



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

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

CAMPUS MONTECILLO

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**AISLAMIENTO DE UNA ARQUEA METANOGENICA
Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL COMO
INÓCULO MICROBIANO EN LA PRODUCCIÓN DE
METANO EN BIODIGESTORES**

KARYM ROBERTO CURZAYNZ LEYVA

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

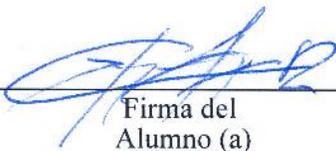
2018

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Karym Roberto Curzaynz Leyva, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Mario Antonio Cobos Peralta, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Aislamiento de una arquea metanogénica y evaluación de su potencial como inóculo microbiano en la producción de metano en biodigestores

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 30 de Noviembre de 2018


Firma del
Alumno (a)


Dr. Mario Antonio Cobos Peralta
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Aislamiento de una arquea metanogénica y evaluación de su potencial como inóculo microbiano en la producción de metano en biodigestores**, realizada por el alumno: **Karym Roberto Curzaynz Leyva** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

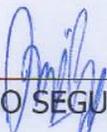
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR



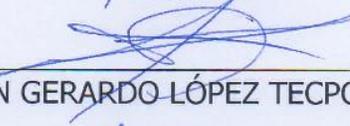
DR. SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ

ASESOR



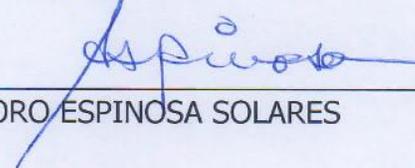
DR. JOSÉ RICARDO BÁRCENA GAMA

ASESOR



DR. ZENÓN GERARDO LÓPEZ TECPOYOTL

ASESOR



DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2018

AISLAMIENTO DE UNA ARQUEA METANOGÉNICA Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL COMO INÓCULO MICROBIANO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO EN BIODIGESTORES

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

Las arqueas metanógenas (AM) son esenciales en los sistemas biodigestores debido a que utilizan H_2 y CO_2 para la generación de energía metabólica y producen CH_4 . El aislamiento de AM es difícil, ya que requieren condiciones de anaerobiosis extremas. Se aislaron tres cepas de AM en un medio de cultivo selectivo anaerobio a base de fluido ruminal clarificado, formato de sodio, coenzima M, y minerales traza. El aislamiento de las AM fue confirmado con un equipo de infrarrojo cercano (LaserMethane mini2, Tokyo Gas Engineering, Japan) y microscopia de epifluorescencia. Se realizó la amplificación del ARNr 16S y se intentó la identificación genética molecular mediante el uso de cebadores universales para bacterias y algunas arqueas, pero no se tuvo éxito. Se produjo un inóculo experimental denominado consorcio de arqueas metanogénicas (CAM). Este inóculo se liofilizó y junto con otros dos inóculos de lodos de biodigestores (LB) y fluido ruminal (FR), se evaluó el potencial bioquímico de metano (PBM) de biorreactores alimentados con estiércol de vacas Holstein. Los tratamientos consistieron en agregar 1.5 mL de cada inóculo en la recarga de los biorreactores, T1=control (sin inóculo), T2= CAM, T3= LB y T4=FR. De acuerdo con el modelo de Gompertz modificado, el PBM fue similar ($p \geq 0.05$) entre tratamientos. Aunque el tratamiento CAM tuvo la menor producción de biogás, también tuvo la mayor proporción de metano (59.83%) y un mejor potencial óxido-reducción (-311.73 mV) que el tratamiento control.

Palabras clave: Metanogénicas, producción de CH_4 , digestión anaerobia, biogás, manejo de estiércol.

ISOLATION OF A METANOGENIC ARCHAEA AND EVALUATION OF ITS POTENTIAL AS A MICROBIAL INOCULUM IN THE METHANE PRODUCTION OF BIODIGESTERS

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Methanogenic archaea (MA) are essential in biodigester systems because they use H₂ and CO₂ for the generation of metabolic energy and produce CH₄. The isolation of MA is difficult, since they require extreme anaerobic conditions. Three strains of MA were isolated in an anaerobic selective culture medium based on clarified ruminal fluid, sodium formate, coenzyme M, and trace minerals. The isolation of the MA was confirmed with a near-infrared equipment (LaserMethane mini2, Tokyo Gas Engineering, Japan) and epifluorescence microscopy. The amplification of the 16S rRNA was carried out and molecular genetic identification was attempted through the use of universal primers for bacteria and some archaea, but it was not successful. An experimental inoculum called methanogenic archaea consortium (MAC) was produced. This inoculum was lyophilized and together with two other inoculants of biodigester sludge (LB) and ruminal fluid (FR), the biochemical potential of methane (PBM) of bioreactors fed with manure from Holstein cows was evaluated. The treatments consisted of adding 1.5 mL of each inoculum in the recharge of the bioreactors, T1 = control (without inoculum), T2 = MAC, T3 = LB and T4 = FR. According to the modified Gompertz model, the PBM was similar ($p \geq 0.05$) between treatments. Although the MAC treatment had the lowest biogas production, it also had the highest proportion of methane (59.83%) and a better oxide-reduction potential (-311.73 mV) than the control treatment.

Key words: Methanogens, CH₄ production, anaerobic digestion, biogas, manure management.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgarme la beca que coadyuvó a la conclusión de mis estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados** por aceptarme como alumno de su matrícula para realizar mis estudios de Doctorado.

Al **Dr. Mario Antonio Cobos Peralta** por ser mi consejero y director de tesis, transmitirme sus conocimientos y experiencias, por orientarme a ser un mejor profesional y creer en mis capacidades, por su amistad.

Al **Dr. José Ricardo Bárcena Gama** por su apoyo incondicional hacia mí, confiar en mis capacidades y orientarme en todo momento, por permitirme tener una de las mejores experiencias profesionales y de vida al ir al extranjero y por su valiosa amistad.

Al **Dr. Teodoro Espinosa Solares** por permitirme colaborar en su laboratorio y compartirme sus conocimientos, por orientarme en la realización de mis experimentos y estar atento en todo momento de mis avances, por su amistad.

A los miembros de mi consejo particular **Dr. Sergio Segundo González Muñoz y Dr. Zenón Gerardo López Tecpoyotl** por el tiempo destinado a la presente investigación, por sus atinadas aportaciones y sugerencias, por su amistad.

Al sinodal **Dr. David Hernández Sánchez** por su apoyo en mi salida al extranjero, por su orientación y sus atinadas sugerencias, por su valiosa amistad.

A mis amigos del laboratorio de microbiología ruminal **Sr. Agustín, Jorge, Rosario, Braulio, José Carlos, Felipe, Iván, Mayra, Paulino**, sin duda ustedes hicieron de mi estancia en el laboratorio una experiencia inolvidable, también a quienes, aunque momentos breves compartieron conmigo el laboratorio y su amistad **Leonardo, Martha, Jerónimo, Badillo, Eduardo, Palmira, Adrián, Ever, Sarai, Tere**, en el laboratorio de digestión anaeróbica de Chapingo a **Flor** por su amistad y colaboración en el análisis de resultados.

A todos los que me brindaron su amistad en Ganadería y Chapingo, académicos, personal administrativo y compañeros.

SINCERAMENTE

Karym Roberto Curzaynz Leyva

DEDICATORIA

Dedico la conclusión de esta meta:

A mi padre Roberto Curzaynz, mi tía Semy, mi tío Rudy, mi abuela Mirnon, mi tía Meya, a mi primo Anibalín que a pesar de que no estar físicamente, cada día su recuerdo es un impulso constante para recordarme de dónde vengo y hacia donde voy, con la humildad y entereza que me mostraron.

A mi madre Rocío Leyva que ha sacrificado mucho para apoyarme y alentarme a cumplir con ésta meta, por estar siempre conmigo a pesar de todo lo que hemos vivido y sepa que jamás la voy a decepcionar.

A Emma Santillán por alentarme y apoyarme a cumplir ésta meta y que a pesar de los altibajos tengamos a los dos más grandes motores que Dios nos mandó para cuidar y guiar, mis adorados hijos **Yulitza y Jedrek**, que cada día me recuerdan que debemos de soñar y que son mi mayor ¿Por qué?

A mi hermano Barush por estar conmigo en cualquier momento.

A mi familia, tías, tíos, primas, primos porque la unión que se tiene me fortalece cada día y hace sentirme orgulloso de tenerlos.

“Soñar es fundamental para generar acciones que puedan llevarte a lograrlo, y creer que todo sueño se puede hacer realidad, cuando tu ¿por qué? es lo suficientemente grande”

SINCERAMENTE

KARYM ROBERTO CURZAYNZ LEYVA

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. JUSTIFICACIÓN	1
3. OBJETIVOS	2
a. Objetivo general	2
b. Objetivos específicos	2
4. HIPÓTESIS	2
5. REVISIÓN DE LITERATURA	3
5.1. Cambio climático y ganadería	3
5.2. Fuentes de emisión de gases efecto invernadero (GEI) en ganadería.....	3
5.2.1. Emisión entérica de metano.....	3
5.2.2. Manejo de estiércol.....	6
5.3. Biodigestores	6
5.3.1. Biogás	7
5.3.2. Procesos de la digestión anaeróbica	8
5.3.3. Microorganismos involucrados	10
5.3.4. Arqueobacterias metanogénicas en biodigestores	13
5.3.5. Factores que afectan la eficiencia de producción de biogás.....	14

5.4.	Desarrollo de inóculos microbianos	15
5.5.	Técnicas <i>in vitro</i> para la medición de biogás.....	16
	Literatura citada.....	18
CAPÍTULO I. USO DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE INFRARROJO PARA LA DETECCIÓN DE METANO EN DOS MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS PARA ARQUEAS METANOGENAS		
25		
1.1	RESUMEN	25
1.2	ABSTRACT	26
1.3	INTRODUCCIÓN.....	27
1.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1.4.1	Tratamientos y medios de cultivo selectivo	28
1.4.2	Inóculo.....	29
1.4.3	Establecimiento del experimento	30
1.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
1.6	CONCLUSIONES.....	32
	Literatura citada.....	32
CAPÍTULO II. AISLAMIENTO DE ARQUEA METANOGENICA DE BIODIGESTORES ALIMENTADOS CON ESTIÉRCOL DE VACA HOLSTEIN		
34		
2.1	RESUMEN	34
2.2	ABSTRACT	35
2.3	INTRODUCCIÓN.....	36
2.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.4.1	Medios de cultivo selectivo.....	37
2.4.2	Inóculo.....	38
2.4.3	Medios líquidos y transferencias.....	38
2.4.4	Medios sólidos para selección de colonias.....	38

2.4.5	Determinaciones y criterios de selección para las cepas durante el aislamiento de la arquea metanogénica	40
2.4.6	Extracción de ADN	41
2.4.7	Amplificación por PCR del gen ADNr 16S	41
2.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
2.6	CONCLUSIONES	47
	Literatura citada	47
CAPÍTULO III. EFECTO DE DISTINTAS FUENTES DE INÓCULO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO <i>IN VITRO</i> DE ESTIÉRCOL DE VACAS HOLSTEIN		49
3.1	RESUMEN	49
3.2	ABSTRACT	50
3.3	INTRODUCCIÓN	51
3.4	MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.4.1	Fuentes de inóculos	52
3.4.1.1	Consortio de arqueas metanogénicas (CAM)	52
3.4.1.2	Lodos de biodigestores (LB)	53
3.4.1.3	Fluido ruminal (FR)	54
3.4.2	Procedimiento experimental	54
3.4.3	Métodos analíticos	55
3.4.4	Modelo y análisis estadístico	56
3.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.6	CONCLUSIONES	61
	Literatura citada	61
CAPÍTULO IV. EFECTO DE DISTINTAS DOSIS DE ARQUEAS METANOGÉNICAS EN LA PRODUCCIÓN DE METANO <i>IN VITRO</i> DE ESTIÉRCOL DE VACAS HOLSTEIN		64

4.1	RESUMEN	64
4.2	ABSTRACT	65
4.3	INTRODUCCIÓN.....	66
4.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
4.4.1	Inóculo de consorcio de arqueas metanogénicas (CAM).....	67
4.4.2	Procedimiento experimental.....	68
4.4.3	Métodos analíticos.....	70
4.4.4	Modelo y análisis estadístico.....	70
4.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
4.6	CONCLUSIONES.....	74
	Literatura citada.....	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición del biogás producido en la fermentación ruminal, en biodigestores y en rellenos sanitarios	7
Cuadro 2. Sustratos convertidos a metano por arqueas metanogénicas	10
Cuadro 3. Número de secuencias y porcentaje de las procariotas, bacteria y arquea en biodigestores con estiércol en codigestión	12
Cuadro 4. Características fisicoquímicas y diversidad de arqueas en biodigestores alimentados en codigestión con diferentes sustratos	14
Cuadro 5. Porcentaje típico de metano para diferentes materias primas.....	15
Cuadro 6. Medios de cultivo selectivos para arqueas metanogénicas.....	28
Cuadro 7. Características físico-químicas del biodigestor con capacidad de 1000 L y 700 L de volumen de trabajo de la unidad experimental	29
Cuadro 8. Porcentaje de CH ₄ en el biogás a las 24, 48 y 72 h de incubación, pH, ORP y concentración de arqueas metanogénicas en los tratamientos.....	31
Cuadro 9. Producción de CH ₄ y la detección por espectroscopia de absorción de infrarrojos en los tratamientos en mL y ppm.	32
Cuadro 10. Medio de cultivo selectivo para aislamiento de arqueobacteria metanogénica .	37
Cuadro 11. Detección de CH ₄ en la primera transferencia por espectroscopia de absorción de infrarrojos y número de arqueas metanogénicas	42
Cuadro 12. Detección de CH ₄ en la segunda transferencia por espectroscopia de absorción de infrarrojos y número de arqueas metanogénicas.....	43
Cuadro 13. Detección de CH ₄ en la tercera transferencia por espectroscopia de absorción de infrarrojos y número de arqueas metanogénicas	44
Cuadro 14. Características físico-químicas del biodigestor con capacidad de 1000 L y 700 L de volumen de trabajo de la unidad experimental	53
Cuadro 15. Características físico-químicas iniciales de los biorreactores de cada tratamiento, inóculos y sustrato.	55
Cuadro 16. Parámetros del modelo Gompertz modificado determinado de los datos experimentales.....	59
Cuadro 17. Producción de biogás, metano y variables físico químicas finales de los biorreactores	60

Cuadro 18. Características físico-químicas del biodigestor con capacidad de 1000 L y 700 L de volumen de trabajo de la unidad experimental	68
Cuadro 19. Características físico-químicas iniciales de los biorreactores de cada tratamiento, inóculos y sustrato.	69
Cuadro 20. Parámetros del modelo Gompertz modificado de los datos experimentales	72
Cuadro 21. Producción de biogás, metano y variables físico químicas finales de los biorreactores	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas metabólicas que sigue la materia orgánica durante el proceso de digestión anaeróbica (Hagos <i>et al.</i> , 2017).....	8
Figura 2. Composición taxonómica de la comunidad bacteriana a nivel de filum de cada muestra extraída en diferentes días de incubación para pirosecuenciación. (He <i>et al.</i> , 2018).	11
Figura 3. Composición taxonómica de los metanógenos a nivel de género analizados por pirosecuenciación (He <i>et al.</i> , 2018).....	12
Figura 4. Composición taxonómica de metanógenos (<i>mcrA</i>) y arqueas (16S) en biodigestores alimentados con aguas residuales (Wilkins <i>et al.</i> , 2015).....	13
Figura 5. Sistema de fermentación con captura de gas.....	17
Figura 6. Medio anaerobio sólido horizontal (siembra de colonias seleccionadas).	39
Figura 7. Siembra de medios de cultivo sólidos anaeróbicos en campana de flujo laminar	39
Figura 8. Siembra por estría a diferente profundidad (a las 72 h de incubación).....	40
Figura 9. Cadenas de cocobacilos con fluorescencia de la cepa Alg	45
Figura 10. células de la cepa Op vistas en contraste de fases, arreglo en sarcina.	45
Figura 11. Cepa Lech observada al microscopio de contraste de fases.....	46
Figura 12. Rendimiento de metano acumulado y ácidos grasos volátiles durante el experimento.	58
Figura 13. Rendimiento de metano acumulado en los tratamientos.....	71

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El manejo del estiércol representa el 17% de las emisiones de gases efecto invernadero (GEI) dentro del sector agropecuario y es el segundo factor de importancia después de la fermentación entérica del ganado (Villalobos *et al.*, 2015). Una tecnología para disminuir las emisiones de GEI en el sector ganadero es la implementación de biodigestores para el manejo de las excretas animales (SAGARPA, 2009).

Los biodigestores son sistemas que contienen sustratos orgánicos (p. ej. excretas animales, desperdicio de verduras y alimentos) diluidos en agua y microorganismos anaerobios estrictos o facultativos. Los microorganismos realizan una digestión anaerobia degradando la materia orgánica y produciendo biogás. El biogás es una fuente alterna de energía que sustituye a las convencionales (Shi *et al.*, 2011). Además, se pueden obtener dos productos, el biogás y un efluente que sirve como fertilizante (Gilroyed *et al.*, 2010).

La producción de biogás se puede incrementar con el uso de inóculos, aditivos, y cambios operacionales como la temperatura y el tamaño de la partícula del sustrato en los biodigestores (Martins das Neves *et al.*, 2009). El uso de diferentes microorganismos para mejorar la eficiencia de los biodigestores se evaluó con diferentes fuentes de microorganismos celulolíticos, fluido ruminal, lodos de biodigestores o cepas de arqueas metanogénicas (Alrawi *et al.*, 2011; Lins *et al.*, 2014; Ozbayram *et al.*, 2018).

Fielding *et al.* (1988), describen una metodología para obtener cultivos puros de microorganismos usando medios de cultivo selectivos y una serie de transferencias para reducir la variedad de microorganismos presentes.

2. JUSTIFICACIÓN

Las excretas animales representan la segunda fuente de emisiones de GEI, la práctica más común es tirarlas directo en los campos de cultivo previo a la siembra. Cuando se tiran en el campo de cultivo, durante el riego o una lluvia intensa, pueden darse las condiciones para que se degrade la materia orgánica que contienen y liberar GEI a la atmósfera. Los biodigestores resuelven gran parte este problema, debido a que la digestión de la materia orgánica es controlada dentro de los contenedores y a que se almacena el biogás, que se compone principalmente de CH₄ y CO₂. Los biodigestores, debido a la naturaleza de la digestión anaeróbica pueden ser ineficientes y producir más CO₂ que CH₄, siendo éste último

de mayor importancia debido a que se puede utilizar directamente como energía calórica o como fuente de energía para motores de combustión y producir electricidad. Las arqueas metanogénicas al ser las responsables de producir el CH₄ son motivo de estudio para mejorar la eficiencia de la digestión anaeróbica y producir más CH₄ en el biogás.

3. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Aislar una arquea metanogénica a partir de lodos de un biodigestor con estiércol de vaca Holstein como sustrato y medir su capacidad como inóculo para aumentar la producción de metano en biodigestores.

b. Objetivos específicos

- a. Estandarizar la detección y determinación de metano en medios de cultivo selectivo para arqueas metanogénicas.
- b. Aislar una arquea metanogénica en medios de cultivo selectivo utilizando formato de sodio, coenzima M y minerales traza como principales nutrientes y factores de crecimiento.
- c. Evaluar la técnica de producción de gas *in vitro* por desplazamiento de fluidos con el uso de trampas de solución salina saturada con biorreactores con estiércol de vaca Holstein.
- d. Determinar si el inóculo de arqueas metanogénicas aumenta la producción de metano de biorreactores en comparación con el fluido ruminal y lodos de biodigestores.
- e. Evaluar la cantidad de inóculo de arqueas metanogénicas que aumente la producción de metano en biorreactores con estiércol de vaca Holstein.

4. HIPÓTESIS

- ❖ Las arqueas metanogénicas se pueden aislar en medio de cultivo selectivo utilizando formato de sodio, coenzima M y minerales traza como principales nutrientes y factores de crecimiento, y la producción de metano se puede detectar por espectroscopia de absorción de infrarrojos dentro de los tubos de cultivo.
- ❖ Las arqueas metanogénicas aumentan la producción de biogás y la proporción de metano del biogás en biorreactores alimentados con estiércol de vacas Holstein.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Cambio climático y ganadería

Las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero han aumentado desde la era preindustrial y se han alcanzado concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono, metano y óxido nitroso sin precedentes (IPCC, 2014).

El sector ganadero incide de manera importante, con emisiones estimadas en 7.1 giga toneladas de dióxido de carbono equivalente por año, lo cual representa el 14.5% de las emisiones antropogénicas (Gerber *et al.*, 2013).

5.2. Fuentes de emisión de gases efecto invernadero (GEI) en ganadería

El metano producido de las actividades agropecuarias se origina de la fermentación anaeróbica de la materia orgánica en procesos biológicos de diversos sistemas, tales como el cultivo de arroz inundado, la fermentación entérica de los animales y la descomposición de las heces en los campos de cultivo, así como, la descomposición de los desechos municipales (Gerber *et al.*, 2013).

El potencial de calentamiento del metano es 21 veces mayor al del CO₂ y se estima que el tiempo de residencia de este gas en la atmosfera es de 12 años. En el Inventario Nacional de Emisiones de Gases con Efecto Invernadero del año 2013, se menciona que el estiércol depositado en las praderas fue responsable del 16% de las emisiones de GEI, mientras que, la gestión (manejo) del estiércol representó el 7%. En contraste, en América Latina el estiércol depositado en las praderas fue responsable del 25 % y la gestión del estiércol representó el 3 % de las emisiones de GEI (Villalobos *et al.*, 2015).

5.2.1. Emisión entérica de metano

La emisión de metano entérico depende de las estrategias de alimentación del ganado, así como, del manejo que se implemente en las explotaciones ganaderas. Las investigaciones que involucran las interacciones entre el ganado, las plantas, la microbiota ruminal y estrategias alimenticias con distintos ingredientes, son difíciles de conjugar, pero pueden ofrecer una solución para la disminución de emisiones de metano de los rumiantes (Broucek, 2018).

Dentro de las estrategias de mitigación de metano que se han investigado están:

- a. Inhibidores y análogos del metano. - Son componentes químicos que inhiben la actividad de las arqueas metanogénicas del rumen, puede ser por la presencia o ausencia de sustratos necesarios en la metanogénesis (Bauchop, 1967; Hristov *et al.*, 2015). Se ha experimentado con la inclusión de cloroformo (Thiel, 1969), bromoclorometano, alfa-ciclodextrina, bromometanosulfonato componente análogo de la coenzima M (Van Nevel, 1996). Sin embargo, su efecto es transitorio, a pesar de que los inhibidores pueden reducir la producción de metano los microorganismos ruminales se adaptan rápidamente y pueden neutralizar efecto de estos compuestos (Mathison *et al.*, 1998).
- b. Probióticos. - Son aditivos microbianos a base de microorganismos vivos con influencia en la fermentación ruminal y pueden mejorar la salud animal, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus sporogenes* (Patel *et al.*, 2015). Lila *et al.* (2004) encontraron que la adición de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae*, disminuyó la producción de lactato y de metano de un consorcio de microbiano. Una explicación a la disminución de metano por el uso de levaduras, es por la disminución del número de protozoarios ciliados (Newbold *et al.*, 1996).
- c. Saponinas. - Son glucósidos con características espumosas, que tienen efecto directo sobre los microorganismos ruminales, se han clasificado por sus esqueletos de carbono en 11 clases de saponinas: dammaranes, tirucallanes, lupanes, hopanes, oleananes, taraxasteranes, ursanes, cycloartanes, lanostanes, cucurbitanes y esteroides (Vincken *et al.*, 2007). Las saponinas disminuyen la degradación de proteína y favorecen la síntesis de biomasa y proteína microbiana, dos procesos que resultan en la reducción de H₂ disponible y producción de CH₄ (Martin *et al.*, 2010).
- d. Taninos. - Son metabolitos secundarios polifenólicos de plantas superiores, solubles en agua con una masa molar entre 300 y 3000, que muestran las reacciones de fenol habituales y la precipitación de alcaloides, gelatinas y otras proteínas (Khanbabaee y Ree, 2001). Sejian y K. Naqvi (2012), demostraron que *Bergenia crassiflora*, *Embllica officinalis*, *Peltiphylum peltatum*, *Populus deltoids*, *Quercus incana*, *Rheum undulatum*, *Terminalia belerica*, *Terminalia Chebula* y *Vaccinium vitis-idaea* tienen niveles altos de taninos y el potencial de inhibir, tanto *in vitro* como *in vivo*, la emisión de metano por los microorganismos ruminales. Los taninos condensados son los que

se considera que pueden disminuir las emisiones de metano, ya que los taninos hidrolizados pueden ser tóxicos para el animal (Field *et al.*, 1989).

- e. Ionóforos. - La monensina y lasolacida son los ionóforos más investigados por su capacidad de reducir la producción de metano en rumiantes (Broucek, 2018). Los ionóforos modulan la entrada al citoplasma de cationes como el sodio, potasio y calcio, además reducen la producción de acetato, que puede ser usado como sustrato de la metanogénesis (Sejian y K. Naqvi, 2012). Otras investigaciones reportan que la disminución en la producción de metano ruminal se debe a que los ionóforos disminuyen la población de protozoarios ciliados (Iqbal *et al.*, 2008). Los ionóforos afectan la población microbiana ruminal, promoviendo el crecimiento de bacterias Gram negativas y una fermentación propionica (Callaway *et al.*, 2010), lo que se asocia con la reducción en la metanogénesis (Iqbal *et al.*, 2008; Sejian y Naqvi, 2012).
- f. Ácidos orgánicos. - Los ácidos: malato, fumarato y acrilato han mostrado efectividad para disminuir emisiones de metano *in vitro* (Martin *et al.*, 2010). Los ácidos orgánicos dicarboxílicos (malato y fumarato) son precursores del propionato, lo que estimula la utilización de H₂ (Song *et al.*, 2011) y en consecuencia disminuyen la producción de metano por la falta de este sustrato.
- g. Lípidos. – En general, causan disminución en las emisiones de metano debido a la inhibición de los protozoarios, reducción de actividad metanogénica y por mejorar la producción de propionato (Hristov *et al.*, 2013). Moate *et al.* (2011), encontraron que un aumento de 10g Kg⁻¹ de MS de grasa en la dieta, disminuye la concentración de metano entérico 3.5% o 0.79 g CH₄ Kg⁻¹ MS. En ganado de carne un incremento de 10 g Kg⁻¹ de grasa en la dieta, disminuye la producción de metano 1 g kg⁻¹ MS, pero en ovinos la disminución fue de 2.6g kg⁻¹ MS (Grainger y Beauchemin, 2011).
- h. Aceites esenciales. - Los aceites esenciales (AE) son metabolitos secundarios con efecto antimicrobianos de las plantas, afectan tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, propiedad que se le ha atribuido a la presencia de terpenoides y compuestos fenólicos (Meale *et al.*, 2014). Los compuestos orgánicos de azufre de algunos AE, son capaces de afectar la fermentación del rumen y disminuir la producción de metano *in vitro* (McAllister y Newbold, 2008).

5.2.2. Manejo de estiércol

El propósito de las normas asociadas con el manejo de estiércol generado por las explotaciones ganaderas, es disminuir el impacto negativo en el ambiente. México tiene leyes, reglamentos y normas que regulan los impactos ambientales generados por diversos sectores incluido el primario con las explotaciones ganaderas. Las agencias que se encargan de dicha regulación son el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agropecuaria y Alimentaria (SENASICA) en la SAGARPA y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en la Secretaría de Salud (Acevedo *et al.*, 2017)

En América Latina la falta de programas para el manejo de las excretas animales hace que el porcentaje de emisiones de GEI sea mayor (25%) al promedio mundial (16%), por tanto, se tienen que implementar tecnologías que permitan disminuir las emisiones de GEI, como lo sería la implementación de biodigestores (Villalobos *et al.*, 2015).

Las emisiones de CH₄ en condiciones anaeróbicas del estiércol se pueden calcular en base al contenido de sólidos volátiles que contengan y el factor de conversión de CH₄. El contenido de sólidos volátiles del estiércol depende de la alimentación del ganado y la digestibilidad de la dieta (Liu y Liu, 2018).

5.3. Biodigestores

Los biodigestores son un sistema de digestión anaeróbica que pueden implementarse con altos costos iniciales o alternativamente modelos con un costo menor. La selección del sistema digestor, dependerá del sistema de producción animal donde se implemente y la eficiencia o uso que se le va a dar al biogás producido (Weber *et al.*, 2012).

Los biodigestores pueden tener un costo inicial elevado cuando tienen sistemas de mezclado automático, monitoreo de temperatura y termostatos para mantener temperaturas constantes dentro del biodigestor, sin embargo, existen modelos de bajo costo que se pueden implementar con materiales regionales, plástico, PVC o tinacos de agua convencionales (Martí-Herrero y Cipriano, 2012).

Se consideran dos sistemas de digestión anaeróbica, un sistema abierto o continuo en el cual la entrada de materia orgánica al sistema coincide con la salida de efluentes de la materia

digerida, y un sistema cerrado o por lotes, en el cual, el que la materia orgánica que ingresa al biodigestor permanece durante el intervalo de tiempo determinado (Himmelblau, 1997).

Los biodigestores en lote se caracterizan por un tanque que contiene el sustrato, sin flujo de materia en la entrada o salida durante todo el proceso de digestión. Los biodigestores continuos o discontinuos se caracterizan por tener un flujo de materia a la entrada y salida durante el proceso de digestión, éste manejo hace más constante y eficiente la producción de biogás (Weber *et al.*, 2012).

5.3.1. Biogás

Biogás es el término designado para la mezcla de gases resultantes de la descomposición de la materia orgánica realizada por acción bacteriana en condiciones anaerobias. Su composición depende del tipo de proceso y la naturaleza de la materia orgánica fermentada, además del contenido de metano (CH₄) (Cepero *et al.*, 2012). La composición del biogás depende también del sitio donde se lleve a cabo la degradación de la materia orgánica como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición del biogás producido en la fermentación ruminal, en biodigestores y en rellenos sanitarios

Gas	Rumen (%)	Biodigestores (%)	Relleno sanitario (%)
CH ₄	22-29	40-80	54
CO ₂	65-69	20-60	42
H ₂	0.18	0-3	-
N ₂	3-10	1-5	3.1
O ₂	0.5-1	Trazas	0.8
H ₂ S	0.01-0.1	0.01-5	0.006

Fuente: (Bayané y Guiot, 2011)

El potencial energético de 1 m³ de CH₄ puro es similar al generado por 1.1 L de gasolina, 1.7 L de bio-etanol o 0.93 m³ de gas natural; sin embargo, se considera que el biogás contiene sólo 40 a 70 % de CH₄, por tanto, es necesario purificarlo para obtener los rendimientos de gas de metano puro (Martins das Neves *et al.*, 2009).

5.3.2. Procesos de la digestión anaeróbica

Hay tres fases durante el proceso de digestión anaerobia que son determinados por los eventos microbianos que se dan hasta la síntesis de metano. Las fases son: hidrólisis, formación de ácidos y metanogénesis (Gerardi, 2003). En la Figura 1 se muestran las rutas que toma la materia orgánica durante el proceso de digestión anaeróbica.

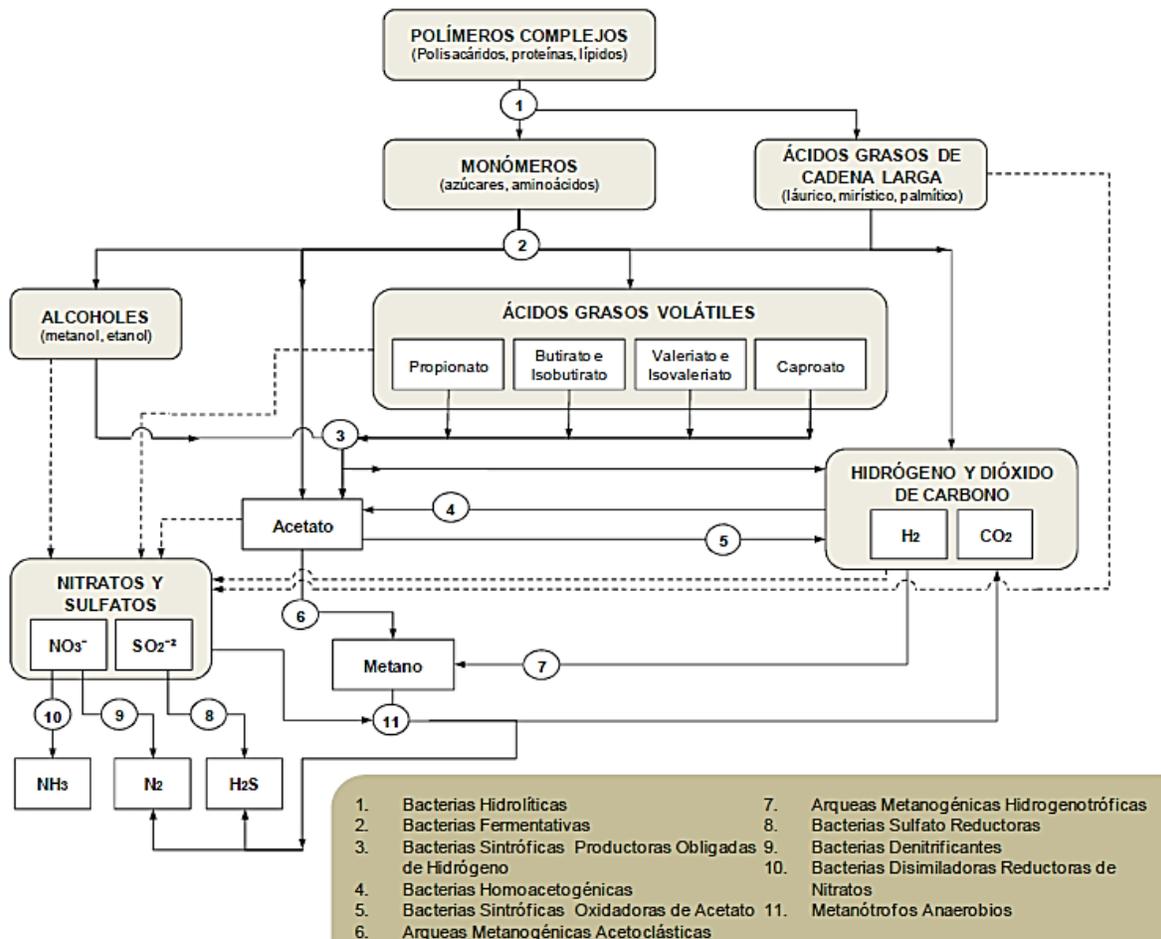


Figura 1. Rutas metabólicas que sigue la materia orgánica durante el proceso de digestión anaeróbica (Hagos *et al.*, 2017)

HIDRÓLISIS. En la digestión anaerobia, los compuestos insolubles, tales como carbohidratos, proteínas, grasas y residuos coloidales sufren hidrólisis. Estos compuestos se encuentran en forma de polímeros complejos, es decir moléculas grandes insolubles unidas por enlaces químicos (Gerardi, 2003). Sin embargo, las moléculas pequeñas al ser solubles entran en solución una vez que las bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas rompen los enlaces químicos. Una vez que están disponibles las moléculas más pequeñas (p.

ej. la glucosa) pueden entrar a la célula bacteriana y se metabolizan por la vía de Embden-Meyerhof (glucólisis) hasta piruvato y posteriormente en diferentes productos de fermentación como acético, propiónico y butírico (Madigan *et al.*, 2014).

FORMACIÓN DE ÁCIDOS En esta fase, los compuestos solubles producidos en la hidrólisis o los ya contenidos en la mezcla de los biodigestores son degradados por una extensa diversidad de microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios, por diferentes procesos fermentativos (Gerardi, 2003). Los carbohidratos funcionan en las bacterias para la conservación de la energía, respiración y los sistemas de membrana, transportadores de electrones, respiración y fuerza motriz de protones. Las proteínas en cambio son utilizadas por los microorganismos para su crecimiento (Madigan *et al.*, 2014).

Los productos de la fermentación son CO₂, gas H₂, alcoholes, ácidos orgánicos, algunos componentes nitrogenados y sulfúricos. En los biodigestores, el acetato es el principal ácido graso volátil usado como sustrato por las arqueas metanogénicas para la formación de CH₄. Sin embargo, algunos ácidos orgánicos, alcoholes y componentes orgánicos nitrogenados tales como el formato, metanol y metilamina, también son usados como sustrato para la formación de CH₄ (Gerardi, 2003).

METANOGENESIS Esta es la fase donde se forma el CH₄ a partir del gas H₂ (hidrogenotrofos), acetato (acetoclásticos) o metanol (metilotrofos) y CO₂. También se puede formar metano a partir de formato o metilaminas (Gerardi, 2003).

En cultivos puros, los metanógenos pueden convertir once sustratos distintos a metano (Cuadro 2). Es interesante destacar que ninguno es tan habitual como la glucosa, los ácidos grasos o los ácidos orgánicos (aparte del acetato y piruvato). En la fermentación de la glucosa se produce metano, mediante la cooperación entre metanógenos y bacterias anaerobias, por tanto, con una mezcla adecuada de microorganismos, cualquier compuesto orgánico puede ser convertido a CH₄ y CO₂ (Madigan *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Sustratos convertidos a metano por arqueas metanogénicas

Sustratos tipo CO ₂	Sustratos metilo	Sustratos acetotróficos
Dióxido de carbono, CO ₂ (con electrones derivados de H ₂ , algunos alcoholes o piruvato)	Metanol, CH ₃ OH	
	Metilamina, CH ₃ NH ₃ ⁺	
	Dimetilamina, (CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	Acetato, CH ₃ COO ⁻
	Trimetilamina, (CH ₃) ₃ NH ⁺	Piruvato, CH ₃ COCOO ⁻
	Metilmercaptano, CH ₃ SH	
Formiato, HCOO ⁻		
Monóxido de carbono, CO	Dimetilsulfuro, (CH ₃) ₂ S	

Fuente: (Madigan *et al.*, 2014)

Durante el proceso de fermentación los gases generados representan, en promedio, el 7% del volumen total del material ingresado al biodigestor, mientras que, el efluente contiene minerales (N, P, K) y se puede usar como fertilizante foliar. El efluente se considera un valioso abono orgánico libre de olores, de patógenos y de fácil aplicación (Cepero *et al.*, 2012).

5.3.3. Microorganismos involucrados

El proceso de digestión anaerobia lo llevan a cabo una comunidad de microorganismos que regulan el proceso de fermentación y convierten la materia orgánica en una mezcla de CO₂ y CH₄. Entre los principales factores que afectan a esta comunidad microbiana esta la frecuencia de alimentación del biodigestor, con efectos medibles en la cantidad y proporción de ácidos grasos volátiles producidos en los biodigestores (Piao *et al.*, 2018).

El desarrollo de las técnicas de biología molecular, como la pirosecuenciación permite alcanzar un mayor número de secuencias génicas, lo que puede revelar la diversidad de una comunidad microbiana (Lee *et al.*, 2012), esta herramienta ha sido de gran utilidad para dilucidar la composición del microbioma involucrado en diferentes procesos de la fermentación de la materia orgánica ingresada al biodigestor.

La frecuencia de alimentación de los biodigestores afecta la comunidad microbiana, cuando se usa glucosa como sustrato, predominan bacterias de los phylum Bacteroidetes, Actinobacteria, Spirochaetes, Proteobacteria, y arqueas de los géneros *Methanosaeta*,

Methanomassillicoccus, *Methanoculleus*, *Methanobacterium* y *Methanosarcina* (Piao *et al.*, 2018). Mientras que, la comunidad bacteriana de un biodigestor alimentado con desperdicio de aceite de cocina se modifica a través del tiempo (Fig. 2), lo que se refleja en un aumento de los Firmicutes y una disminución de microorganismos del phylum Synergistetes.

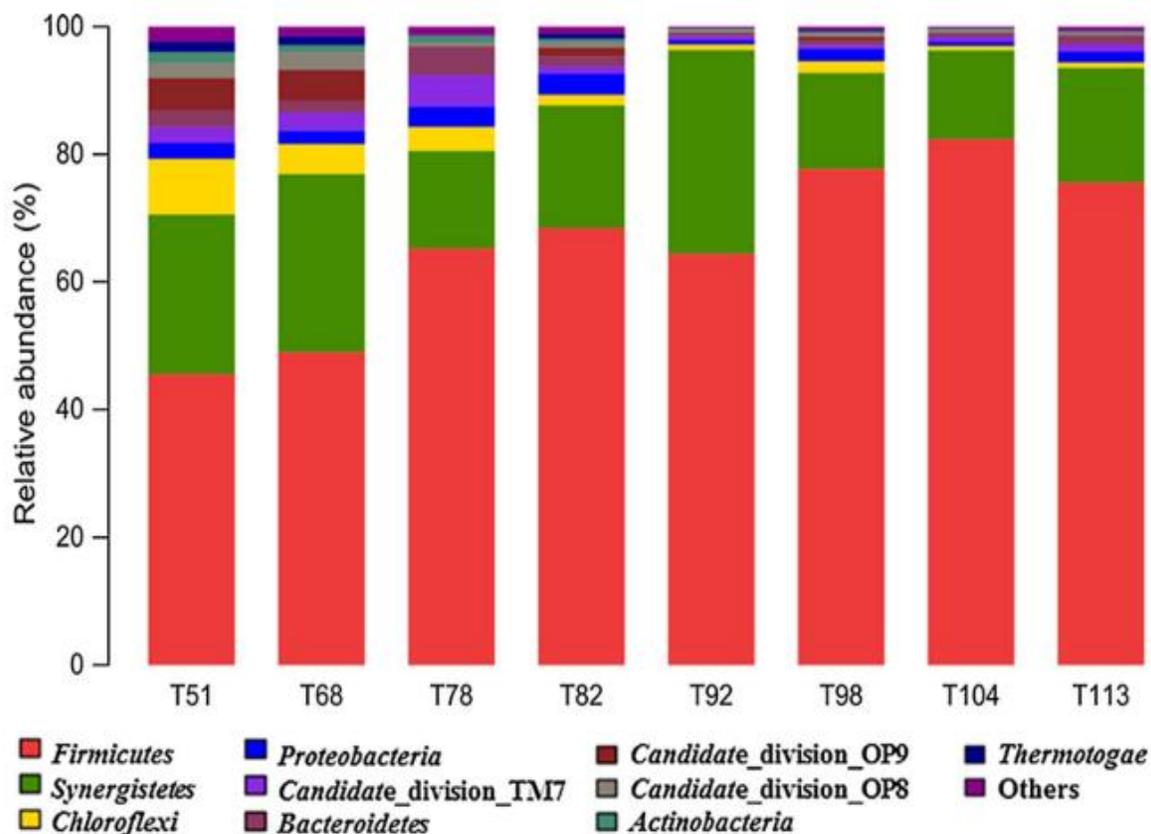


Figura 2. Composición taxonómica de la comunidad bacteriana a nivel de filum de cada muestra extraída en diferentes días de incubación para pirosecuenciación. (He *et al.*, 2018).

Los géneros de arqueas también se modifica a través del tiempo, como se muestra en la Figura 3. *Methanosaeta* predomina a través del tiempo. Sin embargo, hay algunos cambios notorios; en el día 98 disminuye el género *Methanosaeta* y aumenta la población de *Methanoculleus* y en el día 104 disminuye por segunda ocasión, con un aumento de la población de *Methanosarcina*. Todavía no hay una explicación clara para este fenómeno poblacional.

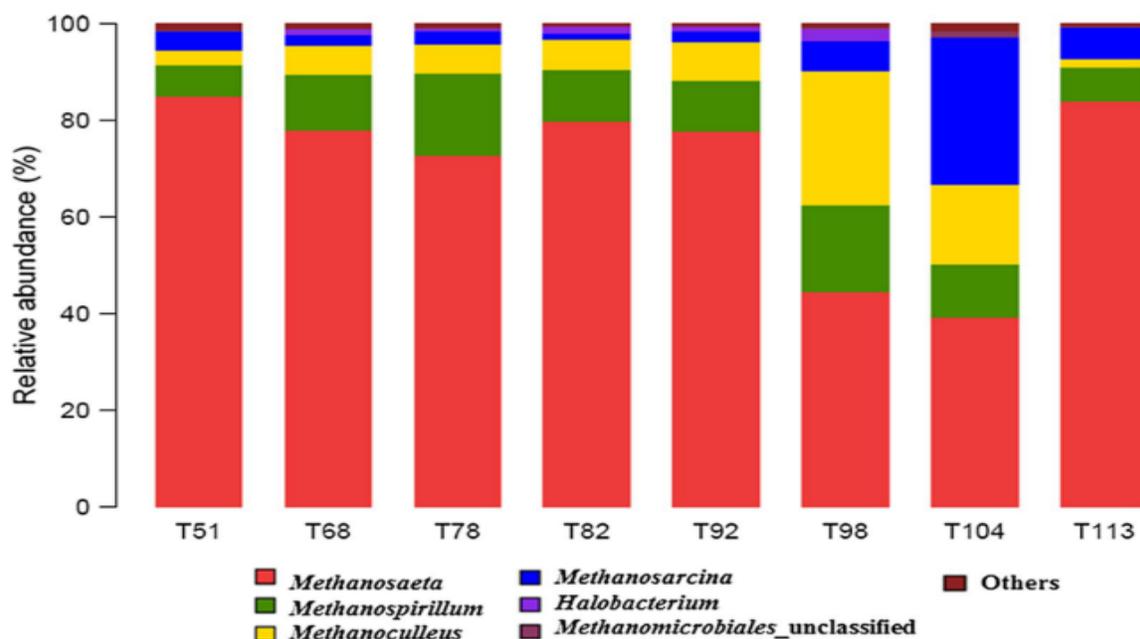


Figura 3. Composición taxonómica de los metanógenos a nivel de género analizados por pirosecuenciación (He *et al.*, 2018)

En un estudio para determinar su composición taxonómica de 21 biodigestores, se determinó que los lodos de aguas residuales generan un mayor porcentaje de metanógenos que las codigestiones de estiércol con otros sustratos. Aunque, en promedio se encontró un 4% de secuencias del dominio Archaea. En el Cuadro 3 se muestra el número de secuencias detectadas del dominio Bacteria y Archaea en los biodigestores alimentados con estiércol de ganado lechero en codigestión con otros sustratos (Sundberg *et al.*, 2013).

Cuadro 3. Número de secuencias y porcentaje de las procariotas, bacteria y arquea en biodigestores con estiércol en codigestión

Biodigestor	Secuencias		%	
	Bacteria	Arquea	Bacteria	Arquea
RR:Est:Tri	5351	51	99	1
RR:EstV:EstP:BO	3571	261	93	7
RR:EstV:EstP:BO2	3415	89	98	2
EstV:EstP:RR/BO	3190	17	99	1
EstV:EstP:RR/BO2	4820	48	99	1

RR=Residuos de rastro; EstV=Estiércol; EstP=Estiércol de puerco; Tri=Trigo; BO= Basura orgánica. Fuente: (Sundberg *et al.*, 2013)

5.3.4. *Arqueobacterias metanogénicas en biodigestores*

Las arqueas metanogénicas, son microorganismos anaerobios estrictos que producen CH₄ a partir de un limitado número de sustratos que incluyen CO₂, H₂ y acetato. (Wilkins *et al.*, 2015). La comunidad de metanógenos cambia de acuerdo al sustrato que ingresa a los biodigestores. Cuando se usa estiércol de ganado lechero, domina el orden Methanosarcinales y el género *Methanosaeta*; mientras que, con estiércol de cerdo domina el orden Methanomicrobiales y el género *Methanoculleus* (Xia *et al.*, 2012). Existen diversas investigaciones para caracterizar las comunidades metanógenas presentes en biodigestores; sin embargo, se debe tener cuidado con la interpretación de los resultados, ya que pueden ser muy diferentes, dependiendo del gen usado para la secuenciación. Por ejemplo, Wilkins *et al.* (2015) realizaron un análisis de pirosecuenciación en 4 biodigestores alimentados con aguas residuales de Hong Kong y China, sus resultados demuestran que cuando se compara el gen *mcrA* o el gen 16S ARN, la abundancia de las comunidades de arqueas metanógenas tiene un perfil taxonómico diferente (Figura 4).

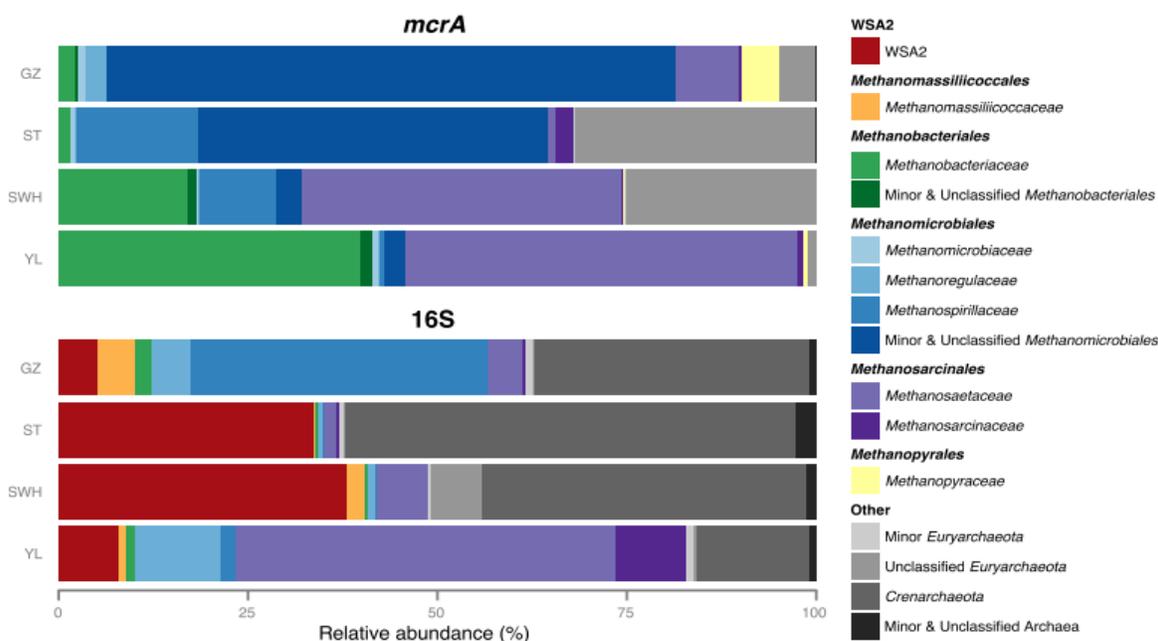


Figura 4. Composición taxonómica de metanógenos (*mcrA*) y arqueas (16S) en biodigestores alimentados con aguas residuales (Wilkins *et al.*, 2015).

Durante el muestreo de 21 biodigestores (Sundberg *et al.*, 2013) reportan diferencias significativas en la comunidad microbiana y en especial en los metanógenos, en el Cuadro 4

se muestran las características y diversidad microbiana de los biodigestores alimentados estiércol de ganado lechero (EstV) más otros sustratos.

Cuadro 4. Características fisicoquímicas y diversidad de arqueas en biodigestores alimentados en codigestión con diferentes sustratos

Biodigestor	Tiempo de retención (d)	AGV (mg L ⁻¹)	pH	Secuencias	Fílum	Clases	Géneros
RR:Est:Tri	20	5900	8.1	51	1	1	1
RR:EstV:EstP:BO	25	6700	7.8	261	1	2	3
RR:EstV:EstP:BO2	25	7300	7.8	89	1	2	2
EstV:EstP:RR/BO	29	3700	7.7	17	1	2	2
EstV:EstP:RR/BO2	29	7400	7.7	48	1	2	3

RR=Residuos de rastro; EstV=Estiércol; EstP=Estiércol de puerco; Tri=Trigo; BO= Basura orgánica; AGV= Ácidos grasos volátiles.

Fuente: (Sundberg et al., 2013).

5.3.5. Factores que afectan la eficiencia de producción de biogás

Existen diversos factores que influyen tanto en la producción de biogás como de CH₄, tales como el tipo de sustrato, presencia de antibióticos, concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), concentración de amoníaco (NH₃), relación carbono: nitrógeno (C:N), temperatura, pH, potencial de óxido reducción, concentración de sólidos totales y la población bacteriana (Shi *et al.*, 2011).

La producción de metano tiene un límite que depende de la naturaleza de la materia orgánica que se deposita en el biodigestor. Los sustratos ideales para la digestión anaerobia en biodigestores, son los desechos orgánicos húmedos de origen agrícola, industrial, doméstico y municipal, así como las excretas de origen humano y animal (Rivas Solano *et al.*, 2010) en el Cuadro 5 se observa la proporción de CH₄ y CO₂ que se obtiene utilizando diferentes materias primas.

Cuadro 5. Porcentaje típico de metano para diferentes materias primas

Materia Prima	CH₄ (%)	CO₂ (%)
Estiércol de gallina	60	40
Estiércol de cerdo	67	33
Pastos y vegetales	70	30
Desperdicio domiciliarios	50	50
Cascarilla de arroz	55	45

Fuente: (Bharathiraja et al., 2018)

Las bacterias patógenas son destruidas durante la fermentación anaerobia termófila, cuando se alcanzan temperaturas superiores a 45°C, con las desventajas de que disminuye la estabilidad del proceso, ya que hay mayor deshidratación del material fermentado y los gastos energéticos para mantener esa temperatura son elevados (Salsali *et al.*, 2006).

5.4. Desarrollo de inóculos microbianos

En la digestión anaeróbica es común usar lodos de algún biodigestor activo como inóculo, lo que asegura la presencia de microorganismos adaptados al medio y al proceso de digestión anaeróbica. Yue *et al.* (2012) reportan que la inoculación con lodos activos de biodigestores alimentados con plantas acuáticas, mejoran la producción de biogás, en comparación de biodigestores inoculados con fluido ruminal.

En biodigestores que se alimentan con desperdicios vegetales o de cosecha, se han desarrollado inóculos experimentales a base de bacterias celulolíticas, para mejorar la fermentación, Ozbayram *et al.* (2018) reportan una mayor producción de metano en biodigestores inoculados con una combinación de fluido ruminal, lodos de biodigestores y un consorcio de bacterias celulolíticas; aunque, se logró un efecto similar usando únicamente lodos activos de biodigestores.

La digestión anaeróbica del rastrojo de maíz es más eficiente cuando se inoculan los biodigestores con fluido ruminal (fuente de bacterias anaerobias celulolíticas), lo que se refleja en un aumento en la eficiencia de conversión de materia orgánica a biogás de 55 a 70% (Hu y Yu, 2005). En biodigestores con altos contenidos de ácido acético, se ha demostrado la utilidad de adicionar un inóculo de los géneros *Methanosarcina* spp. y

Methanoculleus spp., debido a su alta capacidad para convertir el ácido acético en CH₄, en especial en la fase de puesta en marcha de los biodigestores (Lins *et al.*, 2014).

5.5. Técnicas *in vitro* para la medición de biogás

Las técnicas para medir la producción de biogás *in vitro* son de gran utilidad para estimar de manera económica y en un corto tiempo la producción de biogás en el rumen (Rymer *et al.*, 2005) y en sistemas biodigestores. Existen tres métodos para medir la producción de biogás: 1) medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, 2) medir la presión de gas a un volumen fijo y 3) medir el número de incrementos de volumen requeridos para causar un cambio definido en la presión (Posada y Noguera, 2005). Para la elección del método para medir la producción de biogás *in vitro*, se debe considerar que un exceso de presión en el sistema afecta negativamente el crecimiento microbiano (Schofield y Pell, 1995) y aumenta la solubilidad de los gases en el medio acuoso, lo cual puede generar errores en las mediciones obtenidas (Getachew *et al.*, 1998).

Los primeros métodos reportados para determinar el potencial de degradación de un alimento fueron por Mcbee (1953) y Hungate (1966). Posteriormente, se han hecho modificaciones a estos métodos, mediante la inclusión de técnicas para medir la producción de biogás por desplazamiento de una solución salina o con un flujometro para medir la presión del biogás liberado del sistema (Trei *et al.*, 1970). El desplazamiento del émbolo en una jeringa de vidrio debido a presión ejercida por el biogás producido lo comenzaron a usar Czerkawski and Breckenridge (1975) y fue la base de la “Técnica de gas de Hohenheim” desarrollada por Menke *et al.* (1979). La técnica con jeringas fue modificada, en vez de utilizar una incubadora rotatoria se utiliza un baño María y se registra el desplazamiento del émbolo en intervalos más frecuentes y no sólo a las 24 h, esto para determinar la cinética de fermentación (Blümmel y Ørskov, 1993).

Una técnica simple para estimar la producción de biogás fue descrita por Theodorou *et al.* (1994), se basa en medir manualmente la presión del espacio de cabeza en viales serológicos, a diferencia de los sistemas automáticos en donde cada frasco tiene su propio transductor de presión, en este sistema manual, se utiliza un sólo transductor para todos los frascos. Las lecturas de presión acumuladas son usadas para estimar el volumen de biogás producido derivada de mediciones simultaneas de presión y volumen.

Las técnicas de medición de biogás automática por desplazamiento de líquidos fueron desarrolladas originalmente para experimentos de fermentación ruminal, Krabill *et al.* (1969) indican que la captura de biogás durante 8 h de fermentación, la realizaron en una solución salina de Na_2SO_4 al 20 % (p/v) acidificado con ácido sulfúrico al 5 % (v/v). Jouany and Thivend (1986) ocuparon un sistema de fermentación *in vitro* que incluye la captura de gas en solución CaCl_2 al 30 % (p/v) y pH 3.5 para el análisis de CH_4 y CO_2 . Una representación del sistema de captura de biogás y desplazamiento de una solución mineral se muestra en la Figura 5.

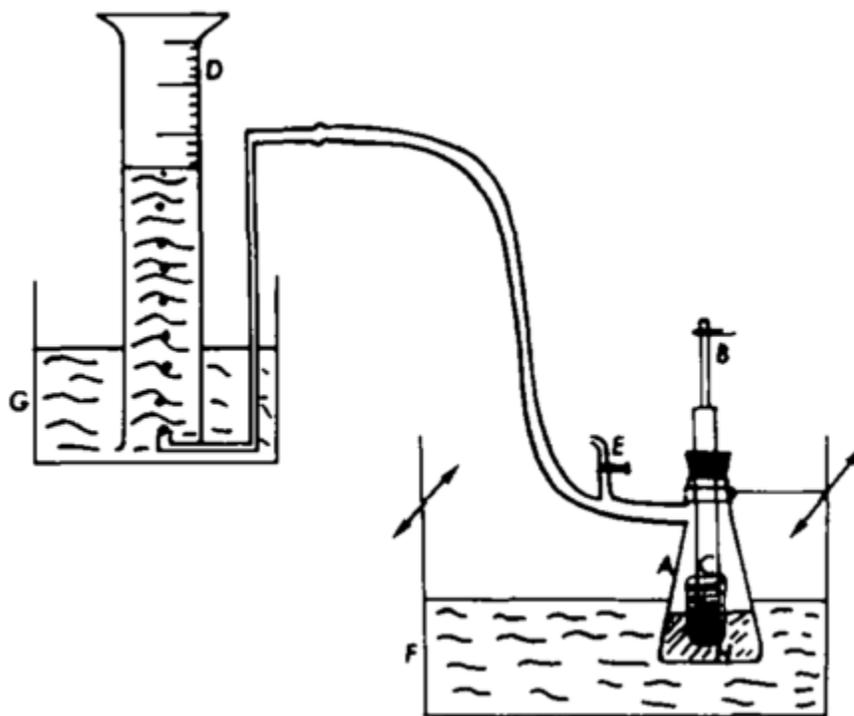


Figura 5. Sistema de fermentación con captura de gas.

A= Fermentador (1 L) en agitador; B=Tubo para toma de muestras líquidas; C=Filtro con tres capas de gasa de nylon; D=Colector de gas producido; E=Muestras de gas para análisis; F=Baño maría (39 °C); G=Solución de CaCl_2 (p/v) a un pH 3.5 con HCl; H=Inóculo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + almidón + fuente de proteína + antibiótico. Fuente: (Jouany y Thivend, 1986)

El sistema mostrado en la Fig. 5, fue la base para Beuvink (1993), quien modificó el sistema de desplazamiento de gas, saturando la trampa de gas con una solución de NaCl a un pH 1, además, que la medición de gas fue por diferencia de peso.

Literatura citada

- Acevedo, P. A. I., R. J. A. Leos, V. U. Figueroa, and L. J. L. Romo. 2017. Política ambiental: uso y manejo del estiércol en la Comarca Lagunera. *Acta Univ.* 27:3–12.
- Alrawi, R. A., A. Ahmad, N. Ismail, and M. O. A. Kadir. 2011. Anaerobic co-digestion of palm oil mill effluent with rumen fluid as a co-substrate. *Desalination.* 269:50–57.
- Bauchop, T. 1967. Inhibition of rumen methanogenesis by methane analogues. *J. Bacteriol.* 94:171–175.
- Bayané, A., and S. R. Guiot. 2011. Animal digestive strategies versus anaerobic digestion bioprocesses for biogas production from lignocellulosic biomass. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10:43–62.
- Beuvink, J. M. 1993. Measuring and modelling in-vitro gas production kinetics to evaluate ruminal fermentation of feedstuffs. Wageningen University.
- Bharathiraja, B., T. Sudharsana, J. Jayamuthunagai, R. Praveenkumar, S. Chozhavendhan, and J. Iyyappan. 2018. Biogas production – A review on composition, fuel properties, feed stock and principles of anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 90:570–582.
- Blümmel, M., and E. R. Ørskov. 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40:109–119.
- Broucek, J. 2018. Options to methane production abatement in ruminants: A Review. *J. Anim. Plant Sci.* 28:348–364.
- Callaway, T. R., S. E. Dowd, T. S. Edrington, R. C. Anderson, N. Krueger, N. Bauer, P. J. Kononoff, and D. J. Nisbet. 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *J. Anim. Sci.* 88:3977–3983.
- Cepero, L., V. Savran, D. Blanco, M. R. Díaz Piñón, J. Suárez, and A. Palacios. 2012. Producción de biogás y bioabonos a partir de efluentes de biodigestores. *Pastos y Forrajes.* 35:219–226.
- Czerkawski, J. W., and G. Breckenridge. 1975. by rumen micro-organisms. *Development and*

testing. *Br. J. Nutr.* 34:429–446.

Field, J. A., S. Kortekaas, and G. Lettinga. 1989. The tannin theory of methanogenic toxicity. *Biol. Wastes.* 29:241–262.

Fielding, E. R., D. B. Archer, E. C. de Macario, and A. J. L. Macario. 1988. Isolation and characterization of methanogenic bacteria from landfills. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:835–836.

Gerardi, M. H. 2003. *The Microbiology of Anaerobic Digesters.* John Wiley & Sons. New Jersey, USA.

Gerber, P. J., H. Steinfeld, B. Henderson, A. Mottet, C. Opio, J. Dijkman, A. Falcucci, and G. Tempio. 2013. *Tackling climate change through livestock- A global assessment of emissions and mitigation opportunities.* Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.

Getachew, G., M. Blümmel, H. P. S. Makkar, and K. Becker. 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72:261–281.

Gilroyed, B. H., T. Reuter, A. Chu, X. Hao, W. Xu, and T. A. McAllister. 2010. Anaerobic digestion of specified risk materials with cattle manure for biogas production. *Bioresour. Technol.* 101:5780–5785.

Grainger, C., and K. A. Beauchemin. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167:308–320.

Hagos, K., J. Zong, D. Li, C. Liu, and X. Lu. 2017. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 76:1485–1496.

He, J., X. Wang, X. Yin, Q. Li, X. Li, Y. Zhang, and Y. Deng. 2018. Insights into biomethane production and microbial community succession during semi-continuous anaerobic digestion of waste cooking oil under different organic loading rates. *AMB Express.* 8:92.

Himmelblau, D. M. 1997. *Principios Básicos y Cálculos en Ingeniería Química.* 6ta ed. Prentice-

Hall Hispanoamericana S. A., México.

- Hristov, A. N., J. Oh, T. W. Frederick, M. T. Harper, H. L. Weeks, A. F. Branco, P. J. Moate, M. H. Deighton, S. R. O. Williams, M. Kindermann, S. Duval, A. N. Hristov, J. Oh, F. Giallongo, T. W. Frederick, M. T. Harper, and H. L. Weeks. 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112:10663-10668.
- Hristov, A. N., T. Ott, J. Tricarico, A. Rotz, G. Waghorn, A. Adesogan, J. Dijkstra, F. Montes, J. Oh, E. Kebreab, S. J. Oosting, P. J. Gerber, B. Henderson, H. P. S. Makkar, and J. L. Firkins. 2013. SPECIAL TOPICS — Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: III. A review of animal management mitigation options I. *J. Anim. Sci.* 91:5095–5113.
- Hu, Z. H., and H. Q. Yu. 2005. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. *Process Biochem.* 40:2371–2377.
- Hungate, R. E. 1966. *The rumen and its microbes.* Academic P. New York, NY.
- IPCC. 2014. *Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los grupos de trabajo I, II y III al quinto informe de evaluación del grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático.* (R. K. Pachauri and L. A. Meyer, editors.). IPCC, Ginebra, Suiza.
- Iqbal, M. F., Y.-F. Cheng, W.-Y. Zhu, and B. Zeshan. 2008. Mitigation of ruminant methane production: current strategies, constraints and future options. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:2747–2755.
- Jouany, J. P., and P. Thivend. 1986. *In vitro* effects of avaporcin on protein degradability and rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 15:215–229.
- Khanbabaee, K., and T. van Ree. 2001. Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18:641–649.
- Krabill, L. F., W. S. Alhassan, and L. D. Satter. 1969. Manipulation of the ruminal fermentation. 2. Effect of sodium sulfite on bovine digestion and ruminal fermentation. *J. Dairy Sci.* 52:1812–1816.

- Lee, S.-H., H.-J. Kang, Y. H. Lee, T. J. Lee, K. Han, Y. Choi, and H.-D. Park. 2012. Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full-scale anaerobic digesters. *J. Environ. Monit.* 14:1893.
- Lila, Z. A., N. Mohammed, T. Yasui, Y. Kurokawa, S. Kanda, and H. Itabashi. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 82:1847–1854.
- Lins, P., C. Reitschuler, and P. Illmer. 2014. *Methanosarcina* spp., the key to relieve the start-up of a thermophilic anaerobic digestion suffering from high acetic acid loads. *Bioresour. Technol.* 152:347–354.
- Liu, Z., and Y. Liu. 2018. Mitigation of greenhouse gas emissions from livestock production. *Greenh. Gases Sci. Technol.* 8:627–638.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, and D. A. Stahl. 2014. *Brock Biology of Microorganisms*. 14th ed. Pearson Education, Inc., Illinois, USA.
- Martí-Herrero, J., and J. Cipriano. 2012. Design methodology for low cost tubular digesters. *Bioresour. Technol.* 108:21–27.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4:351–365.
- Martins das Neves, L. C., A. Converti, and T. C. Vessoni Penna. 2009. Biogas Production: New trends for alternative energy sources in rural and urban zones. *Chem. Eng. Technol.* 32:1147–1153.
- Mathison, G. W., E. K. Okine, T. A. McAllister, Y. Dong, J. Galbraith, and O. I. N. Dmytruk. 1998. Reducing methane emissions from ruminant animals. *J. Appl. Anim. Res.* 14:1–28.
- McAllister, T. A., and C. J. Newbold. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust. J. Exp. Agric.* 48:7.
- Mcbee, R. H. 1953. A Manometric method for the evaluation of microbial activity of the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Appl. Environ. Microbiol.* 1:106–110.

- Meale, S. J., A. V. Chaves, T. A. Mcallister, A. D. Iwaasa, W. Z. Yang, and C. Benchaar. 2014. Including essential oils in lactating dairy cow diets: Effects on methane emissions. *Anim. Prod. Sci.* 54:1215–1218.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci.* 93:217–222.
- Moate, P. J., S. R. O. Williams, C. Grainger, M. C. Hannah, E. N. Ponnampalam, and R. J. Eckard. 2011. Influence of cold-pressed canola, brewers grains and hominy meal as dietary supplements suitable for reducing enteric methane emissions from lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167:254–264.
- Van Nevel, C. J. 1996. Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Assess.* 42:73–97.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace, and F. M. McIntosh. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* 76:249–61.
- Ozbayram, E. G., Akyol, B. Ince, C. Karakoç, and O. Ince. 2018. Rumen bacteria at work: bioaugmentation strategies to enhance biogas production from cow manure. *J. Appl. Microbiol.* 124:491–502.
- Patel, S., R. Shukla, and A. Goyal. 2015. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. *J. Funct. Foods.* 14:549–561.
- Piao, Z. H., J. Lee, and J. Y. Kim. 2018. Effect of substrate feeding frequencies on the methane production and microbial communities of laboratory-scale anaerobic digestion reactors. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 20:147–154.
- Posada, S. L., and R. R. Noguera. 2005. *In vitro* gas production technique: A tool for evaluation of ruminant feeds. *Livest. Res. Rural Dev.* 17.
- Rivas Solano, O., O. R. Solano, M. F. Vargas, and R. G. Watson. 2010. Biodigestores: factores químicos, físicos y biológicos relacionados con su productividad. *Tecnol. en Marcha.* 23:39–46.
- Rymer, C., J. A. Huntington, B. A. Williams, and D. I. Givens. 2005. *In vitro* cumulative gas

production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124, P:9–30.

SAGARPA. 2009. Energías renovables para el desarrollo sustentable en México. Disponible *In:* http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/cambioclimatico/Tecnologias_mitigacion.pdf. Fecha de consulta: 20 de mayo de 2018.

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. *Can. J. Microbiol.* 52:279–286.

Schofield, P., and A. N. Pell. 1995. validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion in vitro: a comparison involving three forages. *J. Dairy Sci.* 78:2230–2238.

Sejian, V., and S. M. K. Naqvi. 2012. Livestock and Climate Change: Mitigation strategies to reduce methane production. In: *Greenhouse Gases - Capturing, Utilization and Reduction*. Guoxiang Liu (Ed.), Chapter II, 255-276. InTech. *In:* <http://www.intechopen.com/books/greenhouse-gases-capturing-utilization-and-reduction/livestock-and-climate-change-mitigation-strategies-to-reduce-methane-production->

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. *Anim. Feed Sci. Technol.* 167:457–463.

Song, M. K., X. Z. Li, Y. K. Oh, C. K. Lee, and Y. Hyun. 2011. Control of methane emission in ruminants and industrial application of biogas from livestock manure in Korea. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 24:130–136.

Sundberg, C., W. A. Al-Soud, M. Larsson, E. Alm, S. S. Yekta, B. H. Svensson, S. J. Sørensen, and A. Karlsson. 2013. 454 Pyrosequencing Analyses of Bacterial and Archaeal Richness in 21 Full-Scale Biogas Digesters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85:612–626.

Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48:185–197.

Thiel, P. G. 1969. The effect of methane analogues on methanogenesis in anaerobic digestion. *Water Res.* 3:215–223.

- Trei, J., W. Hale, and B. Theurer. 1970. Effect of grain processing on *in vitro* gas production. *J. Anim. Sci.* 30:825–831.
- Villalobos, E. I., H. F. Ramírez, L. M. Balam, and M. A. García. 2015. Inventario Nacional de Emisiones y Compuestos de Gases Efecto Invernadero. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Distrito Federal, México.
- Vincken, J.-P., L. Heng, A. de Groot, and H. Gruppen. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry.* 68:275–297.
- Weber, B., M. O. Rojas, M. B. Torres, and L. G. Pampillón. 2012. Producción de biogás en México: Estado actual y perspectivas. Red Mexicana de Bioenergía A.C. Cuadernos temáticos. Guanajuato, México.
- Wilkins, D., X. Y. Lu, Z. Shen, J. Chen, and P. K. H. Lee. 2015. Pyrosequencing of *mcrA* and archaeal 16s rRNA genes reveals diversity and substrate preferences of methanogen communities in anaerobic digesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:604–613.
- Xia, Y., D. I. Massé, T. A. McAllister, Y. Kong, R. Seviour, and C. Beaulieu. 2012. Identity and diversity of archaeal communities during anaerobic co-digestion of chicken feathers and other animal wastes. *Bioresour. Technol.* 110:111–119.
- Yue, Z. B., J. Wang, X. M. Liu, and H. Q. Yu. 2012. Comparison of rumen microorganism and digester sludge dominated anaerobic digestion processes for aquatic plants. *Renew. Energy.* 46:255–258.

CAPÍTULO I. USO DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE INFRARROJO PARA LA DETECCIÓN DE METANO EN DOS MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS PARA ARQUEAS METANOGENAS

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018.

1.1 RESUMEN

La medición de metano (CH₄) en medios de cultivo por espectroscopia de absorción de infrarrojo (EAI) (LaserMethane mini2, Tokyo Gas Engineering, Japan) es una alternativa novedosa para determinar la producción de metano. Dos medios de cultivo selectivo (con y sin minerales traza) se inocularon con lodos activos de biodigestores alimentados con estiércol de vacas Holstein y se incubaron 72 h a 39 °C. La producción de CH₄ en ppm se midió con un equipo de infrarrojo cercano cada 24 h durante 3 d. También, se determinó la proporción de CO₂ y CH₄ (por cromatografía de gases), pH, potencial óxido-reducción (REDOX), y la concentración de arqueas metanogénicas. Se comparó la producción de CH₄ en los dos medios de cultivo utilizando un diseño completamente al azar con el procedimiento GLM de SAS versión 9.1, los promedios se compararon con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). El medio de cultivo con minerales traza tuvo menor REDOX y mayor producción de CH₄ que el medio de cultivo sin minerales a las 72 h de incubación ($p < 0.05$). La detección de CH₄ por EAI fue similar a la determinada por cromatografía a las 24, 48 y 72 h de incubación. La determinación de metano con el LaserMethane mini2 no reemplaza la sensibilidad que se tiene en un cromatógrafo de gases, pero tiene la ventaja, de que se pueden hacer lecturas continuas sin necesidad de abrir los tubos de cultivo.

Palabras clave: Metanogénicas, biodigestores.

EXPERIMENT I. USE OF INFRARED ABSORPTION SPECTROSCOPY FOR THE DETECTION OF METHANE IN TWO SELECTIVE CULTURE MEDIA FOR METANOGENIC ARCHAEA

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr. en C.

1.2 ABSTRACT

The measurement of methane (CH₄) in anaerobic culture media by infrared absorption spectroscopy (EAI) (LaserMethane mini2, Tokyo Gas Engineering, Japan) is a novel alternative to determine methane production. Two selective culture media for methanogens (with and without trace minerals) were inoculated with active sludge from biodigesters fed with manure from Holstein cows and incubated 72 h at 39 ° C. The production of CH₄ in ppm was measured with a near infrared device every 24 h for 3 d. Also, the proportion of CO₂ and CH₄ (by gas chromatography), pH, reduction-oxidation potential (REDOX), and the concentration of methanogenic archaea were determined. The production of CH₄ in two culture media was compared using a completely randomized design with the GLM procedure of SAS version 9.1, the averages were compared with the Tukey test (p <0.05). The culture medium with trace minerals had lower REDOX and higher CH₄ production than the culture medium without minerals at 72 h of incubation (p <0.05). The detection of CH₄ by EAI was similar to that determined by gas chromatography at 24, 48 and 72 h of incubation. The determination of methane with the LaserMethane mini2 does not replace the sensitivity of a gas chromatograph, but it has the advantage that continuous readings can be made without the need to open the culture tubes.

Keywords: Biogas, anaerobic medium, methanogen.

1.3 INTRODUCCIÓN

Las arqueas constituyen uno de los tres dominios de la vida, comparten características celulares con las bacterias y eucariotas, pero son evolutivamente distintas. En el dominio Archaea existen las arqueas productoras de CH₄ llamados metanógenos, es decir microorganismos que producen CH₄ como parte integral de su metabolismo energético (Madigan *et al.*, 2009).

Las metanógenas tienen cofactores únicos tales como las coenzimas M y F₄₂₀ (Shima *et al.*, 2002), son anaerobias estrictas, y crecen en ecosistemas con un potencial de óxido-reducción menor a -300 mV (Kumar *et al.*, 2009).

El cultivo *in vitro* de metanogénicas es complicado por las condiciones que requieren para su crecimiento; por ejemplo, se requiere de una atmósfera con presencia H₂ y CO₂ en el medio de cultivo y evitar la entrada de O₂ para mantener la anaerobiosis (Balch *et al.*, 1979). Otra complicación para su estudio, está relacionada con las técnicas para muestrear el biogás producido y determinar el CH₄ por cromatografía de gases (Balch *et al.*, 1979; Wolfe, 2011).

La espectroscopia de absorción de infrarrojos (LaserMethane mini2, Tokyo Gas Engineering, Japan), es una técnica no invasiva que puede ser una alternativa para detectar el metano producido *in vitro* sin necesidad de abrir los tubos o viales de vidrio que contienen el medio de cultivo inoculado con metanógenos. El LaserMethane mini2 (Tokyo Gas Engineering, Japan) ha sido utilizado en investigaciones para monitorear las emisiones entéricas de metano en rumiantes, vacas lecheras (Chagunda, 2013) en ovejas y toros (Ricci *et al.*, 2014), además del monitoreo en rellenos sanitarios (Lando *et al.*, 2017). Pero, no se encontró información sobre su uso en estudios *in vitro*.

Por tanto, el objetivo del experimento fue detectar con un equipo de infrarrojo cercano el CH₄ producido en viales de cultivo inoculados con lodo activo de biodigestores y comparar el resultado con respecto a los datos obtenidos por cromatografía de gases, además, determinar el efecto del dos medios de cultivo sobre la producción de CH₄ otras variables físico-químicas.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México.

1.4.1 Tratamientos y medios de cultivo selectivo

Los tratamientos considerados en este experimento fueron dos medios de cultivo selectivo, con y sin minerales traza, cada uno con 5 repeticiones. En el Cuadro 6 se muestran los ingredientes de los medios de cultivo selectivo utilizados.

Cuadro 6. Medios de cultivo selectivos para arqueas metanogénicas

Componente	Por cada 100 mL	
	FCoM-FR	FMinT-FR
Agua destilada, mL	52.6	52.6
Líquido ruminal clarificado ^a , mL	30.0	30.0
Solución mineral I ^b , mL	5.0	5.0
Solución mineral II ^c , mL	5.0	5.0
Resazurina (solución al 0.1 %) ^d , mL	0.1	0.1
Peptona de soya, g	0.2	0.2
Extracto de levadura, g	0.1	0.1
Carbonato de Na (solución al 8 %) ^e , mL	6.0	6.0
Cisteína-sulfido ^f , mL	4.0	4.0
Formato de sodio, g	0.5	0.5
Coenzima M, µg	11.5	11.5
Antibiótico ^g , mL	1.0	1.0
Hemina ^h , mL	0.1	0.1
Agar, g	2.5	2.5
Minerales traza ⁱ , mL	--	1.0

(a) El líquido ruminal fresco se filtra en tela de manta, centrifuga 10 min a 13, 416 X g, y esteriliza 15 min a 121 °C y 15 PSI.

(b) Contiene 6 g de K_2HPO_4 , por 1,000 mL de agua destilada.

(c) Contiene 6 g KH_2PO_4 ; 6g $(NH_4)_2SO_4$; 12 g NaCl; 2.45 g $MgSO_4$; y 1.6 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ por 1,000 mL de agua destilada.

(d) Disolver 100 mg de resazurina en 100 mL de agua destilada. Esterilizar 15 min a 121 °C y guardar en refrigeración.

(e) 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

(f) 2.5 g de L-cisteína (disuelta en NaOH 2N), 2.5 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$. La mezcla es aforada a 100 mL con H_2O destilada y se agrega 0.1 mL de resazurina (solución al 0.1 % en agua destilada).

(g) Cada mL contiene 250 mg de dihidroestreptomomicina y 200, 000 UI de penicilina G.

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

(i) Contiene 70 mg de $ZnCl_2$; 100 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 6 mg de H_3BO_3 ; 190 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 2 mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 24 mg de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ y 36 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ por 1,000 mL de agua destilada.

Para cada medio de cultivo, se vertieron 45 mL del medio de cultivo en viales serológicos de 120 mL bajo flujo de CO_2 para mantener la anaerobiosis. Se sellaron los viales serológicos

con un tapón de neopreno de 2 cm de diámetro y un casquillo de aluminio y se almacenaron en refrigeración hasta su uso. Estos viales serológicos con el medio de cultivo son los biorreactores que se usaron en todo el experimento.

1.4.2 Inóculo

Se usaron los efluentes de un biodigestor de la Unidad Experimental de Biodigestores como fuente de inóculo, en el Cuadro 7 se dan las características físico-químicas del biodigestor. Se colectaron 20 L de efluentes, se homogenizó y se tomó una alícuota de 2 L que se transportó de inmediato al laboratorio. Los 2 L de muestra se filtraron e incubaron a 39°C durante 3 h, posteriormente, se inocularon 5 viales serológicos por tratamiento (medio con y sin minerales traza). En la Unidad Experimental de Biodigestores se midió: CH₄, H₂S, CO₂ y temperatura de la fase gaseosa del biodigestor, con un analizador Optima 7 biogás (MRU® Air Emission Monitoring Systems, Germany). El pH, potencial óxido-reducción, oxígeno disuelto, sólidos totales disueltos y temperatura de fase líquida se realizaron con el monitor de calidad de agua Horiba® (model U-5000, Japan). El contenido de sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) fue determinado usando los métodos estándar (APHA/AWWA/WEF, 2005).

Cuadro 7. Características físico-químicas del biodigestor con capacidad de 1000 L y 700 L de volumen de trabajo de la unidad experimental

Parámetros	Unidad	Biodigestor
ST	%	2.98 ± 0.03
SV/ST	%	56.95 ± 0.004
Cenizas	%	1.69 ± 0.007
CH ₄	%	51.56
H ₂ S	ppm	36
CO ₂	%	34.57
Temperatura fase gaseosa	°C	33.7
pH		7.66
Potencial óxido-reducción	mV	-311
Oxígeno disuelto	mg L ⁻¹	3.38
Sólidos totales disueltos	g L ⁻¹	8.94
Temperatura fase líquida	°C	18.32

1.4.3 Establecimiento del experimento

Para la medición de biogás se usó la metodología descrita por Cobos-Peralta *et al.* (2018), los medios inoculados se incubaron a 39°C durante 72 h, cada 24 h se liberó el biogás en frascos de 120 mL llenos de solución salina saturada pH de 2. La proporción de CH₄ y CO₂ se determinó en un cromatógrafo de gases (PerkinElmer® Clarus 500), se inyectaron 300 µL del gas contenido en el espacio de cabeza de cada biorreactor. Las condiciones de operación fueron: temperatura de horno, 80 °C, columna empacada (PKD), 170 °C y detector de conductividad térmica, 130 °C. Tiempos de retención: 0.68 min para CH₄ y 1.05 min para CO₂, se usó Helio como gas acarreador con un flujo 23 mL m⁻¹.

El volumen de CH₄ y CO₂ producido en los biorreactores, se calculó utilizando el volumen de biogás gas total y la proporción obtenida por cromatografía de gases. La medición de CH₄ por espectroscopia de absorción de infrarrojos en el medio de cultivo selectivo se realizó con un analizador LaserMethane mini2 (Tokyo Gas Engineering, Japan).

El pH fue medido con un potenciómetro (ORION® modelo 250^a) calibrado a pH 4 y 7. El potencial óxido-reducción (ORP) fue medido con un potenciómetro (ORION® modelo 710^a) calibrado con una solución +220 de óxido-reducción. Una muestra de 1 mL de cada vial fue mezclada con 0.25 mL de formaldehído para medir la CAM. Las arqueas metanogénicas se observaron y contaron en una cámara Petroff-Hausser (Electron Microscopy Sciences®, Hatfield, PA, USA) en un microscopio (Olympus®, BX51 TRF, Tokyo, Japan) a una magnificación de 1000X acoplado a una lámpara de mercurio. La CAM se calculó con la fórmula: CAM= (promedio conteo directo) (factor de dilución) (2x10⁷).

Un diseño completamente al azar (CA) fue utilizado para las variables pH, ORP, CH₄ (% , mL y ppm). CAM se transformó con Log 10, con la finalidad de cumplir con la normalidad y homogeneidad de los datos. CA se realizó con el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Los promedios se compararon con la prueba de Tukey (p ≤ 0.05).

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pH no fue diferente entre tratamientos (p ≥ 0.05), sin embargo, el potencial de óxido reducción fue menor (p ≤ 0.05) en el medio FMinT-FR, aunque dichas condiciones no resultaron en conteos de arqueobacterias metanogénicas diferentes (p ≥ 0.05) (Cuadro 8). El

pH obtenido (7.42) es similar al obtenido por (Ferrari et al., 1994) quienes reportan un pH óptimo entre 6.9 y 7.4 para la cepa *Methanobrevibacter* ZR, mientras que, otras especies como *Methanobrevibacter arboriphilicus* pueden requerir un pH entre 7.0 a 7.8 (Balch et al., 1979). El potencial de óxido-reducción (ORP) óptimo de las metanogénicas es de -330 mV (Wolfe, 2011). En este experimento, el ORP más negativo ($p \leq 0.05$) se obtuvo en el medio FMinT-FR (-303 mV) en comparación con el medio FCoM-FR (-292.20 mV). Considerando que la producción de metano fue similar entre tratamientos, se estima que se cumplieron las condiciones de anaerobiosis requeridas para la metanogénesis, a pesar de que no se alcanzó un ORP de -330 mV.

El porcentaje de CH₄ en el biogás fue similar ($p \geq 0.05$) a las 24 y 48 h entre los dos medios de cultivo selectivo, pero a las 72 h de incubación fue mayor ($p \leq 0.05$) en el medio FCoM-FR (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de CH₄ en el biogás a las 24, 48 y 72 h de incubación, pH, ORP y concentración de arqueas metanogénicas en los tratamientos.

Variables	Tratamientos		P	EEM
	FCoM-FR [¶]	FMinT-FR [§]		
pH	7.41	7.43	0.102	0.006
ORP, mV	-292.20 a	-303.44 b	0.011	2.486
CAM [£] , x 10 ⁸	6.08	8.04	0.102	0.034
CH ₄ , % (24 h)	36.68	33.61	0.406	1.731
CH ₄ , % (48 h)	54.02	54.42	0.857	1.037
CH ₄ , % (72 h)	67.77 a	63.44 b	0.032	1.070

[¶]FCoM-FR: Medio de cultivo selectivo sin minerales traza; [§]FMinT-FR: Medio de cultivo selectivo con minerales traza; [£]CAM, concentración de arqueas metanogénicas; a, b Medias con diferente literal en la misma hilera son diferentes.

La producción en mL de CH₄ fue mayor ($p \leq 0.05$) a las 24 h de fermentación con el medio FMinT-FR, mientras que, a las 48 y 72 h no hubo diferencias ($p \geq 0.05$). La producción acumulada de CH₄ fue mayor ($p \leq 0.05$) en el medio FMinT-FR. (Cuadro 9).

La utilización del analizador LaserMethane mini2 (Tokyo Gas Engineering, Japan) permitió detectar el CH₄ dentro de los viales sin destaparlos o tomar muestra con jeringa, lo que representa una ventaja en comparación con los métodos invasivos.

Cuadro 9. Producción de CH₄ y la detección por espectroscopia de absorción de infrarrojos en los tratamientos en mL y ppm.

Variables	Tratamientos		P	EEM
	FCoM-FR [¶]	FMinT-FR [§]		
CH ₄ , mL (24 h)	6.40 b	8.00 a	0.019	0.371
CH ₄ , mL (48 h)	8.20	9.10	0.120	0.285
CH ₄ , mL (72 h)	6.44	6.83	0.267	0.171
CH ₄ , mL (Acumulada)	21.04 b	23.94 a	0.017	0.663
CH ₄ , ppm (24 h)	8901	8511	0.605	348.302
CH ₄ , ppm (48 h)	13245	13753	0.365	263.647
CH ₄ , ppm (72 h)	16771	16016	0.088	222.312

¶FCoM-FR: Medio de cultivo selectivo sin minerales traza; §FMinT-FR: Medio de cultivo selectivo con minerales traza; a, b Medias con diferente literal en la misma hilera son diferentes.

Con el LaserMethane mini 2 (Tokyo Gas Engineering, Japan) se determinó una producción de CH₄ similar a la determinada por cromatografía de gas tienen, a las diferentes horas de incubación, con una correlación estimada de 96%.

1.6 CONCLUSIONES

Los dos medios de cultivo selectivo evaluados, resultaron adecuados para estimar la actividad de arqueas metanógenas. Sin embargo, derivado del análisis de los resultados podemos inferir que el medio de cultivo FMinT-FR, tiene mejores condiciones para la metanogénesis, lo que se comprueba con una mayor cantidad de CH₄ acumulado después de 72 h de incubación. La utilización del LaserMethane mini2 (Tokyo Gas Engineering, Japan) es confiable como método no invasivo, para la detección continua de CH₄ en viales de cultivo.

Literatura citada

- APHA/AWWA/WEF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed. American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese, and R. S. Wolfe. 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43:260–296.
- Chagunda, M. G. G. 2013. Opportunities and challenges in the use of the Laser Methane Detector to monitor enteric methane emissions from ruminants. *Animal.* 7:394–400.

- Cobos-Peralta, M. A., K. R. Curzaynz-Leyva, M. I. Rivas-Martínez, E. A. Santillán-Gómez, and J. R. Bárcena. 2018. In vitro effect of diets for growing lambs supplemented with dried distiller's grains on rumen fermentation and gas emissions. *Agrociencia*. 52(2):203-215.
- Ferrari, A., T. Brusa, A. Rutili, E. Canzi, and B. Biavati. 1994. Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis* sp. nov. *Curr. Microbiol.* 29:7–12.
- Kumar, S., A. K. Puniya, M. Puniya, S. S. Dagar, S. K. Sirohi, K. Singh, and G. W. Griffith. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:1557–1566.
- Lando, A. T., H. Nakayama, and T. Shimaoka. 2017. Application of portable gas detector in point and scanning method to estimate spatial distribution of methane emission in landfill. *Waste Manag.* 59:255–266.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker, T. D. Brock, C. R. Fernández, and M. S. Pérez. 2014. *Brock biology of microorganism*. 14a edition. Pearson Educatio, Inc. Illinois, USA.
- Ricci, P., M. G. G. Chagunda, J. Rooke, J. G. M. Houdijk, C. A. Duthie, J. Hyslop, R. Roehe, and A. Waterhouse. 2014. Evaluation of the laser methane detector to estimate methane emissions from ewes and steers. *J. Anim. Sci.* 92:5239–5250.
- 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. *J. Biosci. Bioeng.* 93:519–530.
- Wolfe, R. S. 2011. *Techniques for Cultivating Methanogens*. *Methods in Enzymology*, 494:1-22. Elsevier, Inc.

CAPÍTULO II. AISLAMIENTO DE ARQUEA METANOGÉNICA DE BIODIGESTORES ALIMENTADOS CON ESTIÉRCOL DE VACA HOLSTEIN

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2018.

2.1 RESUMEN

Para el estudio de arqueas metanogénicas se usan medios de cultivo selectivo que, además, de proporcionar los nutrientes necesarios para su desarrollo, deben de incorporar inhibidores del crecimiento de otros microorganismos, por ejemplo, antibióticos. Se evaluó un medio de cultivo selectivo para metanógenos, este medio contenía fluido ruminal clarificado, formato de sodio, coenzima M y minerales traza como ingredientes principales. Con este medio, se logró aislar 3 cepas con características únicas de las arqueas metanogénicas, cómo son producción de CH₄ y fluorescencia al microscopio. Se concluye que el medio de cultivo evaluado es adecuado para el estudio *in vitro* de arqueas metanogénicas.

Palabras clave: Espectroscopia, infrarrojo, metano, medio de cultivo, biogás

EXPERIMENT II. ISOLATION OF METHANOGENIC ARCHAEA FROM DIGESTER FED WITH HOLSTEIN COW MANURE

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr. en C.

2.2 ABSTRACT

For the study of methanogenic archaea, selective culture media are used, which in addition to providing the nutrients necessary for their development, must incorporate inhibitors of the growth of other microorganisms, for example, antibiotics. A selective culture medium for methanogens was evaluated, this medium contained clarified ruminal fluid, sodium format, coenzyme M and trace minerals as main ingredients. With this medium, we were able to isolate 3 strains with unique characteristics of methanogenic archaea, including production of CH₄ and fluorescence under a microscope. It is concluded that the culture medium evaluated is suitable for the *in vitro* study of methanogenic archaea.

Keywords: Spectroscopy, infrared, methane, culture medium, biogas

2.3 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las arqueas metanogénicas pueden ser cultivadas en laboratorios con métodos y equipos muy específicos (Khelaiifia *et al.*, 2013), el método de Hungate modificado es uno de los más usados, pero suele ser costoso y consume mucho tiempo (Miller y Wolin, 1974). Las técnicas para cultivar metanogénicas suelen complicarse debido a que se reporta que son extremadamente susceptibles al oxígeno, se menciona que 10 ppm de oxígeno es letal para su crecimiento (Wolfe y Metcalf, 2010). Los inóculos comúnmente utilizados para aislar metanogénicas han sido heces de humano (Miller *et al.*, 1982), rellenos sanitarios (Fielding *et al.*, 1988), heces de animales (Miller *et al.*, 1986), contenido ruminal (Smith y Hungate, 1958), lodos de biodigestores lagos y yacimientos de petróleo (Kavitha *et al.*, 2014; Surakasi *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2011).

Si bien es cierto que muy pocos metanógenos son acetotróficos, las mediciones de metanogénesis en algunos hábitats como los fangos de aguas residuales demuestran que alrededor de dos tercios del metano generado se produce a partir de acetato y un tercio a partir de $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ (Madigan *et al.*, 2014).

Otro problema asociado al estudio de los metanógenos es su conservación. Una vez aislado el microorganismo, la preservación suele ser compleja. La liofilización se ha sugerido como un método eficaz, pero, la adecuada preservación es afectada por múltiples factores, por ejemplo, especies, tamaño y forma de la célula, rango y fase de crecimiento, temperatura de incubación, pH, osmoralidad y aeración, composición del medio de cultivo, contenido de agua de la célula, temperatura de almacenaje, y la eficacia de los crioprotectores (Hubálek, 2003).

Las arqueas son microorganismos muy sensibles al oxígeno, en pocas cantidades puede ser letal, lo que hace complicada su conservación; en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen, Germany (DSMZ) usan dimetilsulfoxido para evitar el efecto tóxico del oxígeno que llega a entrar a los medios de cultivo (Winter, 1983). Una vez que se conservan los microorganismos mediante liofilización, es importante comprobar su viabilidad activándolos en medios de cultivo selectivos. Una alternativa de conservación, es el uso de un medio sólido. El objetivo del experimento fue aislar una arquea metanogénica de lodos de un biodigestor alimentado con estiércol de vaca Holstein, usando un método de

trasferencias en medio líquido y sólido. También se extrajo el ADN y se evaluó la utilidad de un iniciador universal para la identificación genética de las cepas aisladas.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana y en la Unidad Experimental de Biodigestores del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México.

2.4.1 Medios de cultivo selectivo

Para el aislamiento de la arquea metanogénica se utilizó el medio de cultivo selectivo líquido. Para la obtención de colonias se agregó agar al medio de cultivo líquido. En el Cuadro 10 se muestran los ingredientes del medio de cultivo utilizado (con agar).

Cuadro 10. Medio de cultivo selectivo para aislamiento de arqueobacteria metanogénica

Componente	Por cada 100 mL
	FMinT-FR
Agua destilada, mL	52.6
Líquido ruminal clarificado, mL	30.0
Solución mineral I ^b , mL	5.0
Solución mineral II ^c , mL	5.0
Resazurina (solución al 0.1 %) ^d , mL	0.1
Peptona de soya, g	0.2
Extracto de levadura, g	0.1
Carbonato de Na (solución al 8 %) ^e , mL	6.0
Cisteína-sulfido ^f , mL	4.0
Formato de sodio, g	0.5
Coenzima M, µg	11.5
Antibiótico ^g , mL	1.0
Hemina ^h , mL	0.1
Agar, g	2.5
Minerales traza ⁱ , mL	0.5

(a) El líquido ruminal fresco filtrado a través de manta de cielo fue centrifugado 10 min a $13\ 416 \times g$ y esterilizado 15 min en autoclave a 121 °C.

(b) Contiene 6 g de K₂HPO₄, por 1000 mL de agua destilada.

(c) Contiene 6 g KH₂PO₄; 6g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄; y 1.6 g CaCl₂·2H₂O por 1000 mL de agua destilada.

(d) Disolver 100 mg de resazurina en 100 mL de agua destilada. Esterilizar 15 min a 121 °C y guardar en refrigeración.

(e) 8 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua destilada.

(f) 2.5 g de L-cisteína (disuelta en NaOH 2N), 2.5 g de Na₂S·9H₂O. La mezcla es aforada a 100 mL con H₂O destilada y se agregar 0.1 mL de resazurina (solución al 0.1 % agua destilada).

(g) Cada mL contiene 250 mg de dihidroestreptomina y 200, 000 UI de penicilina G, además de vehículo.

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

(i) Contiene 70 mg de ZnCl₂; 100 mg de MnCl₂·4H₂O; 6 mg de H₃BO₃; 190 mg de CoCl₂·6H₂O; 2 mg de CuCl₂·2H₂O; 24 mg de NiCl₂·6H₂O y 36 mg de Na₂MoO₄·2H₂O por 1000 mL de agua destilada.

2.4.2 Inóculo

El lodo activo de biodigestores se usó como inóculo, se tomó una muestra de 20 L de uno de los cuatro biodigestores de la Unidad Experimental de Biodigestores. El biodigestor se seleccionó con base al que presentó el mayor contenido de metano en el biogás. La muestra se homogenizó y se tomó una alícuota de 2 L en un vaso de precipitados de plástico y se transportó de inmediato al laboratorio.

2.4.3 Medios líquidos y transferencias.

Se depositaron 9 mL de medio de cultivo selectivo sin agar (Cuadro 10) en tubos de 18 x 150 mm. Tres tubos de cultivo fueron inoculados con 1 mL del inóculo y se incubaron a 39°C durante 72 h. Posteriormente, se transfirió 1 mL de cada tubo de cultivo a otros tres tubos de cultivo que contenían 9 mL del medio selectivo y se incubaron a 39°C durante 72 h (primera transferencia). Esta operación se repitió en dos ocasiones, para obtener la tercera transferencia. A partir de la tercera transferencia, se sembró por estriado, los microorganismos obtenidos en un medio de cultivo sólido. El sembrado, se realizó en una campana de flujo laminar con flujo de CO₂ para mantener la anaerobiosis y evitar la contaminación de los medios.

Para asegurar que en cada transferencia había arqueas metanogénicas, se midió la presencia de metano por espectroscopia de absorción de infrarrojos con el equipo LaserMethane mini2 (Tokyo Gas Engineering, Japan), las lecturas de metano se hicieron cada 24 h. También, se determinó el pH y el potencial óxido-reducción al final de cada transferencia.

2.4.4 Medios sólidos para selección de colonias

Se vertieron 9 mL de medio de cultivo selectivo en tubos 18 x 150 mm y se colocaron de manera horizontal para que solidificaran a lo largo del tubo de cultivo y tener mayor espacio para la siembra, como se muestra en la Figura 6.



Figura 6. Medio anaerobio sólido horizontal (siembra de colonias seleccionadas).

La siembra se realizó en una campana de flujo laminar vertical, bajo flujo de CO₂ en el proceso de transferencia entre medio líquido y sólido para mantener la anaerobiosis (Figura 7).

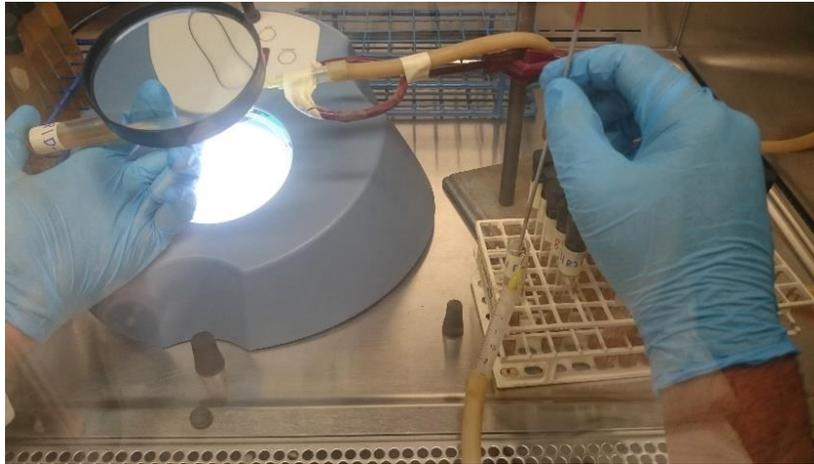


Figura 7. Siembra de medios de cultivo sólidos anaeróbicos en campana de flujo laminar

Para diluir la concentración de microorganismos en la muestra, se usó un método de siembra por estría en 3 secciones. Se depositó una gota de cultivo con asa bacteriológica (color rojo de 3 mm) y se realizó el primer estriado iniciando por la parte más profunda del tubo de cultivo, en seguida, se esterilizó el asa bacteriológica, se reintrodujo al tubo de cultivo y se jaló muestra del primer estriado hacia la mitad del tubo de cultivo y se realizó un segundo estriado horizontal, finalmente, se repitió el procedimiento, pero ésta vez jalando muestra del segundo estriado hacia la salida o borde del tubo de cultivo (Figura 8). La finalidad del procedimiento es diluir la muestra inicial mediante tres estriados a diferente distancia o profundidad y que las colonias de los microorganismos crecieran más separadas y definidas en el medio de cultivo.

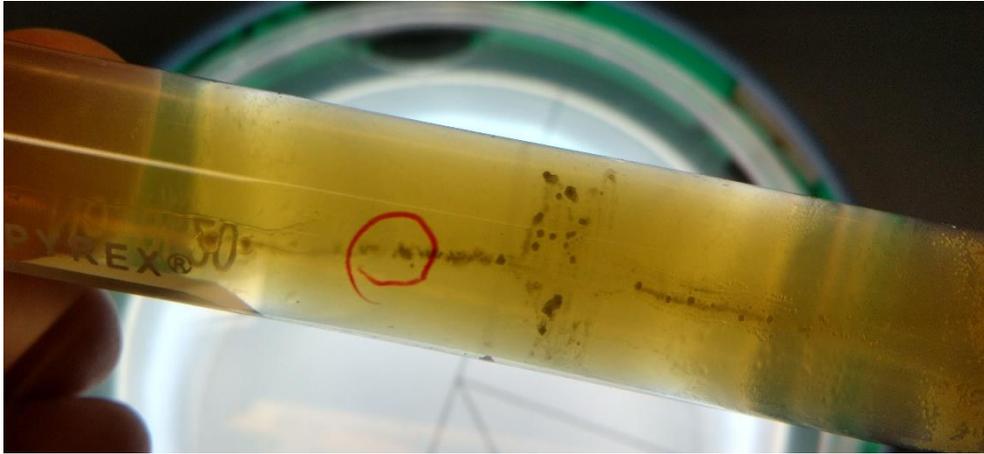


Figura 8. Siembra por estría a diferente profundidad (a las 72 h de incubación)

Los tubos sembrados se incubaron a 39°C y se observaron el crecimiento de las colonias y sus características morfológicas cada 24 h. De las colonias que crecieron, se seleccionaron las más aisladas de otras y se transfirieron a otro tubo con medio de cultivo sólido. El método de siembra de las colonias seleccionadas fue una sola estría, el objetivo fue multiplicar esa colonia libre de otros microorganismos en un solo tubo de cultivo. Todos los procedimientos de observación y siembra se realizaron en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas.

2.4.5 Determinaciones y criterios de selección para las cepas durante el aislamiento de la arquea metanogénica

La detección de CH₄ por espectroscopia de absorción de infrarrojos (LaserMethane mini2, Tokyo Gas Engineering, Japan) fue realizada cada 24 h en un horario fijo en todas las transferencias y en todos los tubos de cultivo inoculados. El infrarrojo se colocaba en la parte gaseosa de los tubos con medio de cultivo, incluso en los medios sólidos se pudo detectar la presencia de gas metano. Tres tubos de cultivo sin inocular fueron usados como blanco (sin CH₄) y su lectura promedio de metano en ppm, se usó como línea base para asignar a los tubos inoculados como positivos a CH₄.

En cada transferencia de medio líquido se realizó el conteo de arqueas metanogénicas. Una muestra de 1 mL de cada tubo de cultivo fue mezclada con 0.25 mL de formaldehído para conservar las metanógenas. Las arqueas metanogénicas se contaron en una cámara Petroff-Hausser (Electron Microscopy Sciences®, Hatfield, PA, USA) en un microscopio de

epifluorescencia (Olympus®, BX51 TRF, Tokyo, Japan) a una magnificación de 1000X en una cámara Petroff-Hausser. La concentración de arqueas metanogénicas (CAM) se estimó con la fórmula: CAM= (promedio conteo directo) (factor de dilución) (2x10⁷).

La selección de colonias de los medios sólidos se realizó en base a la detección de CH₄ por infrarrojo y a la facilidad de cosechar colonias definidas y aisladas (para poder manipularlas y re-sembrar en tubos con medio de cultivo estéril). Finalmente, las colonias re-sembradas y que dieron lecturas positivas a CH₄ se transfirieron al medio de cultivo líquido selectivo e incubados a 39°C durante 72 h para su multiplicación. Sin embargo, no se logró un crecimiento importante en los medios líquidos y se procedió a usar medios sólidos depositados en cajas de Petri para multiplicar las cepas seleccionadas. Se utilizó una jarra de anaerobiosis y sobres de GasPak™ para generar el ambiente anaerobio dentro de la jarra.

2.4.6 Extracción de ADN

Las cepas seleccionadas se sembraron en dos cajas Petri para su multiplicación y posterior extracción de ADN. En una cámara de flujo laminar vertical, se extrajo una colonia con un asa bacteriológica estéril. se mezcló con 30 µL de una solución amortiguadora de lisis, se incubo a 95°C por 5 min, se centrifugó la mezcla a 9,391 x g durante 2 min, el sobrenadante se transfirió a otro vial donde se cuantificó la concentración de ADN en el espectrofotómetro NanoDrop® (Modelo 2000c, Thermo, USA). El ADN se mantuvo en congelación a -20°C hasta su análisis.

2.4.7 Amplificación por PCR del gen ADNr 16S

La amplificación por PCR se realizó con 25 µL de volumen final, los cuales contenían 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 µL 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°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 agarosa al 1.5 % preparado con 1x TAE buffer (Tris Acetato-EDTA) durante una hora. Las bandas fueron observadas en un transiluminador Infinity-3026 WL/LC/26MX.

Se utilizaron 4 iniciadores para la amplificación, 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 25F (5'-CYGGTYGATYCTGCCRG-3'), 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') y 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3').

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 11 se muestran los valores de CH₄ en medio líquido, registrados por espectroscopia de absorción de infrarrojos (LaserMethane mini2, Tokyo Gas Engineering, Japan) durante la primera transferencia. Considerando las experiencias previas, se estableció que lecturas iguales o mayores a 100 ppm de metano, se calificarían como positivas a la presencia de arqueas metanógenas. En el Cuadro 11 se puede observar que en algunos casos a partir de las 48 h de incubación se obtuvieron lecturas positivas, destacando la alta concentración de metano en el medio de cultivo inoculado T1-B3R2 a las 72h de incubación, en el cual se determinó una concentración de 1760 ppm de metano.

Cuadro 11. Detección de CH₄ en la primera transferencia por espectroscopia de absorción de infrarrojos y número de arqueas metanogénicas

Biodigestor (inóculo)	Tiempo de incubación, h	24	48	72	NAM, x 10 ⁸ mL ⁻¹
	ID	ppm de CH ₄			
Sin inóculo	Blanco 1T1	42	58	48	NA
	Blanco 2T1	52	54	34	NA
	Blanco 3T1	36	30	28	NA
Biodigestor 1	T1-B1R1	82	128	509	3.4
	T1-B1R2	50	102	119	2.7
	T1-B1R3	242	84	104	2.3
Biodigestor 3	T1-B3R1	46	93	788	3.9
	T1-B3R2	95	156	1760	2.9
	T1-B3R3	44	75	688	3.4

NAM: Número de arqueas metanogénicas

Los resultados obtenidos en la transferencia 2 se muestran en el Cuadro 12 en promedio, se detectó una mayor cantidad de CH₄ en comparación con la primera transferencia (Cuadro 11) lo que hace inferir que las arqueas metanogénicas se adaptaron al medio de cultivo selectivo y a que su concentración o actividad metanogénica aumentó una potencia de 10⁸ a 10⁹.

Cuadro 12. Detección de CH₄ en la segunda transferencia por espectroscopia de absorción de infrarrojos y número de arqueas metanogénicas

Biodigestor (inóculo)	Tiempo de incubación, h	24	48	72	NAM, x 10 ⁹ mL ⁻¹
	ID	ppm de CH ₄			
Sin inóculo	Blanco 1T2	23	25	42	NA
	Blanco 2T2	44	27	23	NA
	Blanco 3T2	40	35	27	NA
Biodigestor 1	T2-B1R1	1588	2136	2209	3.7
	T2-B1R2	134	2236	2219	2.4
	T2-B1R3	113	1902	1904	2.6
Biodigestor 3	T2-B3R1	546	1856	1834	3.5
	T2-B3R2	495	1712	1802	2.8
	T2-B3R3	594	1815	1785	3.1

NAM: Número de arqueas metanogénicas

En la tercera transferencia, se determinó una mayor concentración de CH₄, desde las 24 h de incubación se obtuvieron lecturas positivas, el incluir antibiótico de amplio espectro en cada una de las transferencias nos hace inferir que en cada transferencia se lleva a cabo una mayor proliferación de arqueas metanogénicas, por el tipo de membrana que poseen. La membrana de las arqueas está constituida por diéteres de glicerol, con cadenas laterales de un grupo denominado fitano, y tetra éteres de glicerol con cadenas laterales de 40 átomos de carbono. Las cadenas de fitano de cada molécula de glicerol están covalentemente unidas lo que hace que se forme una monocapa lipídica, muy resistente a la degradación, además carecen de peptidoglicano por lo que las arqueas presentan una resistencia natural a la lisozima y a la penicilina, agentes que destruyen el peptidoglicano de las bacterias (Madigan *et al.*, 2014).

Cuadro 13. Detección de CH₄ en la tercera transferencia por espectroscopia de absorción de infrarrojos y número de arqueas metanogénicas

Biodigestor (inóculo)	Tiempo de incubación, h	24	48	72	NAM, x 10 ⁹ mL ⁻¹
	ID	ppm de CH ₄			
Sin inóculo	Blanco 1T2	38	36	25	NA
	Blanco 2T2	25	24	16	NA
	Blanco 3T2	41	45	37	NA
Biodigestor 1	T2-B1R1	594	1162	1133	2.4
	T2-B1R2	941	1993	2076	3.7
	T2-B1R3	455	1782	1733	2.8
Biodigestor 3	T2-B3R1	791	1547	2145	3.7
	T2-B3R2	802	1928	2205	2.9
	T2-B3R3	653	1788	3078	3.3

NAM: Número de arqueas metanogénicas

Todos los microorganismos de la tercera transferencia fueron sembrados por duplicado en medio sólido. Y después de cinco resiembras y la selección de colonias con lecturas positivas a metano con el equipo de infrarrojo, se obtuvieron tres colonias puras. Estas colonias crecieron muy pequeñas (menos de 1 mm de diámetro) en los tubos de cultivo, por lo que, se realizó una siembra en cajas Petri donde se obtuvieron colonias de mayor diámetro y separación entre ellas.

Las tres colonias seleccionadas presentaron diferente morfología, identificada como sigue:

OP: Colonia opaca de casi 1 mm de diámetro y otras colonias más pequeñas similares, bordes completos y de poco crecimiento.

Alg: Colonias cristalinas de apariencia algodonosa, bordes completos de 1 mm de diámetro las más grandes, forman conglomerados.

Lech: colonias de aspecto lechoso, blanquecinas, bordes completos de menos de 1 mm de diámetro.

La observación al microscopio de epifluorescencia de las metanógenas de cada una de las tres cepas aisladas, confirmo su capacidad de exhibir fluorescencia. En la Figura 9 se muestra la fluorescencia de las metanógenas de la cepa Alg, que está formada por cocobacilos en

cadena de hasta 6 células que de manera frecuente se observaron formando una especie de “X”.

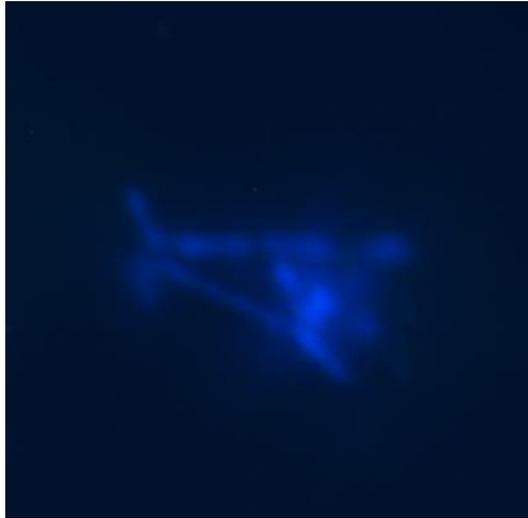


Figura 9. Cadenas de cocobacilos con fluorescencia de la cepa Alg

La cepa Op se observó al microscopio de contraste de fases, las células tuvieron fluorescencia y un arreglo en sarcinas característico del género *Methanosarcina*, sin embargo, se observaban muy pocas células (Figura 10).

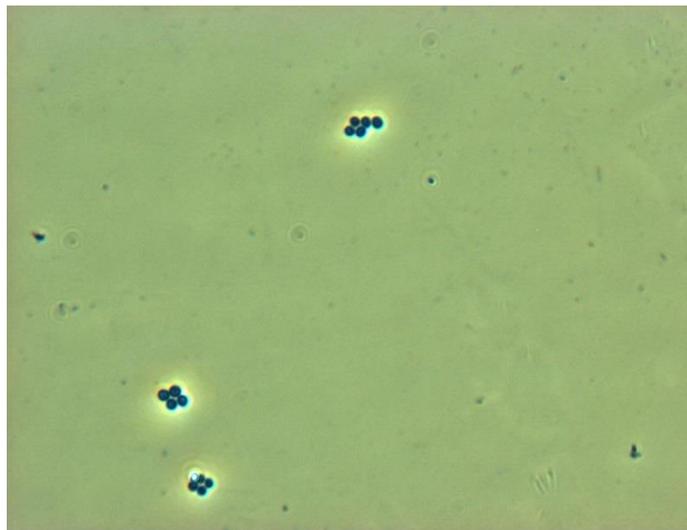


Figura 10. células de la cepa Op vistas en contraste de fases, arreglo en sarcina.

La cepa Lech presentó una forma de cocobacilos y di cocobacilos, sin formar cadenas, se observó fluorescencia y un número considerable de células (Figura 11)

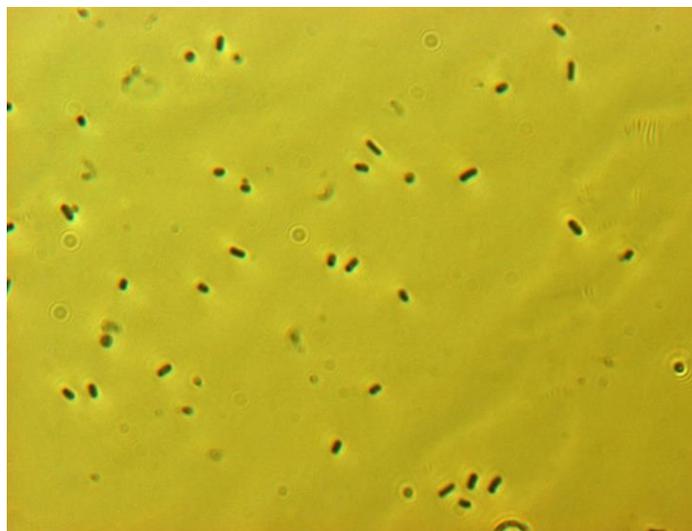


Figura 11. Cepa Lech observada al microscopio de contraste de fases

El aislamiento de arqueas metanogénicas es complicado por las condiciones de anaerobiosis que demandan. En la mayoría de los reportes que se consultaron para el aislamiento de metanógenos, se usan los gases H_2 y CO_2 para generar una atmósfera fundamental para la formación de CH_4 ; sin embargo, debido a la dificultad y peligros en el manejo del gas H_2 , en el presente experimento se mantuvo la atmósfera de H_2 y CO_2 mediante la inclusión de formato de sodio en los medios de cultivo.

En el Laboratorio de Biotecnología de Semillas, se extrajo el ADN de las tres colonias de metanógenas seleccionadas. Sin embargo, no se logró amplificar el ADN con cuatro cebadores universales para bacterias (8F, 25F, 27F y 1492R). Se solicitaron otros cebadores para arqueas, pero debido al percance del terremoto del 19 de septiembre de 2017 los ultra-congeladores del laboratorio quedaron sin energía eléctrica por 2 días y se desnaturalizaron las muestras de ADN.

Se intentó volver a resembrar las cepas, pero la calidad no fue la adecuada para el proceso de amplificación. Por tanto, la identificación genética de las cepas metanógenas aisladas queda pendiente

2.6 CONCLUSIONES

Mediante un método de transferencias en un medio líquido y sólido selectivo para metanógenas, se logró el aislamiento de tres cepas que resultaron positivas a las pruebas de producción de metano y fluorescencia al microscopio y arreglos celulares similares a los reportes de arqueas metanogénicas. A pesar que el dominio bacteria comparte homología genética con el dominio Archaea, se comprueba que los cebadores universales para bacterias no son útiles para arqueas metanogénicas.

Literatura citada

- Cheng, L., L. Dai, X. Li, H. Zhang, and Y. Lu. 2011. Isolation and characterization of *Methanothermobacter crinale* sp. nov., a Novel hydrogenotrophic methanogen from the Shengli oil field. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5212–5219.
- Fielding, E. R., D. B. Archer, E. C. Macario, and A. J. L. Macario. 1988. Isolation and characterization of methanogenic bacteria from landfills. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:835–836.
- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 46:205–229.
- Kavitha, S., L. R. Gopinath and M. Christy. 2014. Isolation of methanogens from termite gut and its role in biogas production by using poultry waste. *Int. J. Plant, Anim. and Env. Sci.* 4(4).
- Khelaifia, S., D. Raoult, and M. Drancourt. 2013. A Versatile medium for cultivating methanogenic archaea. *PLoS One.* 8(4): e61563.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, and D. A. Stahl. 2014. *Brock Biology of Microorganisms.* 14th ed. Pearson Education, Inc., Illinois, USA.
- Miller, T. L., and M. J. Wolin. 1974. A Serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* 27:985–987.
- Miller, T. L., M. J. Wolin, and E. A. Kusel. 1986. Isolation and characterization of methanogens from animal feces. *Syst. Appl. Microbiol.* 8:234–238.
- Miller, T. L., M. J. Wolin, E. C. de Macario, and A. J. Macario. 1982. Isolation of

- Methanobrevibacter smithii from human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:227–232.
- Smith, P. H., and R. E. Hungate. 1958. Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium* N. SP. *J. Bacteriol.* 75:713–718.
- Surakasi, V. P., A. A. Wani, Y. S. Shouche, and D. R. Ranade. 2007. Phylogenetic analysis of methanogenic enrichment cultures obtained from Lonar Lake in India: isolation of *Methanocalculus* sp. and *Methanoculleus* sp. *Microb. Ecol.* 54:697–704.
- Winter, J. 1983. Maintenance of stock cultures of methanogens in the laboratory. *Syst. Appl. Microbiol.* 4:558–563.
- Wolfe, R. S., and W. W. Metcalf. 2010. A vacuum-vortex technique for preparation of anoxic solutions or liquid culture media in small volumes for cultivating methanogens or other strict anaerobes. *Anaerobe.* 16:216–219.

CAPÍTULO III. EFECTO DE DISTINTAS FUENTES DE INÓCULO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO* DE ESTIÉRCOL DE VACAS HOLSTEIN

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr. en C.

3.1 RESUMEN

La adición de inóculos de arqueas metanogénicas en biodigestores tiene potencial para mejorar la producción de metano durante la digestión anaeróbica (DA). Se utilizaron como inóculos fluido ruminal, lodos de biodigestores y microorganismos aislados de estos sustratos. El objetivo de este estudio, fue evaluar el efecto de tres inóculos sobre el potencial bioquímico de metano (PBM) de biorreactores alimentados con estiércol de vacas Holstein. Se evaluó: un consorcio de arqueas metanogénicas (CAM), lodo activo de biodigestores (LB) y fluido ruminal de vacas lecheras (FR). Los tratamientos (T) evaluados fueron: T1 (control) = biorreactor alimentado con estiércol de vacas Holstein, T2= T1+ 1.5 mL de CAM, T3= T1+ 1.5 mL de LB, y T4= T1+ 1.5 mL de FR. De acuerdo al modelo de Gompertz modificado, el PBM entre tratamientos fue similar ($p \geq 0.05$). Sin embargo, el T2 (CAM) tuvo la mayor proporción de metano (59.83%) en el biogás que produjo, indicando una mayor eficiencia en la DA. También, tuvo el potencial óxido-reducción más negativo (-311.73 mV) y una menor producción de propionato (783.83 mg L^{-1}) que los tratamientos T1 y T4. Se estima que la dosis de inóculos que se agrego a los biorreactores no fue suficiente para producir un cambio significativo en el PBM. Se sugiere evaluar el efecto de dosis de los inóculos mayores a las evaluadas en este estudio.

Palabras clave: Arqueas metanogénicas, potencial bioquímico de metano, biodigestores.

EXPERIMENT III. EFFECT OF DIFFERENT SOURCES OF INOCULUM IN THE *IN VITRO* METHANE PRODUCTION FROM HOLSTEIN COW MANURE

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr. En C.

3.2 ABSTRACT

The addition of methanogenic archaea as inoculum in biodigesters has the potential to improve methane production during the anaerobic digestion (AD). Rumen fluid, biodigester sludge and microorganisms isolated from these substrates have been used as inoculum. The objective of this study was to evaluate the effect of three inoculums on the biochemical methane potential (BMP) of bioreactors fed with manure from cows. A consortium of methanogenic archaea (CMA), active sludge from biodigesters (SB) and ruminal fluid from dairy cows (RF) were evaluated. The treatments (T) evaluated were: T1 (control) = bioreactor fed with Holstein cow dung, T2 = T1 + 1.5 mL of CMA, T3 = T1 + 1.5 mL of SB, and T4 = T1 + 1.5 mL of RF. According to the modified Gompertz model, the BMP among treatments was similar ($p \geq 0.05$). However, T2 (CMA) had the highest proportion of methane (59.83%) in the biogas, indicating greater efficiency in DA. Also, it had the most negative oxide-reduction potential (-311.73 mV) and a lower production of propionate (783.83 mg L⁻¹) than the T1 and T4 treatments. It is likely that the dose of inoculum that was added to the bioreactors was not sufficient to produce a significant change in BMP. It is suggested to evaluate the effect of doses of inoculum greater than those evaluated in this study.

Key words: Methanogenic archaea, biochemical methane potential, biodigesters.

3.3 INTRODUCCIÓN

La adición de inóculos en sistemas biodigestores para favorecer la digestión anaeróbica (DA) y la producción de metano ha sido evaluada usando microorganismos presentes en fluido ruminal y lodos de biodigestores (Alrawi *et al.*, 2011; Ozbayram *et al.*, 2018; Yue *et al.*, 2012), consorcio de bacterias celulolíticas (Ozbayram *et al.*, 2018) y arqueas metanogénicas como *Methanosarcina spp.* (Lins *et al.*, 2014). Sin embargo, la utilidad de estos inóculos todavía esta en debate.

La metanogénesis es el último paso de la DA que se da en los biodigestores, donde las arqueas metanogénicas (AM) son las responsables de transformar sustratos como el H₂, CO₂ y el acetato en metano (Bharathiraja *et al.*, 2018). La proporción de metano en el biogás producido de la DA varía entre 30-65% y esta influenciada por el tipo de sustrato que se utiliza (Fantozzi y Buratti, 2009), las condiciones de operación de los biodigestores, y la población y tipo de AM presentes en el biodigestor (Kushkevych *et al.*, 2018).

Dentro del sector agropecuario, el manejo del estiércol es la segunda fuente de emisiones de gases efecto invernadero (GEI) después del CH₄ entérico emitido por los rumiantes (Aguirre-Villegas y Larson, 2017). El manejo del estiércol resulto en la emisión de 50.9 Mt CO₂-eq·a⁻¹ de GEI a nivel mundial entre los años 2000 a 2014 con una tasa de incremento anual de 0.6 Tg CO₂ eq·yr·yr⁻¹, esta cantidad represento el 4% de las emisiones de GEI del sector ganadero (Dangal *et al.*, 2017). Se estima que el manejo del estiércol mediante la DA puede reducir el las emisiones de GEI en un 25% en comparación al manejo del estiércol que consiste en su almacenamiento, secado y aplicación como abono en los campos de cultivo (Holly *et al.*, 2017).

Las políticas en la Unión Europea relacionadas al fomento energías renovables estiman que 20% de la energía de fuentes alternas renovables se producirá a partir de sistemas de producción biogás (Holm-Nielsen *et al.*, 2009). El objetivo del presente estudio, fue evaluar el efecto de tres diferentes fuentes de inóculo (consorcio de arqueas metanogénicas, lodos activos de biodigestores y fluido ruminal) sobre la producción de metano en biorreactores alimentados con estiércol de vacas Holstein.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Fuentes de inóculos

3.4.1.1 Consorcio de arqueas metanogénicas (CAM)

El medio de cultivo selectivo para arqueas metanogénicas (MCSM) contenía: 30 mL de fluido ruminal clarificado (fluido ruminal fresco centrifugado a 12 857 g por 10 min y esterilizado 15 min a 121 °C y 15 psi), 5 mL de solución mineral I [6 g de K_2HPO_4 (Sigma) en 1L de H_2O destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH_2PO_4 (Sigma); 6g $(NH_4)_2SO_4$ (Merck); 12 g NaCl (Sigma-Aldrich); 2.45 g $MgSO_4$ (Sigma); y 1.6 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma) en 1L de H_2O destilada], 0.1 mL de resazurina al 0.1 % (Sigma-Aldrich), 0.2 g de peptona de soya (Merck), 0.1 g de extracto de levadura (Sigma), 6 mL de solución sulfido-cisteína [2.5 g de L-cisteína (Sigma) en 15 mL de NaOH 2 N + 2.5 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ (Meyer) aforado en 100 mL de H_2O destilada], 6 mL de solución al 8 % de Na_2CO_3 (Baker), 0.5 g de formato de sodio (Sigma), 11.5 μL de Coenzima M [solución ácido 2-mercaptoetanol sulfónico (Sigma)], 1 mL de antibiótico [250 mg de dihidroestreptomina y 200, 000 UI de penicilina G], 0.1 mL de hemina [0.010 g de hemina en 100 mL de NaOH al 0.005 N, esterilizado 15 min a 121 °C y 15 psi], 1 mL de solución de minerales traza [70 mg de $ZnCl_2$; 100 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 6 mg de H_3BO_3 ; 190 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 2 mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 24 mg de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ y 36 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ por 1L de H_2O destilada] y 52.6 mL de H_2O destilada. El medio de cultivo se preparó bajo flujo de CO_2 .

Diez tubos de 18 x 150 mm (PIREX®, México) con 9 mL de MCSM, se inocularon bajo flujo de CO_2 con 1 mL de lodos de un biodigestor activo (Cuadro 1), de la unidad experimental de biodigestores del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo. Se incubaron 72 h a 39 °C y se cuantificó la producción de CH_4 dentro del tubo inoculado por espectroscopia de absorción de infrarrojos (EAI) (LaserMethane mini2, Tokyo Gas Engineering, Japan) cada 24 h.

Para realizar una presión de selección de arqueas metanogénicas, se transfirió 1 mL de cada tubo a otros diez tubos con 9 mL de MCSM estéril, se incubó a 39 °C durante 72 h y cada 24 se detectó CH_4 dentro del tubo por EAI.

Se realizaron tres transferencias para obtener el CAM con capacidad de producir en promedio de 2,500 ppm de CH₄ por tubo detectado por EAI.

3.4.1.2 Lodos de biodigestores (LB)

Se colectó una muestra de 20 L de los efluentes de un biodigestor de 1000 L de capacidad (Cuadro 14) de la unidad experimental de biodigestores, se homogenizó y se tomó un alícuota de 2 L. En el laboratorio, se filtró la alícuota y se incubó a 39°C durante 3 h para mantener la misma temperatura que los biorreactores que se iban a inocular.

Las mediciones de CH₄, H₂S, CO₂ y temperatura de la fase gaseosa del biodigestor se realizó con el analizador Optima 7 biogás (MRU® Air emission monitoring systems, Germany). Las mediciones de pH, potencial óxido-reducción, oxígeno disuelto, sólidos totales disueltos y temperatura de fase líquida se realizaron con el monitor de calidad de agua Horiba® (model U-5000, Japan).

Cuadro 14. Características físico-químicas del biodigestor con capacidad de 1000 L y 700 L de volumen de trabajo de la unidad experimental

Parámetros	Unidad	Biodigestor
ST	%	3.96 ± 0.02
SV/ST	%	59.95 ± 0.005
Cenizas	%	1.58 ± 0.009
CH ₄	%	52.82
H ₂ S	ppm	1336
CO ₂	%	40.09
Temperatura fase gaseosa	°C	37.7
pH		7.6
Potencial óxido-reducción	mV	-321
Oxígeno disuelto	mg L ⁻¹	4.92
Sólidos totales disueltos	g L ⁻¹	8.84
Temperatura fase líquida	°C	19.23

3.4.1.3 Fluido ruminal (FR)

Se extrajeron 200 mL de fluido ruminal de una vaca Holstein con cánula ruminal alimentada con alfalfa (*Medicago sativa*), la muestra se depositó en un termo a 39 °C, y se traslado al laboratorio. Posteriormente se filtró y se incubó a 39 °C durante 3 h para mantener la misma temperatura que los biorreactores a inocular.

3.4.2 Procedimiento experimental

El experimento fue realizado en biorreactores de 120 mL de capacidad con un volumen de trabajo de 60 mL cada uno. Se adicionaron 60 mL de la fase líquida de un biodigestor de la unidad experimental (Cuadro 15), se incubaron a 39 °C durante siete días para estabilizarlos, determinar sus características fisicoquímicas y de producción de biogás y metano (Cuadro 2).

Los tratamientos incluyeron tres inóculos T1=Control (sin inóculo), T2= T1+ 1.5 mL CAM, T3= T1+ 1.5 mL LB y T4= T1+ 1.5 mL FR, con seis repeticiones por tratamiento. El día siete de incubación los biorreactores se destaparon bajo flujo de CO₂ y se agregaron 15 mL de estiércol de vaca Holstein: agua (1:1) en el T1, mientras que, en T2, T3 y T4 se agregaron 1.5 mL del inóculo correspondiente mas 13.5 mL de la mezcla de estiércol: agua. En todos los tratamientos, se retiró un volumen igual al adicionado (15 mL).

Los biorreactores se incubaron siete días a 39 °C y cada 24 h se midió el volumen de biogás desplazado de acuerdo a la metodología descrita por Cobos-Peralta *et al.* (2018). El biogás y la cantidad de metano acumulado se estimó bajo a 1 atm de presión y 39°C.

Al termino de la incubación (72 h) los biorreactores se destaparon para medirles directamente el pH y potencial óxido-reducción, y se colectaron muestra para determinar ácidos grasos volátiles (AGV), número de bacterias totales (NBT), y número de arqueas metanogénicas (NAM).

Cuadro 15. Características físico-químicas iniciales de los biorreactores de cada tratamiento, inóculos y sustrato.

Variable	-----Biorreactores-----				-----Inóculos-----			Sustrato
	Control	CAM	LB	FR	CAM	LB	FR	Estiérco 1
ST, %	4.52 ± 0.11	4.57 ± 0.11	4.43 ± 0.19	4.32 ± 0.05	NA	NA	NA	8.41 ± 0.04
SV/ST, %	63.94 ± 0.007	63.87 ± 0.01	62.75 ± 0.007	61.35 ± 0.005	NA	NA	NA	79.26 ± 0.002
Cenizas, %	1.63 ± 0.01	1.65 ± 0.01	1.65 ± 0.05	1.67 ± 0.04	NA	NA	NA	1.74 ± 0.03
pH	7.62 ± 0.05	7.67 ± 0.04	7.67 ± 0.09	7.72 ± 0.06	7.39 ± 0.02	7.52 ± 0.03	6.88 ± 0.04	NA
ORP	-297.08 ± 12.81	-311.01 ± 5.17	-300.63 ± 10.31	-305.25 ± 3.61	-286.66 ± 7.42	-315 ± 6.42	-200.17 ± 5.32	NA
Acetato, mg L ⁻¹	483.16	425.91	402.22	524.47	695.26	54.88	3276.26	1276.62
Propionato, mg L ⁻¹	168.12	137.03	133.23	201.28	321.91	0	2011.60	490.46
Butirato, mg L ⁻¹	94.07	62.93	32.66	191.21	246.52	0	2991.35	496.52
NBT, x 10 ⁹ mL ⁻¹	102	85.2	79.2	79.2	2.2	49	32	NA
NAM, x 10 ⁹ mL ⁻¹	18.4	17.6	17.6	15.2	1.8	6.2	2.4	NA

NA: No Analizado; ST: Sólidos totales; SV: Sólidos volátiles; NBT: Número de bacterias totales; NAM: Número de arqueas metanogénicas

3.4.3 Métodos analíticos

El contenido de ST y SV fue determinado usando los métodos estándar de (APHA/AWWA/WEF, 2005). El pH se midió con un potenciómetro (ORION® modelo 250^a) calibrado a pH 4 y 7. El potencial óxido-reducción (ORP) fue medido con un potenciómetro (ORION® modelo 710^a) calibrado con una solución +220 de óxido-reducción. Los ácidos grasos volátiles (AGV) se obtuvieron utilizando una muestra de los efluentes (2 mL)

acidificada con HPO₃ (0.5 mL al 25 %) y centrifugada a 18, 800 g por 10 min (Hettich Zentrifugen EBA21, Alemania). El sobrenadante se inyectó con un automuestreador (1μL) a un cromatógrafo de gases (PerkinElmer® Clarus 500) con un detector de ionización de flama (FID) y columna capilar (Elite FFAP PerkinElmer®), temperatura de horno, 115 °C por 0.25 min, 125 °C por 0.5 min y 130 °C por 5.25 min, la temperatura de la columna fue 250 °C, el gas acarreador fue nitrógeno (8 psi) y aire e hidrógeno para la combustión de la flama. Tiempos de retención: 1.3, 1.6 y 2.15 min para el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, respectivamente. La proporción de CH₄ y CO₂ se determinó en un cromatógrafo de gases (PerkinElmer® Clarus 500) con inyección manual de 300 μL del espacio de cabeza de cada biorreactor. Las condiciones de operación fueron: temperatura de horno, 80 °C, columna empacada (PKD), 170 °C y detector de conductividad térmica, 130 °C. Tiempos de retención: 0.68 min para CH₄ y 1.05 min para CO₂ y gas acarreador Helio, flujo 23 mL m⁻¹.

Una muestra de 1 mL de cada biorreactor fue mezclada con 0.25 mL de formaldehído para medir NBT y NAM. Las bacterias y arqueas metanogénicas se observaron y contaron en una cámara Petroff-Hausser (Electron Microscopy Sciences®, Hatfield, PA, USA) en un microscopio (Olympus®, BX51 TRF, Tokyo, Japan) a una magnificación de 1000X acoplado a una lámpara de mercurio. La NBT y NAM se calculó con la fórmula: NBT o NAM= (promedio conteo directo) (factor de dilución) (2x10⁷).

3.4.4 Modelo y análisis estadístico

Los resultados de producción de metano se ajustaron al modelo modificado de Gompertz (Meneses-Reyes *et al.*, 2017; Zwietering *et al.*, 1990) que se presenta en la ecuación 1 (Ecu. 1).

$$AMY = BMP \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{BMP} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad \text{Ecu. 1}$$

AMY es el rendimiento acumulado de metano (mL CH₄ g⁻¹SValimentados) al tiempo t (d), BMP es el potencial bioquímico de metano (mL CH₄ g⁻¹SValimentados), μ_m es la velocidad de producción de metano por día (mL CH₄ g⁻¹SValimentados d⁻¹), e es la constante matemática (2.718282), λ es el tiempo de la fase lag (d), t es el tiempo de digestión. Todos los modelos de regresión se ajustaron usando SigmaPlot versión 13.0. Un diseño completamente al azar (CA) fue utilizado para las variables biogás, CH₄ (%), CH₄ (mL), pH, ORP, AGV, NBT,

NAM y el modelo Gompertz modificado PBM, μ_m y λ . NBT y NAM se transformó con Log 10, con la finalidad de cumplir con la normalidad y homogeneidad de los datos. CA se realizó con el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Los promedios se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ORP en los tratamientos inoculados fue menor ($p \leq 0.05$) que el tratamiento testigo, sin embargo, en todos los tratamientos se mantuvo un valor ORP negativo adecuado para lograr el crecimiento de microorganismos anaerobios, y por tanto lo que un adecuado proceso de digestión anaerobia.

La Figura 12 muestra la producción acumulada de metano en los diferentes tratamientos durante los 7 días de incubación. Los biorreactores de todos los tratamientos presentan una fase lag (λ) corta (12 h), debido a que el microbioma presente en los biorreactores ya estaba activo.

Meneses-Reyes *et al.* (2017) reportan 17 d de adaptación o fase lag, debido a que utilizaron sólo el sustrato con el inóculo, además las proporciones de inóculo que usaron fueron del 10% de inóculo, mientras que nosotros solo adicionamos 1% del cada inóculo de los biorreactores. La producción de metano fue similar entre los tratamientos, sin embargo, el tratamiento CAM tuvo mayor ($p \leq 0.05$) rendimiento de metano acumulado (AMY).

Ozbayram *et al.* (2018) reportan un AMY de 132 y 125 mL CH₄ g⁻¹sv cuando se adicionó FR y LB como inóculo en biodigestores alimentados con estiércol de vaca. La diferencia con este estudio es que, sólo duró 7 días de incubación, además, ellos utilizaron una proporción 1:1 de inóculo: sustrato, es decir 50% de inóculo, mientras que, en este estudio, el inóculo representó solamente el 1% del volumen total.

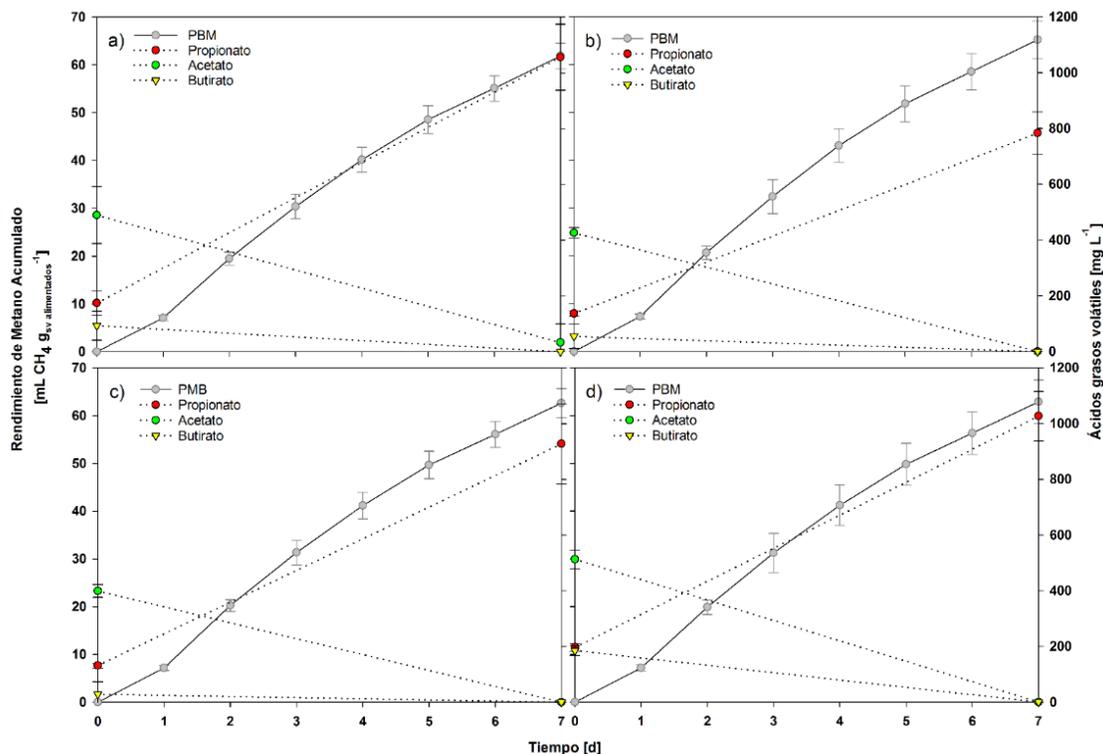


Figura 12. Rendimiento de metano acumulado y ácidos grasos volátiles durante el experimento.

a) Control; b) Consorcio arqueas metanogénicas; c) Lodos de biodigestores; d) Fluido ruminal.

El PBM mejora cuando se utiliza una combinación de fluido ruminal, estiércol de vaca y un consorcio bacteriano celulolítico (Ozbayram *et al.*, 2018). La utilización de diferentes inóculos no mejoró el PBM utilizando de sustrato el estiércol de ganado lechero, sin embargo, se reportan mayor producción de biogás y metano en co-digestión con ensilados de pasto (Himanshu *et al.*, 2018).

En la Figura 12 se observa como el acetato fue consumido en todos los tratamientos, lo que indica predominancia de la metanogénesis acetoclástica en los biorreactores. El tratamiento control, fue el único que no se consumió todo el acetato. Yıldırım *et al.* (2017) reportan en un estudio con biodigestores alimentados con estiércol y utilizando hongos ruminales, que el acetato se consume entre los 10 y 20 días de incubación. La co-digestión de micro algas y glicerol con pollinaza los primeros 10 a 20 días incrementa la producción de acetato y propionato, pero el acetato disminuye notablemente a los 30 d en promedio, en cambio la concentración de propionato se mantiene hasta los 70 días (Meneses-Reyes *et al.*, 2017).

En la presente investigación, el propionato aumento en todos los tratamientos durante los 7 d de incubación y no se observó una disminución en su concentración. El butirato en todos los tratamientos se consumió. Existen reportes que indican que la acumulación de ácidos grasos volátiles en los biodigestores, pueden disminuir el pH e inhibir la actividad metanogénica, sobre todo en biodigestores alimentados con estiércol de vaca (Ozbyram *et al.*, 2018). El estiércol de vaca produce menos biogás en comparación con el estiércol de cerdo y la pollinaza (Fantozzi y Buratti, 2009). El 90% del rendimiento de metano del estiércol de vaca puede ser obtenido después de 20 d de digestión (El-Mashad y Zhang, 2010).

Cuadro 16. Parámetros del modelo Gompertz modificado determinado de los datos experimentales

Tratamiento	PBM [mL CH ₄ g ⁻¹ ¹ SValimentados]	Media μ _m [mL CH ₄ g ⁻¹ ¹ SValimentados d ⁻¹]	Media λ [d]	R ²
Control	60.43	11.98	0.52	0.997
				0.997
				0.996
				0.996
				0.990
CAM	63.82	12.96	0.54	0.995
				0.998
				0.997
				0.997
				0.992
LB	61.21	12.35	0.51	0.997
				0.997
				0.997
				0.996
				0.991
FR	61.51	12.39	0.53	0.997
				0.997
				0.996
				0.996
				0.992
EEM	0.692	0.252	0.013	
P	0.359	0.603	0.858	

EEM: Error estándar de la media; CAM: Consorcio de arqueas metanogénicas; LB: Lodos de biodigestores; FR: Fluido ruminal

La producción de biogás fue menor ($p \leq 0.05$) utilizando el CAM; al mismo tiempo, fue el tratamiento que mayor producción de metano ($p \leq 0.05$), como resultado global, al final no se observaron diferencias en la producción de metano entre tratamientos (Cuadro 17). Las variables físico-químicas medidas en los biorreactores fueron similares a lo que se reporta en otros experimentos (Bayané y Guiot, 2011).

Cuadro 17. Producción de biogás, metano y variables físico químicas finales de los biorreactores

Variable	Control	CAM	LB	FR	EEM	P
Biogás, mL	323.15 a	264.83 b	325.65 a	331.15 a	6.543	< 0.0001
CH ₄ , %	57.15 b	59.83 a	57.62 b	57.77 b	0.287	0.0008
CH ₄ , mL	131.62	138.77	133.32	133.81	1.568	0.43
pH	7.64	7.67	7.7	7.72	0.01	0.09
ORP, mV	-300.71 a	-311.73 b	-305.68 ab	-306 ab	1.4	0.03
NBT, x 10 ¹⁰	11.64 a	8.64 a	3.96 b	10.2 a	0.044	< 0.0001
NAM, x 10 ¹⁰	1.84	1.76	1.4	1.68	0.019	0.15
Propionato, mg L ⁻¹	1055.89 a	783.83 b	927.86 ab	1026.76 a	30.465	0.0015

a, b Letras con diferente literal en la misma fila son diferentes ($P < 0.05$); EEM: Error estándar de la media; CAM: Consorcio de arqueas metanogénicas; LB: Lodos de biodigestores; FR: Fluido ruminal; ORP: Potencial óxido reducción; NBT: número de bacterias totales; NAM: número de arqueas metanogénicas

Se estima que la inoculación con CAM hace más eficiente la producción de metano debido al aumento en la producción del mismo, quizás, por que durante la fermentación de la materia orgánica se produce una menor cantidad de propionato. El propionato es un intermediario clave en la DA y sustrato de las bacterias sulfato reductoras (BSR), éstas a su vez compiten por sustratos con las AM, por lo que el propionato se vuelve clave en dicha competencia favoreciendo a las BSR y disminuyendo la AYM en los biodigestores (Chen *et al.*, 2008).

Bajo condiciones mesofílicas, la co-digestión con fluido ruminal hace más efectiva la producción de metano en comparación a la mono-digestión (Alrawi *et al.*, 2011). En el presente estudio el fluido ruminal no influyó en la producción de metano. También se ha reportado que el fluido ruminal aumenta el rendimiento de productos (ácidos grasos volátiles

y metano) en biodigestores alimentados con plantas acuáticas (Yue *et al.*, 2012); sin embargo, en la presente investigación no se observó dicho aumento en los productos de la DA.

El porcentaje de metano obtenido en el presente estudio (58.09%) es mayor al reportado por Wall *et al.* (2015), quienes en biodigestores con diferentes tamaños de partícula de ensilado de pasto y fluido ruminal reportan 48.27%, aunque indican un AYM mayor (371 mL CH₄ g⁻¹ SValimentados) al encontrado en este estudio, debido en gran parte al tiempo de incubación de cada estudio. Kushkevych *et al.* (2018) reportan 49.4% de metano en promedio en biodigestores con alimentados con diferentes sustratos, dentro de los que se incluye estiércol de vaca y pollinaza, con una dominancia del género *Methanoculleus* spp. Lins et al. (2014) reportan concentraciones de arqueas metanogénicas de 3.16 x 10⁸ copias por mL, mientras que nosotros cuantificamos 1.67 x 10¹⁰ células por mL, aunque es difícil comparar la concentración de microorganismos en los biorreactores y concluir sobre su efecto en la producción de biogás y metano.

3.6 CONCLUSIONES

A pesar de no encontrar diferencias en el PBM entre tratamientos con y sin inóculo, el tratamiento CAM presentó la menor producción de biogás, la mayor proporción de metano (59.83%), y potencial de óxido-reducción más negativo (-311.73 mV) que el control, y una menor concentración de propionato (783.83 mg L⁻¹) que el control y FR.

Literatura citada

- Aguirre-Villegas, H.A., Larson, R.A., 2017. Evaluating greenhouse gas emissions from dairy manure management practices using survey data and lifecycle tools. *J. Clean. Prod.* 143, 169–179.
- Alrawi, R.A., Ahmad, A., Ismail, N., Kadir, M.O.A., 2011. Anaerobic co-digestion of palm oil mill effluent with rumen fluid as a co-substrate. *Desalination* 269, 50–57.
- APHA/AWWA/WEF, 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st ed. American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

- Bayané, A., Guiot, S.R., 2011. Animal digestive strategies versus anaerobic digestion bioprocesses for biogas production from lignocellulosic biomass. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10, 43–62.
- Bharathiraja, B., Sudharsana, T., Jayamuthunagai, J., Praveenkumar, R., Chozhavendhan, S., Iyyappan, J., 2018. Biogas production – A review on composition, fuel properties, feed stock and principles of anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 90, 570–582.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S., 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technol.* 99, 4044–4064.
- Cobos-Peralta, M.A., Curzaynz-Leyva, K.R., Rivas-Martínez, M.I., Santillán-Gómez, E.A., Bárcena, J.R., 2018. In vitro effect of diets for growing lambs supplemented with dried distillers grains on rumen fermentation and gas emissions. *Agrociencia* 52(2):203-215.
- Dangal, S.R.S., Tian, H., Zhang, B., Pan, S., Lu, C., Yang, J., 2017. Methane emission from global livestock sector during 1890-2014: Magnitude, trends and spatiotemporal patterns. *Glob. Chang. Biol.* 23, 4147–4161.
- El-Mashad, H.M., Zhang, R., 2010. Biogas production from co-digestion of dairy manure and food waste. *Bioresour. Technol.* 101, 4021–4028.
- Fantozzi, F., Buratti, C., 2009. Biogas production from different substrates in an experimental Continuously Stirred Tank Reactor anaerobic digester. *Bioresour. Technol.* 100, 5783–5789.
- Himanshu, H., Murphy, J.D., Grant, J., O’Kiely, P., 2018. Antagonistic effects on biogas and methane output when co-digesting cattle and pig slurries with grass silage in in vitro batch anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy* 109, 190–198.
- Holly, M.A., Larson, R.A., Powell, J.M., Ruark, M.D., Aguirre-Villegas, H., 2017. Greenhouse gas and ammonia emissions from digested and separated dairy manure during storage and after land application. *Agric. Ecosyst. Environ.* 239, 410–419.

- Holm-Nielsen, J. B., Al Seadi, T., and Oleskowics-Popiel, P. 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresour. Technol.* 100(22), 5478–5484.
- Kushkevych, I., Vítězová, M., Vítěz, T., Kováč, J., Kaucká, P., Jesionek, W., Bartoš, M., Barton, L., 2018. A new combination of substrates: biogas production and diversity of the methanogenic microorganisms. *Open Life Sci.* 13, 119–128.
- Lins, P., Reitschuler, C., Illmer, P., 2014. *Methanosarcina* spp., the key to relieve the start-up of a thermophilic anaerobic digestion suffering from high acetic acid loads. *Bioresour. Technol.* 152, 347–354.
- Meneses-Reyes, J.C., Hernández-Eugenio, G., Huber, D.H., Balagurusamy, N., Espinosa-Solares, T., 2017. Biochemical methane potential of oil-extracted microalgae and glycerol in co-digestion with chicken litter. *Bioresour. Technol.* 224, 373–379.
- Ozbayram, E.G., Akyol, Ince, B., Karakoç, C., Ince, O., 2018. Rumen bacteria at work: bioaugmentation strategies to enhance biogas production from cow manure. *J. Appl. Microbiol.* 124, 491–502.
- Wall, D.M., Straccialini, B., Allen, E., Nolan, P., Herrmann, C., O’Kiely, P., Murphy, J.D., 2015. Investigation of effect of particle size and rumen fluid addition on specific methane yields of high lignocellulose grass silage. *Bioresour. Technol.* 192, 266–271.
- Yıldırım, E., Ince, O., Aydın, S., Ince, B., 2017. Improvement of biogas potential of anaerobic digesters using rumen fungi. *Renew. Energy* 109, 346–353.
- Yue, Z.B., Wang, J., Liu, X.M., Yu, H.Q., 2012. Comparison of rumen microorganism and digester sludge dominated anaerobic digestion processes for aquatic plants. *Renew. Energy* 46, 255–258.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I. I., Rombouts, F.M., Van’t Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Env. Microbiol* 56, 1875–1881.

CAPÍTULO IV. EFECTO DE DISTINTAS DOSIS DE ARQUEAS METANOGÉNICAS EN LA PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO* DE ESTIÉRCOL DE VACAS HOLSTEIN

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr. en C.

4.1 RESUMEN

El consorcio de arqueas metanogénicas (CAM) disminuyó la producción de biogás, pero aumento la proporción de metano (CH₄) en un experimento previo. El objetivo del presente experimento fue determinar la cantidad de CAM que pueda aumentar la producción de CH₄ y biogás en biorreactores alimentados con estiércol de vaca Holstein bajo condiciones mesofílicas. Los tratamientos fueron: T1=control, T2= 1.5 mL de CAM, T3= 3 mL de CAM y T4= 4.5 mL de CAM como inóculo. El modelo de Gompertz modificado muestra que la PBM del control tuvo la mayor ($p \leq 0.05$) producción total de CH₄ y la mayor ($p \leq 0.05$) producción de CH₄ por día (μ_m). El CAM disminuyó ($p \leq 0.05$) la adaptación (λ) del sistema a 0 en todos los tratamientos, sin embargo, no mejoró la producción de CH₄. La producción de biogás disminuyó ($p \leq 0.05$) conforme se agregó mayor cantidad de CAM, mientras que, el porcentaje de CH₄ aumentó ($p \leq 0.05$) conforme aumentaba la cantidad de CAM en el biorreactor. Se estima que a las dosis evaluadas del inóculo CAM, no hay una mejora en la producción total de biogás y metano, y se sugiere evaluar el efecto de dosis más altas del inóculo CAM.

Palabras clave: Consorcio de arqueas metanogénicas, metanogénesis, digestión anaerobia, estiércol, biogás.

EXPERIMENT IV. EFFECT OF DIFFERENT DOSES OF METHANOGENIC ARCHAEA ON *IN VITRO* METHANE PRODUCTION OF HOLSTEIN COW MANURE

Karym Roberto Curzaynz Leyva, Dr. en C.

4.2 ABSTRACT

The methanogenic archaea consortium (MAC) decreased biogas production but increased the proportion of methane (CH₄) in a previous experiment. The objective of the present experiment was to determine the amount of MAC that can increase the production of CH₄ and biogas in bioreactors fed with Holstein cow manure under mesophilic conditions. The treatments were: T1 = control, T2 = 1.5 mL of MAC, T3 = 3 mL of MAC and T4 = 4.5 mL of MAC as inoculum. The modified Gompertz model shows that the PBM of the control had the highest ($p \leq 0.05$) total production of CH₄ and the highest ($p \leq 0.05$) production of CH₄ per day (μm). The MAC decreased ($p \leq 0.05$) the adaptation (λ) of the system to 0 in all the treatments, however, the production of CH₄ did not improve. Biogas production decreased ($p \leq 0.05$) as more MAC was added, whereas the percentage of CH₄ increased ($p \leq 0.05$) as the amount of MAC in the bioreactor increased. It is estimated that at the evaluated doses of the MAC inoculum, there is no improvement in the total production of biogas and methane, and it is suggested to evaluate the effect of higher doses of the MAC inoculum.

Key words: Methanogenic archaea consortium, methanogenesis, anaerobic digestion, manure, biogas.

4.3 INTRODUCCIÓN

La utilización de combustibles fósiles genera grandes cantidades de gases efecto invernadero, relacionados con el cambio climático del planeta. Este problema ambiental ha estimulado más investigaciones, que se enfocan en la producción de combustibles alternativos a partir de los recursos biológicos (Bharathiraja *et al.*, 2018).

La digestión anaeróbica es un proceso natural en el que los microorganismos descomponen la materia orgánica en productos intermedios y finalmente biogás, este proceso ocurre naturalmente en pantanos, humedales y el tracto digestivo de los rumiantes (Kushkevych *et al.*, 2018). El manejo del estiércol de ganado mediante la digestión anaeróbica, mejora sus cualidades como fertilizante, reduce olores y patógenos, y produce biogás un combustible renovable (Holm-Nielsen *et al.*, 2009).

La eficiencia de la digestión anaeróbica se ha tratado de mejorar con diferentes técnicas físicas como el aumento de la temperatura que mejora la digestión y disminuye el tiempo de retención, en consecuencia, aumenta la producción de biogás (Gebreyessus y Jenicek, 2016); el uso de microorganismos en los biodigestores, en cambio, se han usado experimentalmente, para que intervengan en etapas previas a la metanogénesis; por ejemplo, se han usado inóculos de cepas celulolíticas para mejorar la fase de ácido-génesis en los biorreactores (Martin-Ryals *et al.*, 2015; Ozbayram *et al.*, 2018).

Algunos consorcios microbianos usados experimentalmente para aumentar la eficiencia productiva en la digestión anaeróbica, han mostrando resultados favorables, con la ventaja de su alta disponibilidad, como son los lodos activos de digestión anaeróbica o fluido ruminal (Alrawi *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2012). En menor grado, se han usado inóculos de arqueas metanogénicas como *Methanosarcina spp.* (Lins *et al.*, 2014) o de metanogénicas ácido tolerantes (Li *et al.*, 2018b). En un experimento previo, se aisló un consorcio de arqueas metanogénicas (CAM), que mostró capacidad para aumentar la concentración de metano en el biogás, pero la dosis óptima de su inclusión en un biorreactor se desconoce. Por tanto, el objetivo del presente experimento fue determinar el nivel de inclusión de CAM adecuado para aumentar la concentración de metano en el biogás producido durante la digestión anaeróbica de biorreactores alimentados con estiércol de vaca Holstein.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Inóculo de consorcio de arqueas metanogénicas (CAM)

El consorcio de arqueas metanogénicas (CAM) se obtuvo de la inoculación de lodos de biodigestores en medio de cultivo selectivo para arqueas metanogénicas (MCSM) que contenía: 30 mL de fluido ruminal clarificado (fluido ruminal fresco centrifugado a 12 857 g por 10 min y esterilizado 15 min a 121 °C y 15 psi), 5 mL de solución mineral I [6 g de K_2HPO_4 (Sigma) en 1000 mL de H_2O destilada], 5 mL de solución mineral II [6 g KH_2PO_4 (Sigma); 6g $(NH_4)_2SO_4$ (Merck); 12 g NaCl (Sigma-Aldrich); 2.45 g $MgSO_4$ (Sigma); y 1.6 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Sigma) en 1000 mL de H_2O destilada], 0.1 mL de resazurina a 0.1 % (Sigma-Aldrich), 0.2 g de peptona de soya (Merck), 0.1 g de extracto de levadura (Sigma), 6 mL de solución sulfido-cisteína [2.5 g de L-cisteína (Sigma) en 15 mL de NaOH 2 N + 2.5 g de $Na_2S \cdot 9H_2O$ (Meyer) aforado en 100 mL de H_2O destilada], 6 mL de solución al 8 % de Na_2CO_3 (Baker), 0.5 g de formato de sodio (Sigma), 11.5 μL de Coenzima M [solución ácido 2-mercaptoetanolsulfónico (Sigma)], 1 mL de antibiótico [250 mg de dihidroestreptomicina y 200, 000 UI de penicilina G], 0.1 mL de hemina [0.010 g de hemina en 100 mL de NaOH al 0.005 N, esterilizado 15 min a 121 °C y 15 psi], 1 mL de solución de minerales traza [70 mg de $ZnCl_2$; 100 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 6 mg de H_3BO_3 ; 190 mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 2 mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 24 mg de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ y 36 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ por 1000 mL de H_2O destilada] y 52.6 mL de H_2O destilada, su elaboración se realizó bajo flujo de CO_2 .

Quince tubos de 18 x 150 mm (PIREX®, México) con 9 mL de MCSM estéril, se inocularon con 1 mL de lodos de un biodigestor (Cuadro 18) bajo flujo de CO_2 , de la unidad experimental de biodigestores del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo. Se incubaron 72 h a 39 °C y se detectó el CH_4 dentro del tubo inoculado por espectroscopia de absorción de infrarrojos (EAI, LaserMethane mini2, Tokyo Gas Engineering, Japan) cada 24 h. Para realizar una presión de selección de arqueas metanogénicas, se transfirió 1 mL de cada tubo a otros quince tubos con 9 mL de MCSM estéril, se incubó a 39 °C durante 72 h y cada 24 se detectó CH_4 dentro del tubo por EAI. Tres transferencias se realizaron para obtener el CAM con capacidad de producir CH_4 , detectado por EAI obteniéndose lecturas en promedio de 2700 ppm de CH_4 por tubo.

Cuadro 18. Características físico-químicas del biodigestor con capacidad de 1000 L y 700 L de volumen de trabajo de la unidad experimental

Parámetros	Unidad	Biodigestor
ST	%	3.46 ± 0.03
SV/ST	%	57.85 ± 0.003
Cenizas	%	1.46 ± 0.007
CH ₄	%	51.52
H ₂ S	ppm	1136
CO ₂	%	42.09
Temperatura fase gaseosa	°C	38.7
pH		7.5
Potencial óxido-reducción	mV	-310
Oxígeno disuelto	mg L ⁻¹	4.72
Sólidos totales disueltos	g L ⁻¹	7.94
Temperatura fase líquida	°C	18.93

4.4.2 Procedimiento experimental

El experimento fue realizado en biorreactores de 120 mL de capacidad con un volumen de trabajo de 60 mL cada uno. Se adicionaron 60 mL de la fase líquida de un biodigestor de la unidad experimental (Cuadro 19), se incubaron a 39 °C durante siete días para estabilizarlos, determinar sus características físicoquímicas y de producción de biogás y metano (Cuadro 2). Los tratamientos incluyeron diferentes dosis de CAM, T1=Control (sin inóculo), T2= 1.5 mL de CAM, T3=3 mL de CAM y T4=4.5 mL de CAM como inóculo en la recarga de los biorreactores, con ocho repeticiones cada uno.

El día siete de incubación los biorreactores se destaparon para alimentar con 15 mL de estiércol de vaca Holstein con agua (relación 1:1) además de inocular T2, T3 y T4, sustituyendo de los 15 mL de alimentación, los mL de cada uno de los tratamientos, quedando una alimentación de 13.5, 12 y 10.5 mL para T2, T3 y T4 respectivamente. Los biorreactores se incubaron catorce días a 39 °C y cada 24 h se midió el volumen de biogás desplazado de

acuerdo a la metodología descrita por Cobos-Peralta *et al.* (2018). El biogás reportado es el acumulado y la cantidad de metano bajo condiciones normales de presión y temperatura.

Finalizada la incubación, los biorreactores se destaparon para medirles pH, potencial óxido reducción, tomar muestra para determinar ácidos grasos volátiles (AGV) y para número de bacterias totales (NBT) y número de arqueas metanogénicas (NAM).

Cuadro 19. Características físico-químicas iniciales de los biorreactores de cada tratamiento, inóculos y sustrato.

Variable	Biorreactores				Inóculo	Sustrato
	Control	-----CAM, mL-----			CAM	Estiércol
		1.5	3	4.5		
ST, %	6.10 ± 0.09	5.79 ± 0.02	5.78 ± 0.29	5.87 ± 1.88	NA	6.71 ± 0.03
SV/ST, %	67.95 ± 1.26	67.51 ± 0.88	70.56 ± 0.02	67.94 ± 0.70	NA	71.88 ± 0.10
Cenizas, %	1.95 ± 0.04	1.88 ± 0.05	1.70 ± 0.08	1.88 ± 0.02	NA	1.88 ± 0.002
pH	7.90 ± 0.05	8.00 ± 0.08	8.05 ± 0.07	7.87 ± 0.06	7.59 ± 0.02	NA
ORP	-295.83 ± 14.11	-316.43 ± 10.02	-330.48 ± 4.08	-342.66.25 ± 3.06	-277.66 ± 6.42	NA
Acetato, mg L ⁻¹	293.92	292.15	307.49	331.69	377.73	1222.32
Propionato, mg L ⁻¹	60.79	69.77	87.04	105.01	494.61	300.49
Butirato, mg L ⁻¹	0	0	0	0	259.97	215.16
NBT, x 10 ⁹ bacterias mL ⁻¹	82.1	84.4	78.2	81.6	3.6	NA
NAM, x 10 ⁹ metanogénicas mL ⁻¹	16.4	15.6	18.6	18.2	2.2	NA

NA: No Analizado; ST: Sólidos totales; SV: Sólidos volátiles; NBT: Número de bacterias totales; NAM: Número de arqueas metanogénicas

4.4.3 Métodos analíticos

El contenido de ST y SV fue determinado usando los métodos estándar de (APHA/AWWA/WEF, 2005). El pH fue medido con un potenciómetro (ORION® modelo 250^a) calibrado a pH 4 y 7. El potencial óxido-reducción (ORP) fue medido con un potenciómetro (ORION® modelo 710^a) calibrado con una solución +220 de óxido-reducción. Los ácidos grasos volátiles (AGV) se obtuvieron utilizando una muestra de los efluentes (2 mL) acidificada con HPO₃ (0.5 mL al 25 %) y centrifugada a 18, 800 g por 10 min (Hettich Zentrifugen EBA21, Alemania). El sobrenadante se inyectó con un automuestreador (1μL) a un cromatógrafo de gases (PerkinElmer® Clarus 500) con un detector de ionización de flama (FID) y columna capilar (Elite FFAP PerkinElmer®), temperatura de horno, 115 °C por 0.25 min, 125 °C por 0.5 min y 130 °C por 5.25 min, la temperatura de la columna fue 250 °C, el gas acarreador fue nitrógeno (8 psi) y aire e hidrógeno para la combustión de la flama. Tiempos de retención: 1.3, 1.6 y 2.15 min para el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, respectivamente. La proporción de CH₄ y CO₂ se determinó en un cromatógrafo de gases (PerkinElmer® Clarus 500) con inyección manual de 300 μL del espacio de cabeza de cada biorreactor. Las condiciones de operación fueron: temperatura de horno, 80 °C, columna empacada (PKD), 170 °C y detector de conductividad térmica, 130 °C. Tiempos de retención: 0.68 min para CH₄ y 1.05 min para CO₂ y gas acarreador Helio, flujo 23 mL m⁻¹.

Una muestra de 1 mL de cada biorreactor fue mezclada con 0.25 mL de formaldehído para medir la NBT y NAM. Las bacterias y arqueas metanogénicas se observaron y contaron en una cámara Petroff-Hausser (Electron Microscopy Sciences®, Hatfield, PA, USA) en un microscopio (Olympus®, BX51 TRF, Tokyo, Japan) a una magnificación de 1000X acoplado a una lámpara de mercurio. La NBT y NAM se calculó con la fórmula: NBT o NAM= (promedio conteo directo) (factor de dilución) (2x10⁷).

4.4.4 Modelo y análisis estadístico

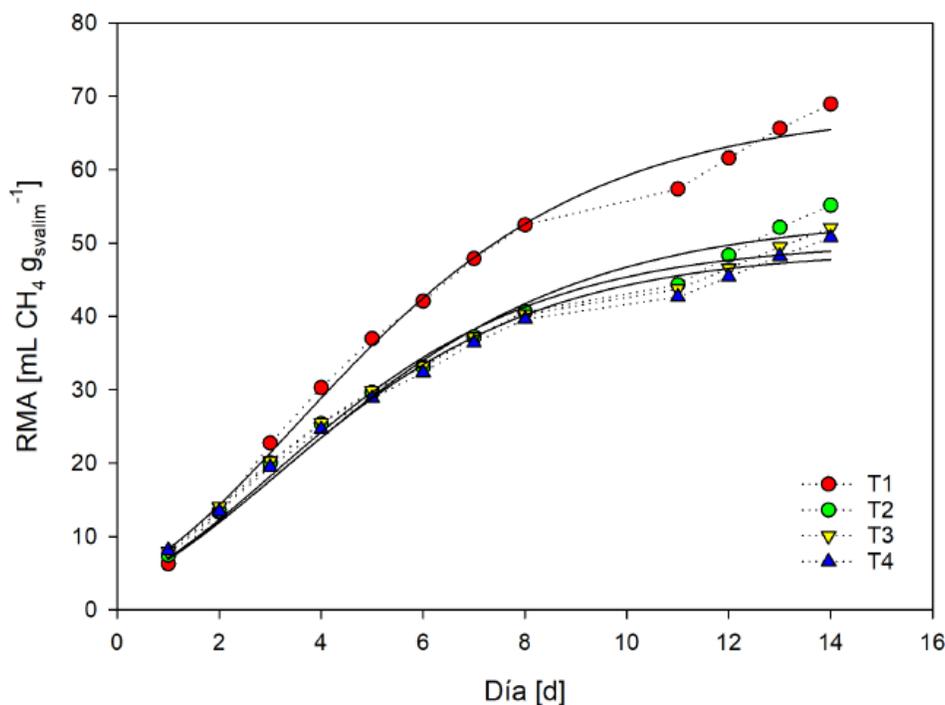
Los resultados de producción de metano se ajustaron al modelo modificado de Gompertz (Meneses-Reyes *et al.*, 2017; Zwietering *et al.*, 1990) que se presenta en la Eq (1).

$$AMY = BMP \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{BMP} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

AMY es el rendimiento acumulado de metano ($\text{mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SValimentados}$) al tiempo t (d), BMP es el potencial bioquímico de metano ($\text{mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SValimentados}$), μ_m es la velocidad de producción de metano por día ($\text{mL CH}_4 \text{ g}^{-1} \text{SValimentados d}^{-1}$), e es la constante matemática (2.718282), λ es el tiempo de la fase lag (d), t es el tiempo de digestión. Todos los modelos de regresión se ajustaron usando SigmaPlot versión 13.0. Un diseño completamente al azar (CA) fue utilizado para las variables biogás, CH_4 (%), CH_4 (mL), pH, ORP, AGV, NBT, NAM y el modelo Gompertz modificado PBM, μ_m y λ . NBT y NAM se transformó con Log 10, con la finalidad de cumplir con la normalidad y homogeneidad de los datos. CA se realizó con el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Los promedios se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El CAM disminuyó el rendimiento de metano acumulado (RMA), a mayor cantidad de CAM menor fue el RMA (Figura 13). En el día 9 se tuvo una perturbación de los biorreactores debido a la falta de energía eléctrica para la incubadora, lo que ocasiono una disminución en la producción de biogás, reestableciéndose hasta el día 11.



RMA: Rendimiento de metano acumulado, T1= Control, T2= 1.5 mL CAM, T3=3 mL CAM, T4= 4.5 mL CAM

Figura 13. Rendimiento de metano acumulado en los tratamientos

El valor obtenido del modelo de Gompertz para el potencial bioquímico de metano (PBM) indica que el control tiene una mayor ($p \leq 0.05$) capacidad de producción total de CH_4 , además de una mayor ($p \leq 0.05$) producción de CH_4 por día (μ_m). El CAM disminuyó ($p \leq 0.05$) la adaptación (λ) del sistema a 0 en todos los tratamientos donde se incluyó, sin embargo, no fue relevante en la producción de CH_4 . La inoculación con lodos de biodigestores, fluido ruminal y consorcio celulolítico aumentan el rendimiento acumulado de metano con estiércol de vaca como sustrato (Ozbyram *et al.*, 2018).

Cuadro 20. Parámetros del modelo Gompertz modificado de los datos experimentales

Tratamiento	PBM [$\text{mL CH}_4 \text{ g}^{-1}$ $^1\text{SValimentados}$]	Media μ_m [$\text{mL CH}_4 \text{ g}^{-1}$ $^1\text{SValimentados d}^{-1}$]	Media λ [d]	R^2
Control	68.37 a	7.49 a	0.14 a	0.995
1.5 CAM	53.67 b	5.87 b	0.00 b	0.990
3.0 CAM	50.23 c	6.06 b	0.00 b	0.992
4.5 CAM	49.12 c	5.88 b	0.00 b	0.992
EEM	1.423	0.127	0.011	
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

a, b Letras con diferente literal en la misma fila son diferentes ($P < 0.05$); EEM: Error estándar de la media; CAM: Consorcio de arqueas metanogénicas; LB: Lodos de biodigestores; FR: Fluido ruminal

La adición de fluido ruminal tuvo efecto en el rendimiento de metano específico de biodigestores alimentados con ensilados de pastos (Wall *et al.*, 2015), quizá co-inoculando con fluido ruminal y CAM se puede obtener un efecto en el rendimiento de metano.

La producción de biogás disminuyó ($p \leq 0.05$) conforme se agregó mayor cantidad de CAM, lo que afectó la producción de CH_4 , sin embargo, el porcentaje de CH_4 aumentó ($p \leq 0.05$) conforme era mayor la cantidad de CAM, indicando que hubo efecto del CAM a pesar de la disminución en la producción de biogás.

Las condiciones fisicoquímicas fueron similares ($p \geq 0.05$) entre tratamientos en lo que respecta a pH y potencial óxido-reducción (ORP). El número de bacterias en el control fue mayor ($p \leq 0.05$) por lo que pudo aumentar la fermentación de la materia orgánica y en consecuencia la producción de biogás. Las bacterias tienen un rol importante en la degradación anaeróbica del estiércol de vaca, los fílum *Bacteroidetes* y *Firmicutes* fueron los más abundantes en biodigestores inoculados con lodos de biodigestores, fluido ruminal y/o consorcio celulolítico (Ozbyram *et al.*, 2018). La bioaugmentación con cultivos celulolíticos incrementa la hidrólisis del sustrato para mejorar la eficiencia metanogénica (Martin-Ryals

et al., 2015). Sin embargo, la capacidad de utilización de los sustratos depende de los factores fisicoquímicos en los que se encuentre el biodigestor (Bharathiraja *et al.*, 2018).

A pesar de que el número de arqueas metanogénicas fue similar entre tratamientos, el inóculo CAM disminuye ($p \leq 0.05$) la producción de biogás aumentando el porcentaje de CH₄ que contiene. La bioaugmentación de los biodigestores la han estudiado enriqueciéndolos con metanógenos ácido-tolerantes que son obtenidos en condiciones específicas de biodigestores alimentados con ácido propiónico y que contienen *Methanotherix* (34-45 %), *Methanolinea* (42-47 %), *Methanoespirillum* (11-16 %), entre otros géneros con menos abundancia (Li *et al.*, 2018b).

Cuadro 21. Producción de biogás, metano y variables físico químicas finales de los biorreactores

Variable	Control	1.5 CAM	3.0 CAM	4.5 CAM	EEM	P
Biogás, mL	383.44 a	317.56 b	295.86 c	282.82 d	7.071	<0.0001
CH ₄ , %	57.50 c	60.89 b	61.82 ab	63.18 a	0.436	<0.0001
CH ₄ , mL	171.64 a	137.76 b	129.63 c	126.75 b	3.346	<0.0001
pH	7.67	7.72	7.74	7.71	0.011	0.203
ORP, mV	-373.36	-379.24	-392.59	-395.76	4.773	0.299
NBT, x 10 ¹⁰	11.64 a	4.64 b	3.96 b	3.82 b	0.054	<0.0001
NAM, x 10 ¹⁰	1.54	1.76	1.78	1.86	0.015	0.14
Propionato, mg L ⁻¹	0.00 d	375.84 a	229.16 b	177.73 c	24.133	<0.0001

a, b Letras con diferente literal en la misma fila son diferentes ($P < 0.05$); EEM: Error estándar de la media; CAM: Consorcio de arqueas metanogénicas; LB: Lodos de biodigestores; FR: Fluido ruminal; ORP: Potencial óxido reducción; NBT: número de bacterias totales; NAM: número de arqueas metanogénicas

La utilización de cultivo enriquecido de metanogénicas es una solución satisfactoria para la digestión anaeróbica de sustratos alta relación C/N sin co-digestión con sustratos nitrogenados, además favorece la abundancia de metanogénicas acetoclásticas como *Methanotherix*, favoreciendo la digestión anaeróbica en términos de porcentaje de metano (Li *et al.*, 2018a), similar a nuestros resultados donde el consorcio mejora el porcentaje de metano del biogás.

4.6 CONCLUSIONES

El CAM disminuyó la producción de biogás y aumentó el porcentaje de metano del biogás de los biorreactores alimentados con estiércol de vaca Holstein; también disminuyó la fase lag para producción de metano. Sin embargo, las dosis evaluadas del CAM, no mejoraron la producción total de biogás ni de metano con respecto al tratamiento testigo. Por tanto, se sugiere evaluar dosis de inclusión más altas a las usadas en el presente experimento.

Literatura citada

- Alrawi, R. A., A. Ahmad, N. Ismail, and M. O. A. Kadir. 2011. Anaerobic co-digestion of palm oil mill effluent with rumen fluid as a co-substrate. *Desalination*. 269:50–57.
- APHA/AWWA/WEF. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st ed. American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation, Washington, DC, USA.
- Bharathiraja, B., T. Sudharsana, J. Jayamuthunagai, R. Praveenkumar, S. Chozhavendhan, and J. Iyyappan. 2018. Biogas production – A review on composition, fuel properties, feed stock and principles of anaerobic digestion. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 90:570–582.
- Cobos-Peralta, M. A., K. R. Curzaynz-Leyva, M. I. Rivas-Martínez, E. A. Santillán-Gómez, and J. R. Bárcena. 2018. In vitro effect of diets for growing lambs supplemented with dried distillers grains on rumen fermentation and gas emissions. *Agrociencia*. 52(2):203-215.
- Gebreeyessus, G., and P. Jenicek. 2016. Thermophilic versus Mesophilic Anaerobic Digestion of Sewage Sludge: A Comparative Review. *Bioengineering*. 3:15.
- Holm-Nielsen, J. B., T. Al Seadi, and P. Oleskowicz-Popiel. 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresour. Technol.* 100:5478–5484.
- Kushkevych, I., M. Vítězová, T. Vítěz, J. Kováč, P. Kaucká, W. Jesionek, M. Bartoš, and L. Barton. 2018. A new combination of substrates: biogas production and diversity of the methanogenic microorganisms. *Open Life Sci.* 13:119–128.
- Li, Y., L. Li, Y. Sun, and Z. Yuan. 2018a. Bioaugmentation strategy for enhancing anaerobic

- digestion of high C/N ratio feedstock with methanogenic enrichment culture. *Bioresour. Technol.* 261:188–195.
- Li, Y., G. Yang, L. Li, and Y. Sun. 2018b. Bioaugmentation for overloaded anaerobic digestion recovery with acid-tolerant methanogenic enrichment. *Waste Manag.* 79:744–751.
- Lins, P., C. Reitschuler, and P. Illmer. 2014. *Methanosarcina* spp., the key to relieve the start-up of a thermophilic anaerobic digestion suffering from high acetic acid loads. *Bioresour. Technol.* 152:347–354.
- Martin-Ryals, A., L. Schideman, P. Li, H. Wilkinson, and R. Wagner. 2015. Improving anaerobic digestion of a cellulosic waste via routine bioaugmentation with cellulolytic microorganisms. *Bioresour. Technol.* 189:62-70.
- Ozbayram, E. G., Akyol, B. Ince, C. Karakoç, and O. Ince. 2018. Rumen bacteria at work: bioaugmentation strategies to enhance biogas production from cow manure. *J. Appl. Microbiol.* 124:491–502.
- Wall, D. M., B. Straccialini, E. Allen, P. Nolan, C. Herrmann, P. O’Kiely, and J. D. Murphy. 2015. Investigation of effect of particle size and rumen fluid addition on specific methane yields of high lignocellulose grass silage. *Bioresour. Technol.* 192:266–271.
- Yue, Z. B., J. Wang, X. M. Liu, and H. Q. Yu. 2012. Comparison of rumen microorganism and digester sludge dominated anaerobic digestion processes for aquatic plants. *Renew. Energy.* 46:255–258.