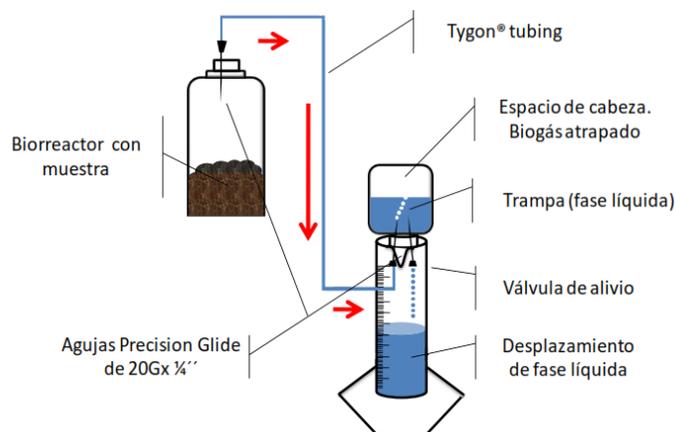


Figura 9. Sistema de captación de biogás (Ramírez, 2010)

A las 24, 48 y 72 h de incubación se retiró la pinza y liberó el biogás a través de la manguera, lo que permitió su ingreso al vial con solución salina. La presión del biogás en la trampa de solución salina, provocó el desplazamiento de la solución salina a través de la válvula de alivio que cayó en la probeta donde se midió. También se cambiaron los viales donde quedaba atrapado el biogás para la determinación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a 24, 48 y 72 h de incubación.

#### 4.4.3 Determinación de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y AGV

De los viales donde se atrapo el biogás se tomó una muestra de 30 µL y se inyectó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer, modelo Clarus 500. Se usó un detector de conductividad térmica (TCD), las temperaturas del horno, columna y TCD fueron de 80, 170 y 130°C respectivamente. El gas helio fue usado como gas acarreador. Los tiempos de retención fueron 0.73 y 1.05 min para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente.

Para la determinación de AGV se tomó 1 mL de la cerdaza fermentada durante 72 h y se mezcló con 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % (proporción 4:1). Dicha mezcla se centrifugó en una centrifuga Eppendorf modelo 5810R a 20, 817 x g a 4°C por 10 min. El sobrenadante de los tubos fue depositado en viales para cromatografía y se almacenaron en congelación hasta su análisis. Los AGV se determinaron usando un cromatógrafo de gases PerkinElmer modelo Clarus 500 con automuestreador, se usó una columna capilar empacada Elite FFAP (PerkinElmer). Las temperaturas del horno, detector de ionización de flama (FID) e inyector fueron: 120, 250 y 250 °C respectivamente. El gas nitrógeno fue usado como gas acarreador. El tiempo de retención fue 2.25, 2.75 y 3.25 min para el acetato, propionato y butirato, respectivamente.

#### 4.4.4 Conteo de bacterias totales, metanogénicas y celulolíticas

El conteo de bacterias totales se realizó de manera directa en una cámara Petroff-Hausser (Halisser Scientific®) y usando un microscopio Olympus modelo BX51 a una magnificación de 1000X. Para el conteo se utilizó 1 mL de cerdaza fermentada por 72 h mezclado con formaldehído al 10 %. Para calcular la concentración final se usó la siguiente formula:

$$\text{Bacterias totales, mL}^{-1} = (X) (\text{FD}) (2 \times 10^7)$$

Donde:

X = media de los conteos de bacterias en los cuadros de la cámara Petroff-Hausser.

FD = factor de dilución usado.

$2 \times 10^7$  = factor de corrección a un volumen de 1 mL.

Las arqueobacterias metanogénicas fueron contadas de manera similar a las bacterias totales con la diferencia que éstas sólo se mezclaron con agua. Para realizar el conteo se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus modelo BX51 la fuente de poder fue una lámpara de mercurio de 100 W.

La concentración de bacterias celulolíticas se determinó por el método del NMP (Harrigan y McCance, 1979). La prueba se realizó con diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ , en tubos de 13 x 100 mm que contenían 4.5 mL de medio de cultivo (Cuadro 13) y una tira de papel Whatman de 2.5 x 0.3 cm, los tubos con la mayor dilución se inocularon directamente con 0.5 mL de cerdaza biofermentada y a partir de esos se realizaron las otras diluciones y se incubaron a 39 °C por 10 días.

#### 4.4.5 Medición del potencial de óxido-reducción y pH

Se utilizaron 5 mL de la muestra de los biodigestores después de 72 h de fermentación para realizar la determinación de pH en un pHmetro Thermo Orion 720A+. Para la medición del potencial de óxido-reducción se usó el electrodo REDOX y un pH metro Orion modelo 710A.

Cuadro 13. Composición del medio de cultivo para conteo de bacterias celulolíticas.

Componente	Por cada 100 mL
Agua destilada, mL	52.6
Líquido ruminal clarificado <sup>a</sup> , mL	30.0
Solución mineral I <sup>b</sup> , mL	5.0
Solución mineral II <sup>c</sup> , mL	5.0
Resazurina (solución al 0.1 %) <sup>d</sup> , mL	0.1
Trypticase-peptona, g	0.2
Extracto de levadura, g	0.1
Carbonato de Na (solución al 8 %) <sup>e</sup> , mL	5.0
Cisteína-sulfido <sup>f</sup> , mL	2.0

<sup>(a)</sup> El líquido ruminal fresco previamente filtrado a través de manta de cielo y centrifugado a 13 416 x g por 10 minutos, a 4°C y esterilizado 15 min en autoclave a 121°C.

<sup>(b)</sup> Contiene 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, por 1000 mL de agua destilada.

<sup>(c)</sup> Contiene 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO<sub>4</sub>; y 1.6 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O por 1000 mL de agua destilada.

<sup>(d)</sup> Disolver 100 mg de Resazurina en 100 mL de agua destilada. Esterilizar 15 min a 121°C y guardar en refrigeración.

<sup>(e)</sup> 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

<sup>(f)</sup> 2.5 g de L-cisteína (disuelta en NaOH 2N), 2.5 g de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O. La mezcla es aforada a 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada y agregar 0.1 mL resazurina (solución al 0.1 % agua destilada).

#### 4.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron: T = 2 g de excretas; LR = 2 g de cerdaza más 2.5 mL de líquido ruminal, AML = 2 g

de cerdaza además de 0.05 g de la arqueobacteria aislada y liofilizada con carbón activado y; AM = 2 g de cerdaza más 5 mL de un cultivo de la arqueobacteria activada; y hubo seis repeticiones por tratamiento. Los inóculos se usaron a una concentración  $1 \times 10^7$  bacterias por mL de cerdaza.

Los datos del experimento fueron analizados con el procedimiento GLM de SAS y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Los datos para las bacterias totales y arqueobacterias metanogénicas se transformaron logarítmicamente usando la función  $\log(1)$  de SAS.

## 4.5 Resultados y discusión

### 4.5.1 Producción de biogás, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en biodigestores de cerdaza

La producción de biogás a las 24 h de fermentación fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento AM seguida de LR. El biogás producido en T fue 100 % CO<sub>2</sub>, mientras que, para LR, AML y AM el CH<sub>4</sub> representó 9.4, 9.7 y 22.6 %, del biogás producido. Para las 48 horas de fermentación la mayor producción de biogás se generó en LR y AML seguida de AM aunque la cantidad de CH<sub>4</sub> fue superior ( $P < 0.05$ ) en AM el cual represento casi el 50 % del biogás total; mientras que, para T, AML y LR representó el 0, 27 y 32.8 %, respectivamente. Después de 72 h de fermentación la producción de biogás fue similar ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos y el único tratamiento donde se produjo CH<sub>4</sub> fue LR el cual represento el 17.5 % (Cuadro 14).

La producción acumulada de biogás, CH<sub>4</sub>, y CO<sub>2</sub> fue mayor en AM a pesar de que la producción de CH<sub>4</sub> se detuvo a las 48 h, LR siguió en la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, a diferencia del AM éste es el único tratamiento que produjo CH<sub>4</sub> hasta 72 h.

Cuadro 14. Producción de biogás, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a 24, 48 y 72 h de fermentación por cada 100 g de cerdaza, con diferentes inóculos.

	T	LR	AML	AM	EEM
24 h					
Biogás, mL100 gMS <sup>-1</sup>	432.6 <sup>c</sup>	513.91 <sup>b</sup>	442.73 <sup>c</sup>	961.04 <sup>a</sup>	44.28
Biogás, mM100 gMS <sup>-1</sup>	12.11 <sup>c</sup>	14.38 <sup>b</sup>	13.41 <sup>c</sup>	26.90 <sup>a</sup>	1.14
CH <sub>4</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	0.0 <sup>c</sup>	1.36 <sup>b</sup>	1.30 <sup>b</sup>	6.10 <sup>a</sup>	0.8802
CO <sub>2</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	12.11 <sup>b</sup>	13.02 <sup>b</sup>	12.11 <sup>b</sup>	20.79 <sup>a</sup>	1.59
48 h					
Biogás, mL100 gMS <sup>-1</sup>	137.4 <sup>c</sup>	398.49 <sup>a</sup>	305.14 <sup>ab</sup>	255.75 <sup>b</sup>	42.75
Biogás, mM100 gMS <sup>-1</sup>	3.84 <sup>d</sup>	11.15 <sup>a</sup>	8.54 <sup>b</sup>	7.15 <sup>c</sup>	1.17
CH <sub>4</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	0.0 <sup>c</sup>	3.65 <sup>a</sup>	2.30 <sup>b</sup>	3.52 <sup>a</sup>	0.78
CO <sub>2</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	3.84 <sup>b</sup>	7.49 <sup>a</sup>	6.23 <sup>a</sup>	3.63 <sup>b</sup>	1.39
72 h					
Biogás, mL100 gMS <sup>-1</sup>	101.54	113.31	127.78	98.89	46.86
Biogás, mM100 gMS <sup>-1</sup>	2.84	3.17	3.57	2.76	1.00
CH <sub>4</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.55 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.31
CO <sub>2</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	2.84	2.61	3.57	2.76	1.23
Biogás acumulado, mL100 gMS <sup>-1</sup>	671.0 <sup>d</sup>	1025.7 <sup>b</sup>	875.6 <sup>c</sup>	1315.6 <sup>a</sup>	1.04
Biogás acumulado, mM100 gMS <sup>-1</sup>	18.79 <sup>d</sup>	28.71 <sup>b</sup>	25.53 <sup>c</sup>	36.82 <sup>a</sup>	1.52
CH <sub>4</sub> acumulado generado por 100 g MS					
24, h	0.0 <sup>c</sup>	1.36 <sup>b</sup>	1.30 <sup>b</sup>	6.10 <sup>a</sup>	0.88
48, h	0.0 <sup>d</sup>	5.02 <sup>b</sup>	3.61 <sup>c</sup>	9.62 <sup>a</sup>	1.12
72, h	0.0 <sup>d</sup>	5.57 <sup>b</sup>	3.61 <sup>c</sup>	9.62 <sup>a</sup>	1.12
CO <sub>2</sub> acumulado generado por 100 g MS					
24, h	12.11 <sup>b</sup>	13.02 <sup>b</sup>	12.11 <sup>b</sup>	20.79 <sup>a</sup>	1.59
48, h	15.95 <sup>b</sup>	20.51 <sup>b</sup>	18.34 <sup>b</sup>	24.43 <sup>a</sup>	1.55
72, h	18.79 <sup>c</sup>	23.13 <sup>b</sup>	21.92 <sup>b</sup>	27.19 <sup>a</sup>	1.52

<sup>a b c</sup>Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

T, testigo; LR, líquido ruminal; AML, arqueobacteria metanogénica liofilizada; AM, arqueobacteria metanogénica.

El incremento en la producción de CH<sub>4</sub> durante las primeras 48 h en AM y LR probablemente se debió a la presencia de una mayor población de arqueobacterias metanogénicas y bacterias totales. T tuvo la menor población de bacterias totales y arqueobacterias metanogénicas; se estima que la menor concentración de microorganismos se debió a la presencia de antibióticos en la cerdaza ya que ésta provenía de animales que iniciaban la engorda y dentro de las prácticas de rutina esta la desparasitación. Entre el 17 y 76 % de los antibióticos suministrados se excretan en la orina o heces (Shi *et al.*, 2011) y pueden afectar negativamente la producción de CH<sub>4</sub>; como lo concluyeron Álvarez *et al.* (2010) al evaluar el efecto en la producción de CH<sub>4</sub> en biodigestores que contenían oxitetraciclina y clortetraciclina, estos autores reportan una disminución superior al 50 % con relación al biodigestor sin presencia de estos antibióticos. En otro estudio, Sanz *et al.* (1996) concluyeron que algunos antibióticos, por ejemplo el cloramfenicol puede inhibir directamente a las arqueobacterias, lo que podría explicar que T no haya presentado producción de CH<sub>4</sub>.

Los datos obtenidos muestran una fuerte influencia de los dos inóculos usados (líquido ruminal y arqueobacteria metanogénica) sobre la producción de CH<sub>4</sub>. Un efecto similar fue reportado por Budiyo *et al.* (2009) al evaluar diferentes concentraciones de un inóculo de líquido ruminal para aumentar la producción de CH<sub>4</sub>. En este estudio la producción acumulada de biogás a 72 h de fermentación fue mayor al adicionar los inóculos LR y AM (Cuadro 14): Resultados similares a los obtenidos por Budiyo *et al.* (2010), Budiyo *et al.* (2009) y Silva *et al.* (2004) al utilizar inóculos en los biodigestores, donde no sólo tuvieron un efecto positivo en la producción de CH<sub>4</sub>, sino también, un incremento en la producción de biogás.

La producción de CH<sub>4</sub> en diferentes periodos de fermentación se incrementó de las 24 a 48 h para AML y LR, un efecto similar fue observado por Charkraborty *et al.* (2002) en el que a medida que avanzaba el tiempo de fermentación la

producción de CH<sub>4</sub> se incrementaba, en el tratamiento AM la mayor producción de CH<sub>4</sub>, así como de CO<sub>2</sub> fue en las primeras 24 h y a partir de ahí comienzo a disminuir, el T que sólo produjo CO<sub>2</sub> fue disminuyendo su producción a medida que avanzaba el tiempo de fermentación.

#### 4.5.2 AGV generados en biodigestores con cerdaza

La producción de AGV totales, acetato, propionato y butirato fue superior ( $P < 0.05$ ) en AM. No hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) en la concentración molar de acetato, propionato y butirato entre T, LR y AML. El propionato se generó en mayor proporción que el resto de los AGV en todos los tratamientos. La relación acetato: propionato fue  $1.425 \pm 0.07$  (Cuadro 15).

Cuadro 15. Proporción de AGV generados en biodigestores de cerdaza fermentada por 72 h.

	T	LR	AML	AM	EEM
AGV totales, mM	60.83 <sup>b</sup>	62.35 <sup>b</sup>	57.32 <sup>b</sup>	89.33 <sup>a</sup>	2.931
Acetato, mM	26.45 <sup>b</sup>	28.32 <sup>b</sup>	24.32 <sup>b</sup>	38.51 <sup>a</sup>	1.487
Propionato, mM	18.12 <sup>b</sup>	19.16 <sup>b</sup>	16.73 <sup>b</sup>	28.98 <sup>a</sup>	0.983
Butirato, mM	16.26 <sup>b</sup>	14.88 <sup>b</sup>	16.27 <sup>b</sup>	21.84 <sup>a</sup>	0.632
Acetato: propionato	1.46: 1	1.47: 1	1.45: 1	1.32: 1	

<sup>a,b</sup> Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

T, testigo; LR, líquido ruminal; AML, arqueobacteria metanogénica liofilizada; AM, arqueobacteria metanogénica.

La mayor producción de AGV totales, así como de acetato, propionato y butirato se generó en el tratamiento AM (Cuadro 15), donde también se produjo la mayor cantidad de CH<sub>4</sub>, este resultado es opuesto a lo reportado por Kumar *et al.* (2002) y Thi *et al.* (2009) quienes concluyen que la mayor producción de AGV en los biodigestores tiene un efecto tóxico en las arqueobacterias metanogénicas y en consecuencia se afecta negativamente la producción de CH<sub>4</sub>.

#### 4.5.3 Concentración de bacterias totales, celulolíticas y arqueobacterias metanogénicas en biodigestores de cerdaza

La población bacteriana total presente en la cerdaza después de 72 h de fermentación fue superior ( $P < 0.05$ ) en LR y AM; mientras que, entre T y AML no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ). La población de arqueobacterias metanogénicas fue inferior ( $P < 0.05$ ) en T y AML (Cuadro 16). La mayor cantidad de arqueobacterias se encontraron en LR y AM. En cuanto a la población de bacterias celulolíticas no se observaron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos y su concentración fue muy baja.

Cuadro 16. Bacterias totales, arqueobacterias metanogénicas y celulolíticas cuantificadas en biodigestores de cerdaza después de 72 h de fermentación.

	T	LR	AML	AM	EEM
Totales, $10^9\text{mL}^{-1}$	3.12 <sup>b</sup>	4.60 <sup>a</sup>	3.55 <sup>b</sup>	4.52 <sup>a</sup>	0.147
Metanogénicas, $10^8\text{mL}^{-1}$	0.09 <sup>c</sup>	1.82 <sup>a</sup>	0.97 <sup>b</sup>	1.97 <sup>a</sup>	0.142
Celulolíticas, $10^3\text{mL}^{-1}$	0.00	0.00	0.00	0.00	

<sup>a,b</sup> Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

T, testigo; LR, líquido ruminal; AML, arqueobacteria metanogénica liofilizada; AM, arqueobacteria metanogénica.

La baja población de bacterias celulolíticas pudo afectar la producción de  $\text{CH}_4$  debido a que la degradación inicial de la materia orgánica se lleva a cabo de manera más lenta, las bacterias celulolíticas son sensibles a un pH ácido, como los obtenidos en todos los tratamientos evaluados (Cuadro 5). Un estudio realizado por Wahyundi *et al.* (2010) muestran que la inoculación de biodigestores con bacterias celulolíticas incrementa la producción de  $\text{CH}_4$ ; sin embargo, si las condiciones no son las adecuadas estas bacterias no crecen tal como paso en todos los tratamientos evaluados.

#### 4.5.4 Potencial de Óxido-reducción y pH de biodigestores de cerdaza

El potencial de óxido-reducción disminuyó en 27 % para AM sin diferencias ( $P > 0.05$ ) con LR (Cuadro 17), el mismo comportamiento se presentó con el pH pero para los T y AML en los que el pH fue inferior con respecto a AM y LR.

Cuadro 17. Potencial de óxido-reducción y pH de biodigestores con cerdaza fermentada por 72 h.

	T	LR	AML	AM	EEM
Potencial de óxido-reducción, mV	-173.26 <sup>a</sup>	-225.91 <sup>b</sup>	-184.15 <sup>a</sup>	-218.40 <sup>b</sup>	3.502
pH	5.21 <sup>b</sup>	5.37 <sup>a</sup>	5.21 <sup>b</sup>	5.43 <sup>a</sup>	0.025

<sup>a b c</sup>Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

T, testigo; LR, líquido ruminal; AML, arqueobacteria metanogénica liofilizada; AM, arqueobacteria metanogénica.

Las arqueobacterias metanogénicas requieren potenciales de óxido-reducción cercanos a -300 mV (Kumar *et al.*, 2009) e intervalos de pH que van de 6 a 8 (Budiyono y Kusworo, 2012) en los biodigestores experimentales estas condiciones no se consiguieron (Cuadro 17) lo que pudo afectar a dichos microorganismos y en consecuencia la producción de CH<sub>4</sub>.

#### 4.6 Conclusiones

Los resultados indican que el uso de inóculos incrementa la producción de CH<sub>4</sub> y biogás total. El inóculo de la arqueobacteria liofilizada y activada en su medio de cultivo resulto la mejor opción para incrementar la producción de CH<sub>4</sub> en biodigestores de cerdaza. La proporción molar de los AGV no se afectó con el uso de los inóculos evaluados, sin embargo, la producción total de AGV se incrementó en AM. La población de bacterias y arqueobacterias se incrementó al inocular con líquido ruminal o con la arqueobacteria activada en su medio de cultivo. Tanto el pH como el potencial de óxido-reducción no fueron los

adecuados para el desarrollo de los microorganismos, principalmente para las arqueobacterias metanogénicas, por lo que se recomienda aumentar la capacidad tampón en el biodigestor.

#### **4.7 Literatura citada**

- Álvarez, J. A., L. Otero, J. M. Lema, and F. Omil. 2010. The effect and fate of antibiotics during the anaerobic digestion of pig manure. *Bioresource Technology* 101: 8581-8586.
- Budiyono, I. and T. D. Kusworo. 2012. Microalgae for stabilizing biogas production from cassava starch wastewater. *Journal of Waste Resources* 2: 17-21.
- Budiyono, I., N. Widiassa, S. Johari, and Sunarso. 2009. Increasing biogas production rate from cattle manure using rumen fluid as inoculums. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 10: 68-75.
- Budiyono, I., N. Widiassa, S. Johari, and Sunarso. 2010. The kinetic of biogas production rate from cattle manure in batch mode. *International Journal of Chemical and Biological Engineering* 3: 1-6.
- Cepero, L., V. Savran, D. Blanco, M. R. Díaz, J. Suárez, and A. Palacios. 2012. Production of biogas and biofertilizers from biodigester effluents. *Pastos y Forrajes* 35: 216-226.
- Chakraborty, N., G. M. Sarkar, and S. C. Lahiri. 2002. Biomethanation of plant materials and agricultural residues using dung samples as wild population of microbes and also with isolated methanogens. *The Environmentalist* 22: 173-182.
- Gilroyed, B. H., T. Reuter, A. Chu, X. Hao, W. Xu, and T. McAllister. 2010. Anaerobic digestion of specified risk materials with cattle manure for biogas production. *Bioresource Technology* 101: 5780-5785.
- Harrigan, W. F. y M. E. McCance. 1979. *Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos*. Editorial Academia. León, España. 419 p.
- Kumar, R. D., C. W. Kant, S. A. Imteyaz, D. K. Vrat, and L. Singh. 2002. Effect of propionate toxicity on methanogenesis of night soil at psychrophilic temperature. *Bioresource Technology* 87: 299-303.

- Kumar, S., A. P. Kumar, M. Puniya, S. D. Singh, S. S. Kumar, K. Singh, and G. G. Wyn. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *Journal Microbiology Biotechnology* 25: 1157-1566.
- Martins, N. L. C., A. Converti, and T. C. Vessoni. 2009. Biogas production: new trends for alternative energy sources in rural and urban zones. *Chemical Engineering and Technology* 32(8): 1147-1153.
- Ramírez, H. I. F. 2010. Emisiones de metano generado por excretas de animales de granja y contenido ruminal de bovino. Tesis de Doctorado del Colegio de Postgraduados. 166 pp.
- Sanz, J. L., N. Rodríguez, and R. Amils. 1996. The action of antibiotics on the anaerobic digestion process. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46: 587-592.
- Shi, J. C., X. D. Liao, Y. B. Wu, and J. B. Liang. 2011. Effect of antibiotics on methane arising from anaerobic digestion of pig manure. *Animal Feed Science and Technology* 166: 457-463.
- Silva, L. W., V. Duarte, and S. Prasad. 2004. Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. *Bioresource Technology* 94: 261-266.
- Solero, R., L. I. Romero, and D. Sales. 2001. Analysis of the methane production in thermophilic anaerobic reactors: use of autofluorescence microscopy. *Biotechnology Letters* 23: 1889-1892.
- Thi, V. Y., J. Clemens, A. Rechenburg, B. Vinneras, C. LenBen, and T. Kistemann. 2009. Hygienic effects and gas production of plastic biodigesters under tropical conditions. *Journal of Water and Health* 7: 590-596.
- Wahyudi, A., L. Hendraningsih, and A. Malik. 2010. Potency of fibrolytic bacteria isolated from Indonesian sheep's colon as inoculum for biogas and methane production. *African Journal of Biotechnology* 9(20): 2994-2999.



## 5. CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN DE BIODIGESTORES DE CERDAZA CON UN pH Y POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUCCIÓN SIMILAR

María Guadalupe Domínguez Ordóñez. Dra.

Colegio de Postgraduados, 2014

### 5.1 Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* la cantidad de CH<sub>4</sub> generado en biodigestores de cerdaza inoculados con líquido ruminal o arqueobacterias metanogénicas en medios con pH y potencial de óxido-reducción inicial de 7.4 y -286 mV, respectivamente. El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron: 1) testigo (T) = 2 g de cerdaza, 2) líquido ruminal (LR) = 2 g de cerdaza inoculada con 2.5 mL de líquido ruminal, 3) arqueobacteria metanogénica (AML) = 2 g de cerdaza inoculada con 0.05 g de arqueobacteria metanogénica liofilizada y 4) arqueobacteria metanogénica (AM) = 2 g de cerdaza inoculada con 5 mL de arqueobacteria metanogénicas crecida en medio de cultivo. La cerdaza fue ajustada a 5 % MS y las muestras fueron fermentadas durante 72 h a 39°C. La cantidad de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y biogás total se midió a 24, 48 y 72 h desde la inoculación. Después de 72 h se cuantificó la población de bacterias totales, celulolíticas y arqueobacterias, AGV, NH<sub>4</sub>, pH y potencial de óxido-reducción. La producción total de biogás fue superior ( $P < 0.05$ ) en LR seguida de AM, sin embargo la producción de CH<sub>4</sub> fue superior ( $P < 0.05$ ) en AM. Durante las primeras 24 h de incubación se produjo la mayor cantidad de biogás. La concentración de bacterias totales y celulolíticas fue superior ( $P < 0.05$ ) en LR en cuanto que de arqueobacterias metanogénicas fue superior ( $P < 0.05$ ) en AM mismo tratamiento que produjo mayor cantidad de CH<sub>4</sub>. El uso de inóculos tiene un efecto positivo en la producción de CH<sub>4</sub> en biodigestores de cerdaza.

**Palabras claves:** biogás, CH<sub>4</sub>, arqueobacterias metanogénicas, fermentación *in vitro*.

## EVALUATION OF SWINE MANURE DIGESTERS WITH SIMILAR PH AND OXIDATION-REDUCTION POTENTIAL

María Guadalupe Domínguez Ordóñez. Dra.

Colegio de Postgraduados, 2014

### 5.2 Abstract

The objective of this study was to evaluate the amount of CH<sub>4</sub> generated in swine manure digesters *in vitro* inoculated with ruminal fluid or methanogenic archaeobacteria in media with an initial pH and oxidation-reduction potential of 7.4 and -286 mV, respectively. The experiment was conducted as a complete randomized design and treatments were: 1) control (C) = 2 g of swine manure, 2) ruminal fluid (RF) = 2 g of swine manure inoculated with 2.5 mL of ruminal fluid, 3) lyophilized methanogenic archaeobacteria (LMA) = 2 g of swine manure inoculated with 0.05 g of lyophilized methanogenic archaeobacteria, 4) and methanogenic archaeobacteria (MA) = 2 g of swine manure inoculated with 5 mL of methanogenic archaeobacteria grown in culture medium. Swine manure utilized was adjusted to 5 % DM and samples were incubated at 39 °C for 72 h. The amount of CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> and total biogas was measured at 24, 48 and 72 h of incubation. After 72 h, the population of total bacteria, cellulolytic bacteria and archaeobacteria, VFA, NH<sub>4</sub>, pH and oxidation-reduction potential were measured. The production of total biogas was greatest ( $P < 0.05$ ) in treatment RF followed by MA. However, the production of CH<sub>4</sub> was greatest ( $P < 0.05$ ) in MA. The majority of biogas was produced during the first 24 h of incubation. The concentration of total bacteria and cellulolytic bacteria was greatest ( $P < 0.05$ ) in RF, whereas methanogenic archaeobacteria were greatest ( $P < 0.05$ ) in MA. In addition, MA yielded the greatest amount of CH<sub>4</sub>. Inocula evaluated in this trial had a positive effect on the production of CH<sub>4</sub> in swine manure digesters.

**Key words:** biogas, CH<sub>4</sub>, methanogenic archaeobacteria, *in vitro* fermentation

### 5.3 Introducción

La producción de biogás y en particular de CH<sub>4</sub> puede ser afectada por factores como temperatura, concentración de NH<sub>3</sub>, y pH. Además, la producción de CH<sub>4</sub> tiene varios problemas, por ejemplo, la eficiencia de fermentación es baja, la tasa de crecimiento de los metanógenos es extremadamente lenta, y éstos son lavados con los efluentes (Nomura *et al.*, 2008).

Los microorganismos presentes en los biodigestores son complejos, delicados y sensibles a algunas variables del proceso como pH, alcalinidad, concentración de NH<sub>3</sub> libre, hidrógeno, AGV. Estas variables pueden ser factores que inhiben algunos o todos los grupos bacterianos (Appels *et al.*, 2008).

La disminución de la temperatura en los biodigestores puede retardar la producción de CH<sub>4</sub>, sin perjudicar la actividad de las bacterias acidificantes, que permite una excesiva acumulación de ácidos y una posible falla en el biodigestor (Osorio *et al.*, 2007). Las arqueobacterias metanogénicas son muy sensibles a cambios bruscos de temperatura, y su adaptación a largo plazo es esencial para el tratamientos de estiércol a bajas temperaturas (Santosh *et al.*, 2004).

El manejo de biorreactores anaerobios requiere asegurar condiciones físico-químicas para su correcto funcionamiento (Kherbouche, 2013). La digestión anaerobia es un proceso complejo que requiere condiciones anaerobias estrictas (potencial de óxido-reducción <-200 mV) y depende de la actividad coordinada de un complejo grupo de microorganismos para transformar la materia orgánica en CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Appels *et al.*, 2008).

Los microorganismos anaerobios sobreviven y degradan los sustratos más eficientemente cuando el potencial de óxido-reducción de su ambiente está entre -200 y -400 mV, la mínima cantidad de oxígeno disuelto en los biodigestores incrementa el potencial de óxido-reducción del contenido y afecta la actividad

anaerobia incluyendo hidrólisis, acetogénesis y metanogénesis (Gerardi, 2003). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la cantidad de CH<sub>4</sub> generado en biodigestores de cerdaza con pH, potencial de óxido-reducción y temperatura controlados, inoculados con líquido ruminal o arqueobacterias metanogénicas.

## **5.4 Materiales y métodos**

### **5.4.1 Fuente de inóculo**

Los inóculos evaluados fueron: 1) líquido ruminal obtenido de una vaca Holstein adulta, alimentada con paja de avena y concentrado; 2) un cultivo puro de arqueobacterias metanogénicas liofilizadas con 0.4 % de carbón activado y 3) la arqueobacteria metanogénica liofilizada, pero activada por 72 h en medio FOR-FR. . El líquido ruminal se extrajo directamente a través de la cánula 2 h después de la alimentación matutina, se filtró a través de manta de cielo y conservó a 39 °C hasta el momento de su uso.

### **5.4.2 Producción de biogás**

En viales serológicos se depositaron 2 g de excreta de cerdo y ajustaron a 5 % de materia seca, se taparon y sellaron herméticamente para prevenir la pérdida del biogás producido durante la fermentación. Estos viales fueron colocados en un baño María a 39 °C. Los tratamientos fueron: testigo (T) = 2 g de excretas; LR = 2 g de cerdaza más 2.5 mL de líquido; AML = 2 g de cerdaza más 0.05 g de la arqueobacteria aislada y liofilizada con carbón activado y; AM 2 g de cerdaza más 5 mL de un cultivo puro de la arqueobacteria activada por 72 h en medio FOR-FR (ver Capítulo III). En todos los tratamientos se logró una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  bacterias por mL de cerdaza.

Los tratamientos se ajustaron a 5 % de MS en un volumen final de 40 mL, usando la solución descrita en el Cuadro 18, esta solución permitió ajustar el pH

inicial a 7.40 y el potencial de óxido reducción a -286.1 mV. Se usaron siete repeticiones y dos que sólo contenían agua para ajustar los datos por la presión de vapor ejercida a la temperatura de incubación (39°C).

Cuadro 18. Composición de la solución para ajustar las excretas de cerdo a 5 % de MS.

Componente	Por cada 100 mL
Agua destilada, mL	88.35
Carbonato de sodio 8 % <sup>a</sup> , mL	3.35
Solución cisteína-sulfido <sup>b</sup> , mL	8.39

<sup>(a)</sup> 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

<sup>(b)</sup> 2.5 g de L-cisteína (disuelta en NaOH 2N), 2.5 g de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O. La mezcla es aforada a 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada y agregar 0.1 mL resazurina (solución al 0.1 % agua destilada).

Mangueras de Tygon® de aproximadamente 30 cm de largo y 0.25 mm de diámetro las cuales tenían en los extremos agujas hipodérmicas de calibre 20 G x 1" de la marca Terumo® conectadas a cada uno de los viales. En cada manguera se colocó una pinza para controlar el paso del biogás generado en el vial-biorreactor a través de la manguera. La pinza se retiró cada 24 h para medir la producción de biogás.

Viales serológicos llenos de solución salina ácida fueron usados como trampas del biogás producido. La solución salina se preparó diluyendo 400 g de cloruro de sodio por litro de agua, después se agregaron 10 mL de anaranjado de metilo al 0.1 % (Hycel®) y se ajustó el pH a 2.

Se introdujo una aguja del calibre 20 G x 1" de la marca Terumo® en el vial con solución salina la cual sirvió como válvula de alivio, y se colocó sobre una probeta donde se midió la cantidad de solución salina desplazada por el biogás.

La pinza se retiró a 24, 48 y 72 h de incubación y se dejó salir el biogás a través de la manguera, dicho biogás ingresó al vial con solución salina y desplazó la

solución a través de la válvula de alivio que cayó en la probeta donde se midió el volumen. Cada 24 h se cambiaron las trampas de solución salina para la determinación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a 24, 48 y 72 h de incubación.

#### 5.4.3 Determinación de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y AGV

De las trampas de solución salina donde se captó el biogás se tomó una muestra de 30 µL del biogás y se inyectó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer, modelo Clarus 500. Se usó un detector de conductividad térmica (TCD), las temperaturas del horno, columna y TCD fueron de 80, 170 y 130 °C respectivamente. El gas helio fue usado como gas acarreador. Los tiempos de retención fueron 0.73 y 1.05 min para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente.

Para la determinación de AGV se mezcló 1 mL de la cerdaza fermentada durante 72 h con 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % para obtener una proporción 4:1. Dicha mezcla se centrifugó a 20, 817 × g a 4 °C por 10 min en una centrifuga Eppendorf modelo 5810R. El sobrenadante de los tubos fue depositado en viales para cromatografía y se almacenaron en congelación hasta su análisis. Los AGV se determinaron usando un cromatógrafo de gases PerkinElmer, modelo Clarus 500 con automuestreador, se usó una columna capilar empacada Elite FFAP (PerkinElmer). Las temperaturas del horno, detector de ionización de flama (FID) e inyector fueron: 120, 250 y 250 °C respectivamente. El gas nitrógeno fue usado como gas acarreador. El tiempo de retención fue 2.25, 2.75 y 3.25 min para el acetato, propionato y butirato, respectivamente.

#### 5.4.4 Determinación de NH<sub>3</sub>

De las muestras preparadas para medir AGV, se mezclaron 20 µL con 1 mL de fenol y posteriormente con 1 mL de hipoclorito de sodio. Las muestras se incubaron en baño maría 30 min a 37 °C. Después de la incubación se

adicionaron 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro de luz ultravioleta CARY 1-E VARIAN a una longitud de onda de 630 nm.

#### 5.4.5 Conteo de bacterias totales, metanogénicas y celulolíticas

El conteo de bacterias totales se realizó de manera directa en una cámara Petroff-Hausser (Halisser Scientific®) y usando un microscopio Olympus modelo BX51, a una magnificación de 1000X. Para el conteo se utilizó 1 mL de cerdaza fermentada por 72 h mezclada y fijada con formaldehído al 10 %. Para calcular la concentración final se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias totales, mL}^{-1} = (X) (\text{FD}) (2 \times 10^7)$$

Donde:

X = media de los conteos de bacterias en los cuadros de la cámara Petroff-Hausser.

FD = factor de dilución.

$2 \times 10^7$  = factor de corrección de la cámara Petroff-Hausser para una conversión de datos a un volumen de 1 mL.

Las arqueobacterias metanogénicas se contaron de manera similar a las bacterias totales con la diferencia que estas sólo se mezclaron con agua y no con formaldehído. Para realizar el conteo se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus, modelo BX51 acoplado a una lámpara de mercurio para observar la autofluorescencia de las arqueobacterias metanogénicas.

La concentración de bacterias celulolíticas se determinó por el método del NMP (Harrigan y McCance, 1979). La prueba se realizó con diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ , en tubos de 13 x 100 mm que contenían 4.5 mL de medio de cultivo (Cuadro 19) y una tira de papel Whatman de 2.5 x 0.3 cm, los tubos con la mayor dilución se inocularon directamente con 0.5 mL de cerdaza fermentada y a partir de esos se

realizaron las otras diluciones. Todas las diluciones se incubaron a 39 °C durante 10 d.

Cuadro 19. Composición del medio de cultivo para conteo de bacterias celulolíticas.

Componente	Por cada 100 mL
Agua destilada, mL	52.6
Líquido ruminal clarificado <sup>a</sup> , mL	30.0
Solución mineral I <sup>b</sup> , mL	5.0
Solución mineral II <sup>c</sup> , mL	5.0
Resazurina (solución al 0.1 %) <sup>d</sup> , mL	0.1
Trypticase-peptona, g	0.2
Extracto de levadura, g	0.1
Carbonato de Na (solución al 8 %) <sup>e</sup> , mL	5.0
Cisteína-sulfido <sup>f</sup> , mL	2.0

<sup>(a)</sup> El líquido ruminal fresco previamente filtrado a través de manta de cielo y centrifugado a 13 416 x g por 10 minutos, a 4°C y esterilizado 15 min en autoclave a 121°C.

<sup>(b)</sup> Contiene 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, por 1000 mL de agua destilada.

<sup>(c)</sup> Contiene 6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO<sub>4</sub>; y 1.6 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O por 1000 mL de agua destilada.

<sup>(d)</sup> Disolver 100 mg de Resazurina en 100 mL de agua destilada. Esterilizar 15 min a 121°C y guardar en refrigeración.

<sup>(e)</sup> 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

<sup>(f)</sup> 2.5 g de L-cisteína (disuelta en NaOH 2N), 2.5 g de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O. La mezcla es aforada a 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada y agregar 0.1 mL resazurina (solución al 0.1 % agua destilada).

#### 5.4.6 Medición del potencial de óxido-reducción y pH

Se utilizaron 5 mL de la muestra de los biodigestores después de 72 h de incubación. Para realizar la determinación del pH se usó el electrodo de un pH metro Thermo Orion 720A+ directamente en muestra. Para la medición del potencial de óxido-reducción se usó el electrodo de un equipo Orion 710A.

#### 5.4.7 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron: T = 2 g de excretas; LR = 2 g de cerdaza más 2.5 mL de líquido ruminal; AML = 2 g de cerdaza además de 0.05 g de la arqueobacteria aislada y liofilizada con carbón activada y; AM = 2 g de cerdaza más 5 mL de un cultivo de la arqueobacteria activada; y hubo siete repeticiones por tratamiento. Los inóculos se usaron a una concentración  $1 \times 10^7$

Los datos del experimento fueron analizados con el procedimiento GLM de SAS y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Los datos para las bacterias totales y arqueobacterias metanogénicas se transformaron logarítmicamente usando la función log (1) de SAS.

### 5.5 Resultados y discusión

#### 5.5.1 Producción de biogás, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en biodigestores de cerdaza

La producción total de biogás a 24 h fue superior ( $P < 0.05$ ) en LR y entre el resto de los tratamientos no se observaron diferencias, sin embargo, de ese biogás producido la cantidad de CH<sub>4</sub> fue superior ( $P < 0.05$ ) en AM a pesar de su menor producción de biogás. La producción de biogás de 24 a 48 h de fermentación fue superior en AM seguido por LR entre los que hubo una diferencia superior al 19.5 %. Entre T y AML no se observaron diferencias ( $P > 0.05$ ). A 24 h de incubación la proporción de CH<sub>4</sub> se incrementó en 64.9, 32.1 y 160 % para LR, AML y AM (respectivamente) con relación a T (Cuadro 20). En el último periodo (72 h) la mayor producción de biogás se observó en T y AML; aunque no se observaron diferencias entre tratamientos ( $P > 0.05$ ) en la producción de CH<sub>4</sub> mientras que, T y AML produjeron más ( $P < 0.05$ ) CO<sub>2</sub>. La mayor producción de biogás acumulado a 72 h de incubación se presentó en el LR seguido del AM con una diferencia de 25 %.

La producción de CH<sub>4</sub> en T se mantuvo estable durante el tiempo de incubación, en contraste con LR y AM, donde la producción de CH<sub>4</sub> disminuyó a medida que avanzó el tiempo de fermentación. Después de 72 h de fermentación, se produjo 90.6, 25.9 y 204.7 % más CH<sub>4</sub> para LR, AML y AM, respectivamente.

Cuadro 20. Producción de biogás, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> a 24, 48 y 72 h de fermentación de 100 g de cerdaza con diferentes inóculos.

	T	LR	AML	AM	EEM
24 h					
Biogás, mL100 gMS <sup>-1</sup>	2070.14 <sup>a</sup>	3857.45 <sup>b</sup>	2365.75 <sup>a</sup>	2370.74 <sup>a</sup>	88.52
Biogás, mM100 gMS <sup>-1</sup>	57.95 <sup>a</sup>	107.97 <sup>b</sup>	66.22 <sup>a</sup>	66.36 <sup>a</sup>	2.48
CH <sub>4</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	2.83 <sup>a</sup>	7.56 <sup>b</sup>	2.96 <sup>a</sup>	14.40 <sup>c</sup>	0.42
CO <sub>2</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	55.12 <sup>ab</sup>	100.41 <sup>c</sup>	63.26 <sup>b</sup>	51.96 <sup>a</sup>	2.22
48 h					
Biogás, mL100 gMS <sup>-1</sup>	626.70 <sup>a</sup>	934.57 <sup>b</sup>	530.34 <sup>a</sup>	1161.88 <sup>c</sup>	43.63
Biogás, mM100 gMS <sup>-1</sup>	17.54 <sup>a</sup>	26.16 <sup>b</sup>	14.84 <sup>a</sup>	32.52 <sup>c</sup>	1.22
CH <sub>4</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	3.08 <sup>a</sup>	5.08 <sup>c</sup>	4.07 <sup>b</sup>	8.02 <sup>d</sup>	0.23
CO <sub>2</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	14.46 <sup>a</sup>	21.08 <sup>b</sup>	10.78 <sup>a</sup>	24.50 <sup>b</sup>	1.06
72 h					
Biogás, mL100 gMS <sup>-1</sup>	435.17 <sup>ab</sup>	322.89 <sup>a</sup>	504.75 <sup>b</sup>	306.57 <sup>a</sup>	43.57
Biogás, mM100 gMS <sup>-1</sup>	12.18 <sup>ab</sup>	9.04 <sup>a</sup>	14.13 <sup>b</sup>	8.58 <sup>a</sup>	1.22
CH <sub>4</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	2.75	3.87	3.88	3.97	0.38
CO <sub>2</sub> , mM100 gMS <sup>-1</sup>	9.43 <sup>b</sup>	5.17 <sup>a</sup>	10.25 <sup>b</sup>	4.61 <sup>a</sup>	0.88
Biogás acumulado, mL100 gMS <sup>-1</sup>	3132.01 <sup>a</sup>	5114.92 <sup>c</sup>	3400.85 <sup>a</sup>	3839.19 <sup>b</sup>	104.80
Biogás acumulado, mM100 gMS <sup>-1</sup>	87.67 <sup>a</sup>	143.17 <sup>c</sup>	95.19 <sup>a</sup>	107.46 <sup>b</sup>	2.93
CH <sub>4</sub> acumulado generado por 100 g MS					
24, h	2.83 <sup>a</sup>	7.56 <sup>b</sup>	2.96 <sup>a</sup>	14.40 <sup>c</sup>	0.42
48, h	5.91 <sup>a</sup>	12.65 <sup>b</sup>	7.03 <sup>a</sup>	22.42 <sup>c</sup>	0.45
72, h	8.66 <sup>a</sup>	16.51 <sup>c</sup>	10.91 <sup>b</sup>	26.39 <sup>d</sup>	0.53
CO <sub>2</sub> acumulado generado por 100 g MS					
24, h	55.12 <sup>ab</sup>	100.41 <sup>c</sup>	63.26 <sup>b</sup>	51.96 <sup>a</sup>	2.22
48, h	69.58 <sup>a</sup>	121.49 <sup>b</sup>	74.04 <sup>a</sup>	76.46 <sup>a</sup>	2.59
72, h	79.01 <sup>a</sup>	126.66 <sup>b</sup>	84.29 <sup>a</sup>	81.07 <sup>a</sup>	2.65

<sup>a b c</sup>Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

T, testigo; LR, líquido ruminal; AML, arqueobacteria metanogénica liofilizada; AM, arqueobacteria metanogénica liofilizada activada.

En el periodo de 48 h se obtuvo la mayor proporción de CH<sub>4</sub> en todos los tratamientos. AM tuvo la mayor producción de CH<sub>4</sub> en cualquiera de los tiempos de incubación evaluados, iniciando con 21.69 % en el periodo de 0 a 24 h y finalizado con 46.27 % en el periodo de 48 a 72 h de incubación.

El uso de inóculos favorece la producción de biogás, por ejemplo, el uso del efluente de biodigestores activos incrementó la producción de biogás 89.2 % (Patil *et al.*, 2011). Un efecto similar fue reportado por Uzodinma y Ofoefule (2008) al triplicar la producción de biogás a partir de subproductos agrícolas inoculados con líquido ruminal. Los mismos autores también reportan una disminución de la fase *lag* en los biodigestores inoculados con producción de biogás antes de las 24 h de fermentación. En ambos estudios el efecto observado es superior al de este experimento, en el que el uso de inóculos incrementó la producción de biogás en 63 y 22 % para LR y AM, respectivamente.

Uno de los principales efectos del uso de inóculos en este estudio fue el incremento en la producción de biogás y en particular de CH<sub>4</sub>, de manera similar a los resultados obtenidos por Silva *et al.* (2004), Budiyo *et al.* (2009), y Budiyo *et al.* (2010) con diferentes inóculos.

### 5.5.2 AGV y NH<sub>3</sub> generados en biodigestores con cerdaza

La producción de AGV totales fue superior ( $P < 0.05$ ) al 30 % en AM con respecto al testigo. La mayor producción de AGV totales, así como de cada AGV (acetato, propionato y butirato) se generó en AM (Cuadro 21), sin embargo, las proporciones de cada AGV son similares ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos. El AGV con mayor producción fue el acetato en todos los tratamientos con un 60 % del total, similares proporciones cuantificaron Fothergill y Mavinic (2000) en biodigestores alimentados con desechos municipales.

En un estudio realizado por Chachkhiani *et al.* (2003) asocian la menor cantidad de AGV con una alta actividad metanogénica, contrario a lo que sucedió en este experimento, ya que, el tratamiento con mayor producción de AGV coincidió también con la mayor producción de CH<sub>4</sub>.

Cuadro 21. Proporción de AGV y NH<sub>4</sub> generados en biodigestores de cerdaza fermentada por 72 h.

	T	LR	AML	AM	EEM
AGV totales, mM	100.82 <sup>a</sup>	110.97 <sup>ab</sup>	114.85 <sup>b</sup>	131.53 <sup>c</sup>	3.14
Acetato, mM	60.18 <sup>a</sup>	68.52 <sup>b</sup>	70.21 <sup>b</sup>	79.60 <sup>c</sup>	1.87
Propionato, mM	26.73 <sup>a</sup>	27.42 <sup>a</sup>	29.21 <sup>a</sup>	35.70 <sup>b</sup>	0.89
Butirato, mM	13.91 <sup>a</sup>	15.02 <sup>ab</sup>	15.43 <sup>ab</sup>	16.24 <sup>b</sup>	0.54
Acetato: propionato	2.25:1	2.49:1	2.40:1	2.22:1	
NH <sub>3</sub> , mg dL <sup>-1</sup>	8.37 <sup>a</sup>	9.78 <sup>b</sup>	10.89 <sup>c</sup>	9.36 <sup>b</sup>	0.09

<sup>a b c</sup> Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

T, testigo; LR, líquido ruminal; AML, arqueobacteria metanogénica liofilizada; AM, arqueobacteria metanogénica.

El uso de inóculos favoreció la producción de NH<sub>3</sub> siendo mayor el incremento en AML (Cuadro 21). La concentración de NH<sub>3</sub> determinada en todos los tratamientos se encuentran dentro del intervalo indicado como adecuado por Gallert y Winter (1997) para condiciones mesofílicas que van de 8- 15 mg N dL<sup>-1</sup> a pH de 7.5. Por tanto, el incremento en la producción de NH<sub>3</sub> en los biodigestores inoculados no fue suficiente para afectar negativamente la producción de biogás y CH<sub>4</sub>.

### 5.5.3 Concentración de bacterias totales, celulolíticas y arqueobacterias metanogénicas en los biodigestores de cerdaza

La población bacteriana total presente en la cerdaza después de 72 h de fermentación fue superior ( $P < 0.05$ ) en LR seguido de AM. También se

determinó una mayor población de bacterias celulolíticas, las cuales fueron similares entre AML y AM (Cuadro 22). Las población de arqueobacterias metanogénicas fue inferior ( $P < 0.05$ ) en T, mientras que la mayor cantidad de éstas se cuantificó en AM, donde se inoculó con un cultivo puro de dichos microorganismos. A pesar de que en AML también se utilizó un inóculo de arqueobacterias metanogénicas, la población fue inferior, esto como consecuencia del proceso de conservación que reduce la actividad de los microorganismos (Hancocks *et al.*, 2010), y por tanto, el proceso de activación es fundamental para lograr una buena actividad del inóculo de arqueobacterias metanogénicas.

Cuadro 22. Concentración de bacterias totales, celulolíticas y arqueobacterias metanogénicas en biodigestores de cerdaza después de 72 h de fermentación.

	T	LR	AML	AM	EEM
Totales, $10^9\text{mL}^{-1}$	4.56 <sup>a</sup>	7.60 <sup>c</sup>	5.57 <sup>ab</sup>	6.49 <sup>bc</sup>	0.44
Metanogénicas, $10^8\text{mL}^{-1}$	0.98 <sup>a</sup>	3.16 <sup>c</sup>	1.80 <sup>b</sup>	4.30 <sup>d</sup>	0.15
Celulolíticas, $10^5\text{mL}^{-1}$	0.93	11000	4.6	4.6	

<sup>a b</sup> Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

T, testigo; LR, líquido ruminal; AML, arqueobacteria metanogénica liofilizada; AM, arqueobacteria metanogénica.

Los biodigestores con mayor cantidad de arqueobacterias metanogénicas presentaron mayor producción de  $\text{CH}_4$ , un efecto similar fue reportado por McMahon *et al.* (2004) y Solero *et al.* (2001), quienes además, concluyen que un nivel adecuado de arqueobacterias metanogénicas es esencial para la rápida estabilización de digestores y que la producción de biogás no es posible sin la suficiente cantidad de microorganismos, los cuales se encuentran frecuentemente en baja concentración en material fresco.

El uso de inóculos favorece la cantidad de microorganismos benéficos en los biodigestores, incluso, el uso de los lixiviados del biodigestor como inóculo,

induce el incremento en número de microorganismos deseables en biodigestores (Ghanimeh *et al.*, 2013).

#### 5.5.4 Potencial de óxido-reducción y pH de biodigestores de cerdaza

El potencial de óxido-reducción se redujo en todos los tratamientos, sin embargo la mayor disminución se observó en T (17 %, Cuadro 23), a pesar de tener el potencial de óxido-reducción adecuado para el desarrollo de las arqueobacterias metanogénicas (-300 mV; Kumar *et al.*, 2009) este tratamiento tuvo la menor concentración de este grupo microbiano, lo que pudo ser causado por la menor población inicial, y aunado a esto, las arqueobacterias metanogénicas tienen una tasa de crecimiento extremadamente lenta (Nomura *et al.*, 2008).

Opuesto a lo encontrado por Zhu *et al.* (2009) quienes después de inyectar un flujo de aire inocularon sus biodigestores con efluente de un biodigestor activo con lo que lograron disminuir el potencial de óxido-reducción de -200 a -300, en este estudio la disminución fue mínima (3 a 17 %) aunque dicho factor se encontraba cercano al adecuado para las arqueobacterias metanogénicas.

Cuadro 23. Potencial de óxido-reducción y pH de biodigestores con cerdaza fermentada por 72 h.

	T	LR	AML	AM	EEM
Potencial de óxido-reducción, mV	-334 <sup>a</sup>	-320 <sup>ab</sup>	-301 <sup>bc</sup>	-296 <sup>c</sup>	4.67
pH	6.69 <sup>a</sup>	6.98 <sup>b</sup>	7.01 <sup>b</sup>	7.04 <sup>b</sup>	0.005

<sup>a b c</sup> Valores con diferente literal por hilera presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

T, testigo; LR, líquido ruminal; AML, arqueobacteria metanogénica liofilizada; AM, arqueobacteria metanogénica.

El pH disminuyó en todos los tratamientos con respecto al pH inicial (7.4), sin embargo, el uso de inóculos favoreció la menor afectación del mismo (Cuadro 23). Las arqueobacterias metanogénicas son anaerobias obligadas de lento

crecimiento y altamente sensibles a pH, su intervalo óptimo varía de 6 a 8. Uzodinma y Ofoefule (2008) evaluaron el efecto de inocular líquido ruminal sobre el pH del biodigestor, y determinaron que el inóculo favoreció el pH manteniéndolo en 6.5, mientras que, en el tratamiento testigo el pH disminuyó hasta 5, lo que concuerda con este experimento ya que el pH de T fue el más afectado, y disminuyó 10 % comparado con los tratamientos que fueron inoculados; aunque, el pH de todos los tratamientos se encuentra dentro del intervalo adecuado para la actividad de microorganismos anaerobios.

## **5.6 Conclusiones**

El uso de inóculos favorece la producción de biogás y CH<sub>4</sub>. Las arqueobacterias en medio de cultivo fueron la mejor opción para incrementar la producción de CH<sub>4</sub> en biodigestores de cerdaza. Las proporciones de AGV no se afectaron con el uso de inóculos aunque sí hubo mayor producción de AGV totales con la arqueobacteria activada en medio FOR-FR. La población de bacterias totales incrementó al inocular líquido ruminal o la arqueobacteria activada. Tanto el pH como el potencial de óxido reducción se mantuvieron en los intervalos adecuados para la producción de biogás y CH<sub>4</sub>.

## **5.7 Literatura citada**

- Appels, L., J. Baeyens, J. Degréve, and R. Dewil. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 755-781.
- Budiyono, I., N. Widiassa, S. Johari, and Sunarso. 2009. Increasing biogas production rate from cattle manure using rumen fluid as inoculums. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 10: 68-75.
- Budiyono, I., N. Widiassa, S. Johari, and Sunarso. 2010. The kinetic of biogas production rate from cattle manure in batch mode. *International Journal of Chemical and Biological Engineering* 3: 1-6.

- Chachkhiani, M., P. Debert, T. Abzianidze, G. Partskhaladze, L. Tsiklauri, T. Dudaury, and J. J. Godon. 2003. 16 rDNA characterization of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology* 93: 227-232.
- Fothergill, S. and D. S. Mavinic. 2000. VFA production in thermophilic anaerobic digestion of municipal sludges. *Journal of Environmental Engineering* 126(5): 389-396.
- Gallert, C. and J. Winter. 1997. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic wastes: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 405-410.
- Gerardi, H. M. 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. A John Wiley and Sons, Inc., Publication, pp 177.
- Ghanimeh, S., P. E. Saikaly, D. Li, and M. El. 2013. Population dynamics during startup of thermophilic anaerobic digesters: The mixing factor. *Waste Management* 33(11): 1-8.
- Hancocks, N. H., C. R. Thomas, S. M. Stocks, and C. J. Hewitt. 2010. An investigation into the preservation of microbial cell banks for  $\alpha$ -amylase production during 5 L fed-batch *Bacillus licheniformis* fermentations. *Biotechnology Letters* 32:1405-1412.
- Harrigan, W. F. y M. E. McCance. 1979. *Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos*. Editorial Academia. León, España. 419 p.
- Kherbouche, B. B. 2013. Anaerobic digestion: an energy and environmental. *American Journal of Environmental Protection* 2(2): 47-52.
- Kumar, A., A. Kumar, R. Kumar, and J. S. Sudarsan. 2010. Biogas manure (BGM) from mixed kitchen waste: a trial study. *Journal of Environmental Research and Development* 5(1): 164-171.
- Kumar, S., A. Kumar, M. Puniya, S. S: Dagar, S. Kumar, K. Singh, and G. Wyn. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *Journal Microbiology Biotechnology* 25: 1557-1566.
- McMahon, D. K., D. Zheng, A. J. M. Stams, R. I. Mackie, and L. Raskin. 2004. Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 87(30): 823-834.

- Nomura, T., T. Nagao, A. Yoshihara, H. Tokomoto, and Y. Konishi. 2008. Selective immobilization of acetoclastic methanogens to support material. *Powder and Particle Journal* 26: 246-253.
- Osorio, J., H. Ciro y H. González. 2007. Evaluación de un sistema de biodigestión en serie para clima frío. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 60(2): 4145-4162.
- Patil, J. H., M. L. A. Raj, S. Bhargav, and S. R. Sowmya. 2011. Anaerobic co-digestion of water hyacinth with primary sludge. *Research Journal of Chemical Sciences* 1(3): 72-77.
- Santosh, Y., T. R. Sreekrishnan, S. Koholi, and V. Rana. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques: a review. *Bioresource Technology* 95: 1-10.
- Silva, L. W., V. Duarte, and S. Prasad. 2004. Influence of inoculum on performance of anaerobic reactors for treating municipal solid waste. *Bioresource Technology* 94: 261-266.
- Solero, R., L. I. Romero, and D. Sales. 2001. Analysis of the methane production in thermophilic anaerobic reactors: use of autofluorescence microscopy. *Biotechnology Letters* 23: 1889-1892.
- Uzodinma, E. O. and A. U. Ofoefule. 2008. Effect of abattoir cow liquor waste on biogas yield of some agro-industrial wastes. *Scientific Research and Essays* 3(10): 473-476.
- Zhu, M., F. Lü, L. P. Hao, P. J. He, and L. M. Shao. 2009. Regulating the hydrolysis of organic wastes by micro-aeration and efficient recirculation. *Waste Management* 29: 2042-2050.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

El uso de carbón activado es una alternativa viable para la conservación de arqueobacterias anaerobias estrictas mediante liofilización.

El uso de inóculos a base de líquido ruminal fresco o de arqueobacterias metanogénicas incrementa la producción de CH<sub>4</sub> y biogás. Las arqueobacterias activadas en su medio de cultivo representan la mejor opción para incrementar la producción de CH<sub>4</sub> en biodigestores de cerdaza. El uso de la arqueobacteria liofilizada mejora la producción de CH<sub>4</sub> con respecto al testigo, sin embargo su efecto es menor al de la arqueobacteria activa y crecida en medio de cultivo.

La población bacteriana y de arqueobacterias incrementó al inocular con líquido ruminal o con la arqueobacteria activada en su medio de cultivo. Es necesario controlar externamente el potencial de óxido-reducción y pH para que permanezcan dentro de los intervalos óptimos y no se afecte la producción de CH<sub>4</sub>.