



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS
METANOGÉNICOS EN REACTORES ANAEROBIOS DE LECHO DE
Lodos DE FLUJO ASCENDENTE (RALLFA) EMPLEANDO VINAZAS
DE LA INDUSTRIA AZUCARERA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ROMERO SOTO BENJAMÍN

MÉXICO, D.F., 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Vocal M en C. Lucia Cornejo Barrera

Secretario Dra. Marisela Bernal González

Primer suplente M en C. Rolando Salvador García Gómez

Segundo Suplente Q.F.B. María de Lourdes Osnaya Suárez

Lugar donde se realizó la investigación

Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental,
Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema:

Dra. Marisela Bernal González

Supervisor Técnico:

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Sustentante:

Romero Soto Benjamín

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a quienes han coadyuvado para la realización de este trabajo:

Al personal académico y administrativo de la gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Conjunto E y F de la Facultad de Química de quienes he recibido un apoyo incondicional permitiéndome el desarrollo de este trabajo

A la Dra. María del Carmen Duran Domínguez de Bazúa y a la Dra. Marisela Bernal González, quienes con su dedicación y disposición dirigieron el presente texto. Por supuesto también al Dr. Thangarasu Pandiyan y al Cand. Dr. José Guadalupe Hernández quienes brindaron su apoyo técnico-científico para el uso de la campana anaerobia

Esta investigación fue parcialmente financiada por el proyecto PAPIME clave PE101709 “Apoyo a la enseñanza experimental de las asignaturas terminales de las carreras que se imparten en la Facultad de Química de la UNAM” de la DGAPA de la UNAM, especialmente cuando cursé mi asignatura terminal “Laboratorio de Desarrollo Experimental de Alimentos” (LABDEA), actualmente “Estancias Estudiantiles” (EE), que fue el antecedente de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mis padres Fabiola y Jesús

Por su amor y el apoyo que siempre me han brindado

A mis hermanas Olivia y Fabiola

Porque son parte fundamental de mi vida

A mi tía Mary

Quien me ha brindado siempre su atención

A mis amigos y compañeros de licenciatura

Por el aprendizaje y las experiencias que pasamos juntos

Y, finalmente, a Denisse

Por el apoyo y el amor que me brindó incondicionalmente durante la
licenciatura

Índice	Página
Glosario	iv
Resumen	1
Capítulo 1. Problemática	3
1.1 Introducción	3
1.2 Justificación del trabajo	4
1.3 Hipótesis	5
1.4 Objetivos	5
1.4.1 Objetivo general	5
1.4.2 Objetivos particulares	5
Capítulo 2. Fundamento teórico y antecedentes	6
2.1 Antecedentes	6
2.1.1 Funcionamiento de un reactor anaerobio	6
2.1.2 Parámetros de operaciones y control en los procesos anaerobios	6
2.1.2.1 Factores que afectan el proceso anaerobio	7
2.2 Importancia de las bacterias en un reactor anaerobio (RALLFA)	10
2.2.1 Bacterias “fermentativas” o hidrolíticas	10
2.2.2 Bacterias acidogénicas (formadoras de ácido)	11
2.2.3 Bacterias acetogénicas	11
2.2.4 Bacterias metanogénicas	12
2.3 Características generales de las familias de bacterias metanogénicas	14
2.3.1 Principales características de las bacterias metanogénicas	16
2.3.1.1 Características de <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	18
2.3.1.2 Características de <i>Methanobacterium formicicum</i>	19

2.3.1.3 Características de <i>Methanobacterium wolfei</i>	20
2.3.2 Rutas metabólicas de las bacterias metanogénicas (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)	21
Capítulo 3. Metodología	23
3.1 Vinazas	23
3.2 Reactores RALLFA	23
3.3 Diagrama experimental	24
3.3.1 Elaboración del medio de cultivo general (Bryant <i>et al.</i> , 1971)	24
3.3.2 Elaboración del medio de cultivo específico para la actividad metanogénica (Balch <i>et al.</i> , 1979; Flaherty <i>et al.</i> , 1998; Soto <i>et al.</i> , 1993)	26
3.3.3 Elaboración de los medios de cultivo selectivos para cada una de las bacterias seleccionadas, para esta investigación	27
3.3.3.1 <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (Keneal y Zeikus, 1982)	27
3.3.3.2 <i>Methanobacterium formicicum</i> (Schauer y Ferry, 1980)	28
3.3.3.3 <i>Methanobacterium wolfei</i> (Konig <i>et al.</i> , 1985)	28
3.4 Observaciones directas en placa	28
3.5 Preparación de muestras para observaciones al microscopio óptico de campo claro (Tinción de Gram)	30
3.6 Diseño experimental	30
3.6.1 Selección del medio de cultivo e inoculación de BM a 45, 55 y 65°C	30
3.6.2 Prueba 1. Selección de la dilución de trabajo	31
3.6.3 Prueba 2. Medio de cultivo general sólido	31
3.6.4 Prueba 3. Medio de cultivo específico para BM	32
3.6.5 Prueba 4. Medio de cultivo selectivo de las especies en estudio	33
Capítulo 4. Resultados y discusión	34
4.1 Selección del medio de cultivo general e inoculación de BM a 45, 55 y 65°C	34
4.2 Prueba 1. Selección de la dilución de trabajo	35

4.3 Prueba 2. Medio de cultivo general sólido	36
4.4 Prueba 3. Medio de cultivo específico para BM	37
4.5 Prueba 4. Medio de cultivo selectivo para las especies en estudio	38
4.6 Discusión	39
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones	41
5.1 Conclusiones	41
5.2 Recomendaciones	42
Anexo A. Medio de cultivo general líquido (5 días)	43
Anexo B. Medio de cultivo general con una dilución de 10^{-2} (5 días)	45
Anexo C. Medio de cultivo general sólido (30 días)	47
Anexo D. Medio de cultivo específico para bacterias metanogénicas (15 días)	51
Anexo E. Medio de cultivo selectivo (15 días)	55
Bibliografía	59

Tablas

Tabla 1. Parámetros de operación de un RALLFA (Díaz <i>et al.</i> , 2002)	6
Tabla 2. Familias de bacterias metanogénicas (García <i>et al.</i> , 1991)	15
Tabla 3. Características de bacterias metanogénicas en estudio (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)	17
Tabla 4. Características de vinazas de la India y México (Rincón-Acelas, 2008)	23
Tabla 5. Composición del medio de cultivo General (Bryant <i>et al.</i> , 1971)	27
Tabla 6. Composición del medio de cultivo para la actividad específica de BM (Flaherty <i>et al.</i> , 1998; Soto <i>et al.</i> , 1993)	28
Tabla 7. Composición de los diferentes medios de cultivo selectivo a 45, 55 y 65°C	29
Tabla 8. Diseño experimental 1	31
Tabla 9. Diseño experimental 2	32

Tabla 10. Diseño experimental 3	33
Tabla 11. Observaciones microscópicas y macroscópicas del medio de cultivo general (día 3)	34
Tabla 12. Observaciones microscópicas del medio de cultivo general diluido a 10^{-2} (día 4)	35
Tabla 13. Observaciones microscópicas y macroscópicas del medio de cultivo general (día 12)	36
Tabla 14. Observaciones microscópicas y macroscópicas de los medios de cultivo específicos para las BM (día 10)	37
Tabla 15. Observaciones microscópicas de los medios de cultivo selectivo para BM a temperatura de 45, 55 y 65°C (día 10)	39
Tabla A1. Medio de cultivo general líquido (5 días)	44
Tabla B1. Medio de cultivo general con una dilución de 10^{-2} (5 días)	46
Tabla C1. Medio de cultivo general sólido (30 días)	48
Tabla D1. Medio de cultivo específico para BM (15 días)	52
Tabla E1. Medio de cultivo selectivo (15 días)	56

Figuras

Fig. 1. Diagrama del equilibrio del proceso anaerobio (Castro, 2004)	9
Fig. 2. <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)	18
Fig. 3. <i>Methanobacterium formicicum</i> (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)	20
Fig. 4. <i>Methanobacterium wolfei</i> (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)	21
Fig. 5. Inoculación del RALLFA (Rincón-Acelas, 2008)	24
Fig. 6. RALLFA enchaquetado con fibra de vidrio (Rincón-Acelas, 2008)	24
Fig. 7. RALLFA con lamina de aluminio inoxidable (Rincón-Acelas, 2008)	24
Fig. 8. Diagrama del diseño experimental	25
Fig. 9. Cámara anaerobia de guante (Atlas y Bartha, 2002)	26

Glosario: Siglas y abreviaciones empleadas

A	Medio de cultivo (Diseño experimental)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN_r	Ácido ribonucleico ribosomal
ARN_t	Ácido ribonucleico de transcripción
B	Temperatura, °C (Diseño experimental)
BM	Bacterias metanogénicas
BSR	Bacterias sulfato-reductoras
C	Tiempo, días (Diseño experimental)
°C	Grados Celsius
Ca	Calcio
CH₄	Metano
CH₃COOH	Ácido acético
(CH₃)₂N	Nitruro de metilo
CH₂O	Formaldehído
cm	Centímetro
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
D	Dilución (Diseño experimental)
DBO, DQO	Demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno
DOE	Departamento de Energía de los EEUU, por sus siglas en inglés
F₃₄₂	Factor 342
F₄₂₀	Factor 420
F₄₃₀	Coenzima 430
FAF	Formaldehído activador, por sus siglas en inglés
Fe³⁺	Hierro trivalente
Fe(NH₄)₂(SO₄)₂	Sulfato ferroso amoniacal
FeSO₄·7H₂O	Sulfato ferroso heptahidratado
g	Gramos
H₂	Hidrógeno
HCOOH	Ácido fórmico
H₂O	Água
H₂S	Ácido sulfhídrico
K	Potasio
kg	Kilogramos
L	Litros
m³	Metros cúbicos
min	Minutos
mL	Mililitros
mg	Miligramos
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
mM	Milimolar
mm	Milímetros

mmHg	Milímetros de mercurio
mV	Milivolts
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na₂S	Sulfuro de sodio
Na₂S.9H₂O	Sulfuro de sodio nonahidratado
Nd	No determinado
NH₄	Amoníaco
NH₄ Cl	Cloruro de amonio
Ni	Níquel
nm	Nanómetro
NO₃⁻	Ion nitrato
O₂	Oxígeno molecular
OHPA	Organismos acetogénicos productores obligados de hidrógeno, por sus siglas en inglés
pH	Potencial de hidrógeno
p/p = m/m	Peso/Peso ¹ = Masa/Masa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés (<i>polymerase chain reaction</i>)
psig	Siglas en inglés para la unidad de presión manométrica en libras fuerza por pulgada cuadrada (<i>pounds per square inch gauge</i>)
RALLFA	Reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente
rpm	Revoluciones por minuto
S	Azufre
SO₄⁼	Ion sulfato
TRH	Tiempo de residencia hidráulica

Letras griegas

μm	Micrómetro
μM	Micromolar

¹El **peso**, en física, es la medida de la fuerza que ejerce la gravedad sobre la masa de un cuerpo. Normalmente, se considera respecto de la fuerza de gravedad terrestre. El peso depende de la intensidad del campo gravitatorio, de la posición relativa de los cuerpos y de la masa de los mismos. La **masa** es una propiedad característica de los cuerpos: la cantidad de materia, y no depende de la intensidad del campo gravitatorio, ni de su posición en el espacio. Por ejemplo, una persona de 60 kg de **masa**, pesa 60 **kg-fuerza** en la superficie de la Tierra; pero, la misma persona, en la superficie de la Luna pesaría sólo unos 10 kg-fuerza; sin embargo, su masa seguirá siendo de 60 kg. Las unidades de **peso** y **masa** tienen una larga historia compartida, en parte porque su diferencia no fue bien entendida cuando dichas unidades comenzaron a utilizarse. Cotidianamente, el término "peso" se utiliza a menudo *erróneamente* como sinónimo de masa. La unidad de masa del SI es el kilogramo, kg

Resumen

Las vinazas son un residuo industrial del proceso de la destilación alcohólica. Es un líquido con partículas en suspensión de color marrón, olor característico a mieles finales y sabor a malta, que contiene una gran cantidad de materia orgánica incluyendo fenoles y sus polímeros. Otros elementos que se encuentran presentes en las vinazas son el potasio (K), azufre (S), magnesio (Mg), nitrógeno (N) y calcio (Ca). Sin embargo, estos compuestos son variables según el origen de la melaza, jugo o la mezcla de ambos. El tratamiento de las vinazas se realiza mediante procesos anaerobios entre los cuales se encuentran los reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente conocidos como (RALLFA). En el presente trabajo se utilizan tres reactores tipo RALLFA a escala de laboratorio de 3 L (A, B y C), los cuales se controlaron a una temperatura de 45, 55 y 65°C, respectivamente. Están contruidos por dos tubos de vidrio concéntricos con una altura de 65 cm, diámetro de 7.27 cm y 3.7 cm. A través del tubo de diámetro mayor se hace pasar agua caliente a 45, 55 y 65°C, para mantener la temperatura constante de los tres reactores. El volumen total es de 2.7 L y el de operación de 2.4 L. En el extremo inferior de los reactores cuentan con una forma cónica por donde se lleva a cabo la alimentación mediante una bomba peristáltica, a un flujo de 0.29 mL min⁻¹, manejando tiempos de residencia hidráulica (TRH) de 3.5 días. En la parte superior se coloca un embudo invertido que permite la separación sólido-líquido-gas. Este último se mide a través del desplazamiento de una solución alcalina de NaOH con pH > 12, la cual lava el gas y, además, como se satura con CO₂, se utiliza fenoftaleína como indicador de saturación. El seguimiento de los reactores se evaluó mediante las determinaciones de pH, temperatura, alcalinidad y sólidos totales, suspendidos y disueltos, aplicando los métodos estandarizados. Se cuantificó también la alcalinidad por el método tradicional. Un grave problema en el tratamiento anaerobio mediante reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA), de este tipo de agua residual (vinaza) es la proliferación de las bacterias sulfato-reductoras (BSR) que entran en competencia por el sustrato con las bacterias metanogénicas (BM) produciendo ácido sulfhídrico como producto de la degradación del sustrato. A pesar de la investigación intensiva en las últimas dos décadas, no hay suficientes datos para formular pautas prácticas para determinar la competencia entre las BM y las BSR. Se sabe que las BM, principalmente las *Methanobacterium*, *Methanothrix* y *Methanosarcina*, proliferan en condiciones termofílicas. Por ello, en esta investigación se identificaron y aislaron algunas de

las especies microbianas que intervienen en la degradación de la materia orgánica de las “vinazas”, por medio de tres diferentes biomasas termofilicas (45, 55, 65°C). La elección del medio de cultivo selectivo para BM fue efectivo al lograr el desarrollo bacteriano e identificar por medio de observaciones micro y macroscópicas características propias de *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Metanobacterium formicicum* y *Metanobacterium wolfei* a temperaturas de 45, 55 y 65°C, respectivamente.

Palabras clave: Microorganismos termófilos, reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA), vinazas de caña de azúcar

Capítulo 1. Problemática

1.1 Introducción

Más de cien países producen azúcar a nivel mundial. El 74% de ésta es producida a partir de caña de azúcar, principalmente en zonas tropicales entre los Trópicos de Cáncer y Capricornio, con un creciente aumento en la producción a partir de remolacha en el hemisferio norte (Casanova, 2005). Brasil se encuentra entre los 10 principales productores latinoamericanos con un porcentaje de participación del 32.49% en el año 2005, con un 3.49% se encuentra México y con un 3.08% Colombia, estos porcentajes son con respecto a la producción mundial, lo cual muestra claramente la importancia de esta industria en el desarrollo económico (Observatorio Agrocadenas Colombia, 2006).

En la actualidad, México cuenta con 58 ingenios azucareros con presencia en 15 estados del territorio nacional, siendo Veracruz el de mayor importancia con 22. La problemática que enfrenta esta agroindustria es sumamente compleja, especialmente a la luz del impacto sobre el ambiente. Se estima que por una tonelada de caña destinada para la producción de azúcar se obtienen alrededor de 45 kg de melaza que pueden producir 12 litros de alcohol y de 30 a 156 litros de vinaza, los cuales contienen grandes cantidades de sólidos totales (Filho y Gloria, 1987) y de materia orgánica provenientes de las materias primas usadas durante la fermentación (Castro-González *et al.*, 2005). La generación de vinazas por cada litro de alcohol producido varía, dependiendo de algunos factores tales como, el tipo de levaduras, su efectividad de producir etanol, la eficiencia de separación durante la producción de azúcar, etc. Los parámetros fisicoquímicos de las vinazas son: contenidos de compuestos orgánicos medidos como demanda química de oxígeno (DQO) entre 70000 y 150000 mg L⁻¹ (o sean, 70-150 g L⁻¹) y un pH de 4.3 que, comparado con las aguas residuales que se vierten en las casas habitación, que tienen entre 400 y 800 mg DQO L⁻¹, son de 10000 a 20000 veces más contaminantes (Jiménez-Ambriz *et al.*, 1995; Rodríguez-Rivera, 1993).

Las vinazas al ser vertidas incrementan la temperatura del cuerpo receptor y disminuyen la cantidad de oxígeno disuelto disponible, cuando no son neutralizadas pueden disolver algunos metales, la turbidez provocada por los sólidos suspendidos, como las levaduras muertas, restringe la penetración de la luz, así como los sólidos suspendidos presentes en las vinazas

disminuyen la permeabilidad del suelo o la del lecho del río, obstruyendo su infiltración y provocando un proceso de degradación anaerobia que da como resultado olores desagradables y gases que pueden llegar a ser muy peligrosos (García *et al.*, 1991; Rivas-Solórzano, 1996; Villatoro-Reséndiz, 1998).

En los últimos años se han llevado a cabo pruebas de degradación anaerobia como resultado del efecto de comunidades bacterianas que degradan los diferentes compuestos, generando un efluente que contiene una DQO menor y grandes cantidades de nutrientes que son útiles como complemento o enmienda de suelos y simultáneamente la producción de biogás compuesto principalmente por metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) y, en menor cantidad, ácido sulfhídrico (H₂S) (Castro, 2004; Castro-González *et al.*, 2005).

Un grave problema en el tratamiento anaerobio mediante reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA), de este tipo de agua residual (vinaza) es la proliferación de las bacterias sulfatorreductoras (BS), por lo que la producción de metano disminuye, representando esto una desventaja importante en la aplicación de un tratamiento anaerobio, ya que ocasiona un efecto negativo en el balance de energía del sistema (Fang *et al.*, 1996; Hulshoff Pol *et al.*, 1998; Okabe *et al.*, 2003).

En esta investigación, por tanto, se busca identificar y aislar a algunas de las especies microbianas que intervienen en la degradación de la materia orgánica de las “vinazas”, en tres diferentes biomasas termofílicas presentes en tres reactores a 45, 55 y 65°C. Los consorcios microbianos que se estudiarán se obtendrán de muestras provenientes de tres reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente, conocidos por sus siglas como de tipo RALLFA, que operan a las temperaturas mencionadas en el párrafo anterior.

1.2 Justificación del trabajo

Debido a que las temperaturas de generación de las vinazas son entre 55 y 88°C, aproximadamente, se considera que las bacterias metanogénicas no resisten estas temperaturas. Por lo tanto, se plantea en esta investigación el estudio de los consorcios microbianos a temperaturas termofílicas (45, 55 y 65°C) en donde se han reportado la existencia de algunos microorganismos metanogénicos (Ravot *et al.*, 1995; Rincón-Acelas, 2008; Shin *et al.*, 1995).

1.3 Hipótesis

Los RALLFA que se operan a 45, 55 y 65°C presentan bacterias metanogénicas las cuales podrán transformar los compuestos carbonosos en metano de acuerdo con las diferentes especies microbianas que se encuentren según la temperatura.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Aislar a tres tipos de bacterias metanogénicas presentes en los tres reactores RALLFA operando a 45, 55 y 65°C

1.4.2 Objetivos particulares

- Establecer el medio de cultivo general para el desarrollo de las bacterias metanogénicas que se encuentran en un RALLFA.
- Identificar la dilución idónea para poder llevar a cabo la caracterización de las bacterias durante el experimento.
- Establecer el medio de cultivo específico para el desarrollo de las bacterias metanogénicas en estudio.
- Identificar a las bacterias metanogénicas en estudio mediante un medio de cultivo selectivo empleando la tinción de Gram.

Capítulo 2. Fundamento teórico y antecedentes

2.1 Antecedentes

2.1.1 Funcionamiento de un reactor anaerobio

Los reactores anaerobios pueden ser utilizados para tratar efluentes domésticos o industriales con altas cargas orgánicas. Estos reactores constan de 3 partes esenciales:

1. Sistema hidráulico. En este proceso el agua residual entra al digestor por el fondo y fluye hacia arriba a través de un lecho de lodos granulares relativamente denso y de un manto de partículas de lodo floculado. Dentro de esta zona se efectúa principalmente la conversión de materia orgánica a metano y dióxido de carbono
2. Lecho de lodos, es la parte bioquímicamente activa del reactor gracias a los consorcios microbianos aquí presentes y
3. Una cámara superior de acumulación de gas (Díaz *et al.*, 2002).

Los reactores RALLFA fueron desarrollados para el tratamiento de aguas residuales industriales con una concentración de materia orgánica media y elevada. En resumen, el reactor RALLFA es un tanque en el cual las aguas residuales son introducidas en la parte inferior y salen por la parte superior, estableciendo un flujo ascendente, siendo la mezcla del sistema promovida por el flujo ascendente del fluido y por las burbujas de gas.

2.1.2 Parámetros de operaciones y control en los procesos anaerobios

Para un buen control, seguimiento y optimización anaerobio es necesario tener en cuenta los parámetros que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de operación de un RALLFA (Díaz *et al.*, 2002)

✓ Parámetros de operación	✓ Parámetros de control*
<ul style="list-style-type: none">- Fase de arranque- Carga orgánica- Velocidad de carga orgánica- Temperatura- Velocidad volumétrica de flujo- Tiempo de residencia hidráulico (TRH)- Nutrientes- Producción de lodos	<ul style="list-style-type: none">- Concentración de ácidos volátiles- Alcalinidad y pH- Sólidos suspendidos, volátiles y totales- Producción de metano y gas total

*Los parámetros deben ser evaluados diariamente en los RALLFA

2.1.2.1 Factores que afectan el proceso anaerobio

El proceso anaerobio está afectado por una serie de factores que determinan empíricamente su eficacia y éstos son:

- Temperatura
- Concentración de sólidos
- Mezclado
- pH
- Concentración de ácidos volátiles
- Presión de la operación

La temperatura es el factor más importante pues determina, en primera instancia, la cinética del proceso y el tipo de biología del sistema. Será de allí que se determinará el volumen total del digestor que se requerirá para llevar a cabo el tratamiento y, en segundo término, la viabilidad de las especies microbianas que intervienen en el proceso.

La concentración de sólidos dentro del digestor es muy importante para mantener un tratamiento adecuado. Esta concentración debe asegurar un suministro continuo de sustratos para que se produzca un correcto metabolismo y desarrollo de los diversos grupos tróficos involucrados y facilitar la labor de mezcla con el fin de mantener un medio homogéneo dentro del sistema. Las concentraciones normales de sólidos en los digestores usualmente se sitúan entre un 2% hasta un 7%.

El mezclado, además de promover un medio homogéneo y con ello asegurar el contacto efectivo entre los microorganismos y el material a tratar, permite mantener la concentración de productos intermedios y finales del proceso así como la concentración mínima de posibles elementos tóxicos e inhibidores del metabolismo bacteriano. Evita, además, la estratificación termal y la formación de espumas en la interfase gaseosa del digestor. En el caso de considerarse la inclusión de agitación mecánica, la eficiencia del proceso mejorará notablemente arriba de las 60 rpm si se evita la formación de espumas por encima de las 90 rpm.

El pH. Para que la variedad de microorganismos que coexisten en el digestor encuentren los parámetros ambientales requeridos para su desarrollo como conjunto, se debe establecer un equilibrio dinámico entre todas las etapas del proceso. Usualmente, el proceso suele interrumpirse por el decaimiento de los microorganismos productores de metano debido al cambio de ambiente que disminuye su viabilidad. Ésta es una buena razón por la cual el pH dentro del reactor se utilice como un indicador de que el proceso se está realizando en condiciones adecuadas, ya que si los microorganismos productores de metano son inhibidos o destruidos, no se degradarán los ácidos grasos volátiles y el pH dentro del digestor disminuirá progresivamente. Por debajo de un pH de 6.2, la supervivencia de los microorganismos metanogénicos es imposible y, por consiguiente, cuando en un digestor alcanza este pH, el proceso puede considerarse como interrumpido.

Concentración de ácidos grasos volátiles. Desde el punto de vista del equilibrio ácido-base, puede representarse el líquido en suspensión como una solución acuosa de productos intermedios y terminales que se obtienen en el curso del proceso, de estos se distinguen:

- Los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) en equilibrio con sus sales
- El ácido carbónico y su sal ácida: el bicarbonato
- El amoníaco en forma de sales

Para un cierto pH y concentración dados, existe una relación molar bien definida entre cada ácido ionizado y su sal. De igual manera, para una concentración de CO₂ total dada, existe una relación unívoca entre el ácido libre y el bicarbonato (Figura 1).

A un pH = 7, prácticamente todo el contenido de ácidos grasos volátiles se encuentra en forma de sal. Para valores de pH comprendidos entre 4.1 y 7, el equilibrio ácido-base en reactores que producen biogás se caracteriza por la presencia de bicarbonatos, ácido carbónico y ácido acético, mientras que a pH mayor o igual a 7, se encuentran ácido carbónico, bicarbonatos y acetatos (en lugar de ácido acético).

Cuando aumenta la concentración de ácidos volátiles dentro del digestor, puede deberse a una sobrecarga en la alimentación o a la inhibición de las bacterias metanogénicas, disminuyendo el pH. Una parte de los ácidos se transforma en sales por la acción del bicarbonato, lo que constituye una reserva alcalina del medio. Si la concentración de ácidos aumenta demasiado, se rompe la capacidad amortiguadora del medio y el pH desciende hasta detener el proceso.

La presión. Las investigaciones sobre la presión de trabajo del digestor y su incidencia en la eficiencia del proceso, arrojan datos que a presiones comprendidas entre 500 y 1000 mmHg. No existe un efecto apreciable sobre la eficiencia del funcionamiento, pero se ha reportado una inhibición por debajo de 260 mmHg. También se ha encontrado empíricamente que el pH de la mezcla del digestor depende de la presión de funcionamiento, siendo mayor a menor presión (Ojeda-Berra, 2008).

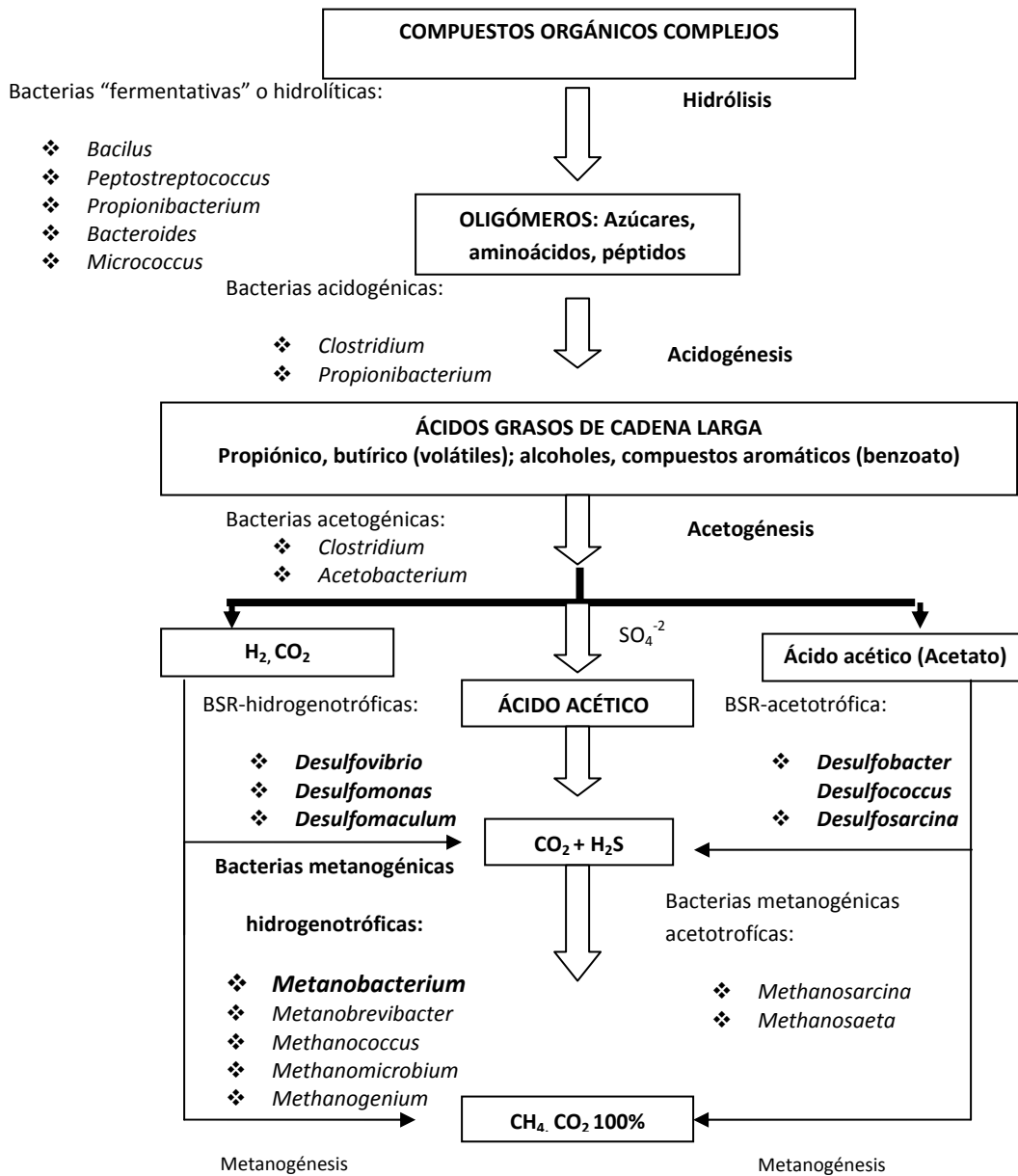


Fig. 1. Diagrama del equilibrio del proceso anaerobio (Castro, 2004)

2.2 Importancia de las bacterias en un reactor anaerobio (RALLFA)

El tratamiento anaerobio es un proceso complejo que puede ser descrito en función de diferentes variables que están interrelacionadas. Por definición “es el uso de microorganismos en ausencia de oxígeno para la estabilización de la materia orgánica mediante su conversión a metano y otros productos inorgánicos incluyendo el dióxido de carbono”. Este proceso está dividido en forma sintética en tres etapas de acuerdo con la actividad metabólica predominante y sus productos finales. La primera etapa es la hidrólisis, la segunda es la acidogénesis, incluyendo la acetogénesis y la tercera es la metanogénesis.

En el presente estudio y con el uso de reactores anaerobios (RALLFA) se utilizaron microorganismos termófilos que actúan de una forma secuencial. Para que el proceso se realice adecuadamente debe existir una cantidad y actividad adecuada de todos los grupos bacterianos involucrados puesto que el producto de las reacciones de un grupo sirve de sustrato para el siguiente. Así se mantiene un equilibrio en las velocidades de formación y eliminación de intermediarios evitando su acumulación (Díaz *et al.*, 2002). El proceso se presentó en la Fig. 1.

2.2.1 Bacterias “fermentativas”² o hidrolíticas

La materia orgánica polimérica no puede ser utilizada directamente por los microorganismos a menos que se hidrolicen en compuestos solubles que pueden atravesar la membrana celular. La hidrólisis es, por tanto, el primer paso necesario para la degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos. Ésta es llevada a cabo por enzimas extracelulares excretadas por las bacterias hidrolíticas. Como resultado, se producen compuestos solubles que serán metabolizados por las bacterias anaerobias (Pavlostathis y Giraldo, 1991). Las bacterias que llevan a cabo estas reacciones son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, pertenecientes a los géneros: *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Butyvirbio*, *Ruminococcus*, *Acetovibrios*, *Streptococcus*, *etc.* (Díaz *et al.*, 2002).

² La fermentación es un nombre dado por Louis Pasteur a la biorreacción en condiciones anaerobias de *Saccharomyces cerevisiae* con glucosa para producir alcohol etílico y dióxido de carbono. Por tanto, cualquier otra biorreacción que no sea ésta NO es una fermentación

2.2.2 Bacterias acidogénicas (formadoras de ácido)

Este tipo de bacterias utilizan la glucosa para generar una mezcla de ácidos propiónico, acético y butírico, además de hidrógeno y CO₂. Estos ácidos pueden recuperarse o ser convertidos ya sea en biomasa, la cual puede transformarse en metano y CO₂, los cuales son aprovechables.

Algunas características de esta fase ácida son:

- El pH cae a un valor de 5 o menos, por la presencia de los ácidos orgánicos volátiles y por las elevadas concentraciones de CO₂
- La demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno, (DQO) y la conductividad eléctrica del medio se incrementarán significativamente debido a la disolución de ácidos orgánicos
- Disolución de algunos constituyentes inorgánicos, principalmente metales pesados y de algunos nutrientes en el medio líquido, debido a los bajos valores del pH.

Los microorganismos presentes tienen tasas de reproducción altas con velocidades de duplicación de 30 minutos. Algunos de ellos, presentes en estas etapas, son del género *Clostridium* y *Propionibacterium* (Pavlostathis y Giraldo, 1991).

2.2.3 Bacterias acetogénicas

Son las encargadas de convertir los ácidos propiónico y butírico en acético además de hidrógeno y CO₂. Su proliferación es relativamente lenta (tiempo de duplicación de 1.5 a 4 días). Representantes de los microorganismos acetogénicos son: *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Eubacterium*, *Pelobacter*, *Metanobacillus omellionskii*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophomonas sapovarans*, *Syntrophospora bryantii*, *Syntrophus buswellii* y *Syntrophobacter wolinii*, que pertenecen a un grupo denominado organismos acetógenos productores obligados de hidrógeno (OHPA, por sus siglas en inglés). De la misma forma, se encuentran las bacterias homo-acetogénicas las cuales son anaerobias obligadas y utilizan el CO₂ como aceptor final de electrones y tienen al acetato como único producto final de la degradación (Díaz *et al.*, 2002).

2.2.4 Bacterias metanogénicas

Pertenecen al grupo actualmente conocido como *Archaea* cuyos miembros presentan características diferentes en cuanto a la composición química de algunas estructuras celulares de las bacterias. Morfológicamente, puede ser bacilos cortos y largos, cocos de varios arreglos celulares, células en forma de placas y metanógenos filamentosos, existiendo tanto Gram positivos como Gram negativos. Las bacterias metanogénicas son anaerobias estrictas y producen metano como principal producto de sus mecanismos energéticos. Se dividen principalmente, de acuerdo con el tipo de metanogénesis que llevan a cabo, en *acetoclásticas* e *hidrogenofílicas*. Las primeras son las más importantes dentro de este proceso, ya que se encargan de convertir el ácido acético en metano y dióxido de carbono. Tienen un desarrollo lento, entre 2 y 3 días. Además, tienen influencia en los cambios de pH al eliminar el ácido acético y producir una mayor cantidad de metano en el proceso. Las *hidrogenofílicas* controlan el potencial redox del proceso y también la formación de ácidos grasos volátiles, consumen hidrógeno y ácido fórmico para la formación de metano (Castro, 2004). Algunos de los microorganismos presentes en esta etapa son: *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanococcus*, *Methanomicrobium*, *Metanogenium* y *Metanospirillum*.

Las bacterias metanogénicas están ampliamente distribuidas en la naturaleza en sitios carentes de oxígeno y por esta razón es imposible encontrarlas a cielo abierto, ya que el oxígeno es altamente tóxico para estos organismos.

Este tipo de *arqueobacterias*, como ya se mencionó, se encuentra en lugares donde hay agua estancada en putrefacción o en las plantas para el tratamiento de aguas negras. En la actualidad, el hombre ya las está aprovechando y se han podido obtener volúmenes suficientes de gas metano para ser utilizados industrialmente como combustible, hecho que atrae la atención de muchos científicos, ya que propone una alternativa al agotamiento de los energéticos no renovables. Actualmente, estas bacterias se mantienen, en condiciones adecuadas, en varios laboratorios del mundo y son de interés en las investigaciones sobre los procesos metabólicos que llevan a cabo.

Otro tipo de *arqueobacteria* que se conoce es el de las *termoacidófilas*, que también se caracterizan por habitar en un nicho ecológico peculiar. Las *Sulfolobus*, uno de los dos géneros de *termoacidófilas*, se encuentra en los manantiales de aguas sulfurosas y se desarrolla generalmente a temperaturas de aproximadamente 80°C y algunas variedades lo hacen inclusive a temperaturas de 90°C. Otra característica particular de *Sulfolobus* es que el pH óptimo para su proliferación es muy ácido (generalmente pH = 2.0), si se toma en cuenta que normalmente el pH adecuado para la vida es de 7.5. Así, se ve obligada a mantener en su interior un pH de aproximadamente 7.5. Pero no solamente puede sobrevivir con estas diferencias tan grandes de pH, sino que las aprovecha para importar nutrientes a su interior. Por algún tiempo se pensó que estos microorganismos tan peculiares se habían adaptado a nichos ecológicos distintos y extremos, pero hoy en día se sabe que integran un nuevo grupo de microorganismos (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983).

El descubrimiento de este nuevo grupo de organismos es de gran importancia, ya que ayudará a revelar la historia del origen de la vida debido a que, cuando solamente se conocían dos líneas a partir de las cuales se originan todos los organismos vivientes, se hacía muy difícil la interpretación de las diferencias que las caracterizan. Ha sido a partir del descubrimiento de una tercera línea de vida que la interpretación de las propiedades ancestrales y las recientemente adquiridas se ha hecho más equilibrada, ya que estas tres líneas de desarrollo son equidistantes entre sí. El descubrimiento de las *arqueas* ha permitido el acercamiento a dos problemas de gran importancia. Uno de ellos es la naturaleza del antecesor común a todas las formas de vida y el otro se refiere a la incógnita sobre la evolución de la célula de los organismos superiores (Díaz *et al.*, 2002).

Fenotípicamente, las *arqueas* son muy parecidas a las bacterias, la mayoría son pequeñas (0.5–5 µm) y con formas de bastones, cocos y espirilos. Las *arqueas* generalmente se reproducen por fisión, como la mayoría de las bacterias, el genoma es de un tamaño de 2 a 4 µm, similar también a la mayoría de las bacterias. Si bien lucen como bacterias, poseen características bioquímicas y genéticas que las alejan de ellas. Por ejemplo, no poseen paredes celulares con peptidoglucanos, presentan secuencias únicas en la unidad pequeña del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), poseen lípidos de membrana diferentes tanto de las bacterias como de los eucariotas (García *et al.*, 1991).

2.3 Características generales de las familias de bacterias metanogénicas (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)

Metanobacteriaceae: Bacilos largos o cortos; utilizan H₂, CO₂ y algunos alcoholes o formiato como sustratos para metanogénesis; los cocos que utilizan sólo H₂ o metanol son en su mayoría Gram positivos; contienen pseudomureína y son no móviles

Metanotermaceae: Bacilos; los sustratos que consumen son H₂ y CO₂; Gram positivos; contienen pseudomureína; no móviles, además de ser termofílicos extremos

Metanococcaceae: Cocos irregulares; los sustratos más importantes para estos son el H₂, CO₂ y formiato; Gram negativos y móviles

Metanomicrobiaceae: Bacilos, espirilos, placas o cocos irregulares; utilizan H₂, CO₂ algunos sustratos como formiato o alcoholes para la metanogénesis; son Gram negativos; algunos microorganismos de este género presenta movilidad y otros son no móviles

Metanocorpusculaceae: Cocos irregulares pequeños; utilizan como principal sustrato el H₂, CO₂ y en ocasiones el formiato o alcoholes para la llevar a cabo la metanogénesis; son Gram negativos; presentando movilidad algunas especies

Metanosarcinaceae, Pseudosarcina: Cocos irregulares; utilizan H₂, CO₂, acetato, compuestos metílicos como sustratos para la metanogénesis, nunca se alimentan de formiato; los cocos que utilizan sólo H₂ o metanol son en su mayoría Gram positivos o negativos. Finalmente, con base en el tipo de sustrato utilizado, las bacterias metanogénicas se subdividen en tres grupos:

Grupo 1: utiliza como fuente de energía H₂, formiato y ciertos alcoholes, siendo el CO₂ el aceptor final de electrones el cual es reducido a metano

Grupo 2: utiliza una amplia variedad de compuestos que contienen el grupo metilo, algunas de las moléculas son oxidadas a CO₂, el cual actúa con aceptor final de electrones y se reduce directamente a metano.

Grupo 3: aunque la mayor parte del metano que se genera en la naturaleza proviene del rompimiento del acetato, la habilidad de catabolizar este sustrato está limitada a los géneros: *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (*Methanotrix*). Es frecuente encontrar en reactores

anaerobios una competencia por el acetato entre estos dos géneros; sin embargo, las bajas concentraciones de acetato que usualmente predominan al interior de los reactores favorece la proliferación de las *Methanosaeta*.

En la Tabla 2 pueden verse las principales familias de bacterias metanogénicas, así como los sustratos utilizados durante el proceso de la metanogénesis.

Tabla 2. Familias de bacterias metanogénicas (García *et al.*, 1991)

Organismos	H ₂ + CO ₂	Fórmico	Acetato
<i>Methanobacterias</i>			
<i>Methanobacterium</i>			
<i>alcaliphilum</i>	+	-	-
<i>bryantii</i>	+	-	-
<i>esponolae</i>	+	-	-
<i>formicum</i>	+	+	-
<i>ivanovii</i>	+	-	-
<i>polustre</i>	+	+	-
<i>thermoaggregans</i>	+	-	-
<i>thermoalcaliphicum</i>	+	-	-
<i>thermoautotrophicum</i>	+	-	-
<i>thermoformicum</i>	+	+	-
<i>wolfei</i>	+	-	-
<i>Methanobrevibacter</i>			
<i>orboriphilus</i>	+	-	-
<i>ruminantium</i>	+	+	-
<i>smithii</i>	+	+	-
<i>Methanothermus</i>			
<i>ferdivus</i>	+	-	-
<i>sociabilis</i>	+	-	-
<i>Methanosphaera</i>			
<i>cunicul</i>	-	-	-
<i>stadtmonoe</i>	-	-	-
<i>Methanococcus</i>			
<i>deltae</i>	+	+	-
<i>holophilus</i>	-	-	-
<i>fannaschii</i>	+	-	-
<i>maripoldus</i>	+	+	-
<i>thermolithotrophicus</i>	+	+	-
<i>vanielli</i>	+	+	-
<i>voltae</i>	+	+	-

2.3.1 Principales características de las bacterias metanogénicas

En 1977, Woese clasificó a las bacterias metanogénicas dentro de las *Arqueobacterias* que presentan diferencias con las bacterias clásicas, tanto fisiológicas como estructurales. Su pH óptimo es de 6-8, el amoníaco y el sulfuro de hidrógeno son sus principales fuentes de nitrógeno y azufre; el níquel es el átomo central de la coenzima F₄₃₀, que actúa como grupo prostético de la enzima metil-coMreductasa que cataliza el paso final de la formación de metano (Schoberth, 1983).

El factor F₄₂₀ hace que las bacterias metanogénicas fluorescan a 420 nm y permite su identificación por medio de un microscopio con dispositivo de epifluorescencia, determinando la actividad bioquímica en los reactores anaerobios (Gorris *et al.*, 1988). Son bacterias anaerobias estrictas que exigen, además de la ausencia de oxígeno, condiciones de reducción del ambiente inferiores a los -350 mV para proliferar (Zehnder *et al.*, 1978). Tienen como características comunes producir metano, un intervalo de sustratos muy limitado y tiempos de proliferación largos. La pared de estas bacterias en ningún caso tienen mureína o peptidoglucanos, por el contrario, las bacterias metanogénicas tienen una gran variedad de estructuras. Por ejemplo, las *Methanobacteriaciae* tiene una pared compuesta de un polímero denominado pseudomureína que se caracteriza por la ausencia de ácido murámico y la presencia de ácido n-acetiltalosaminurónico, mientras que las *Methanosarcina* tienen un polisacárido. Estas estructuras hacen a las bacterias insensibles a la acción de la lisosima y antibióticos tales como la penicilina, cicloserina y la valeromicina.

La composición en lípidos de estas bacterias es también particular. Las secuencias de ARNr no están relacionadas con las de las bacterias típicas y los ácidos ribonucleicos de transcripción (ARNt) no tienen la parte común universal sino un análogo. Se han descubierto nuevas coenzimas que no se encuentran en otros microorganismos, excepto el cofactor F₄₂₀, tales como la coenzima M (ácido 2-mercaptoetanol-sulfónico), la metanopterina, el factor F₃₄₂, el FAF (formaldehído activador, por sus siglas en inglés), el factor CDR o metanofurano y el factor F₄₃₀. Por lo tanto, Balch *et al.*, en 1979, propusieron una revisión de la taxonomía de las metanogénicas, la cual está constituida de trece especies divididas en tres órdenes de cuatro familias y géneros. Actualmente, estos tres órdenes se componen de siete familias y veintiún

géneros con más de setenta especies (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983). En el presente estudio sólo se aislarán 3 bacterias metanogénicas. Sus características se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de las bacterias metanogénicas en estudio (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)

	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Methanobacterium wolfei</i>	
Tamaño	0.5 a 1.5 x 2.0 a 10 µm	0.4 a 1.5 x 1.1 a 14 µm	0.2 a 1.3 x 1.4 a 16 µm	
Temperatura óptima de proliferación	35°C hasta 60°C (termófilo moderado)	55°C hasta 70°C (termófilo)	65°C hasta 85°C (termófilo)	
pH óptimo de proliferación	6.0 hasta 8.5	6.5 hasta 8.5	6.0 hasta 8.0	
O₂	Anaerobio estricto	Anaerobio estricto	Anaerobio estricto	
Forma	Bacilos rectos o ligeramente curvos, pero no helicoidales	Bacilos rectos o ligeramente curvos Helicoidales	Bacilos cortos	
Gram	Negativo	Negativo	Positivo	
Movilidad	Nula	Nula	Nula	
Esporas	No están presentes	No están presentes	No están presentes	
Composición celular	Pseudomureína	Pseudomureína	Pseudomureína en menor cantidad	
NaCl	Prolifera a bajas concentraciones	Prolifera a bajas concentraciones	Prolifera a altas concentraciones	
Morfología de colonias	Forma	Circular	Circular	Circular
	Borde	Entero	Ondulado	Entero
	Elevación	Elevada	Convexa	Convexa
	Textura	Viscosa	Viscosa	Butirosa
	Color	Blanca	Blanca	Blanca

Las características más importantes de las bacterias metanogénicas según Schoberth (1983) son las siguientes:

1. Poseen la habilidad para formar metano a partir de un intervalo de sustrato muy restringido de hidrógeno, dióxido de carbono, ácido fórmico, monóxido de carbono, metanol, metilaminas y acetato
2. En contraste con las eubacterias, la pared celular no tiene mureína y su composición inusual difiere según los grupos. En general, contiene lípidos polares no saponificables éteres de glicerol, lípidos neutros que contienen el escualeno

3. Contienen 6 coenzimas y factores de crecimiento tales como la coenzima M (ácido-sulfónico-mercaptoetano), F₄₂₀, F₄₃₀ (un componente tetrapirrol con Ni), la metanopterina, entre otros
4. Secuencias atípicas en el ARNt
5. Las bacterias metanogénicas frente a los antibióticos responden de manera muy diferente en relación con las bacterias típicas, por lo que son insensibles a la penicilina, la vancomicina y la fosfomicina.

2.3.1.1 Características de *Methanobacterium thermoautotrophicum*

Methanobacterium thermoautotrophicum es un *archaea* cuya temperatura óptima de proliferación es de 45°C (Fig. 2), la secuencia del genoma revela una estructura de varias enzimas que catalizan las reacciones a dicha temperatura. La descripción de jerarquía es la siguiente:

- Género: *Methanobacterium*
- Especie: *thermoautotrophicum*

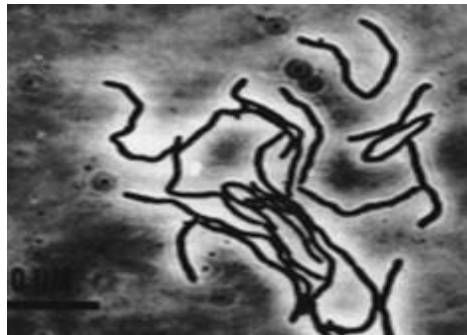


Figura 2. *Methanobacterium thermoautotrophicum*
(García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)

Es una bacteria productora de metano, que fue aislada originalmente en las instalaciones de una planta de tratamiento de residuos municipales en Illinois, EE.UU. Esta bacteria crece fácil y rápidamente bajo condiciones de laboratorio. Se han purificado y estudiado los extractos metanogénicos y las enzimas por más de 20 años, por lo que se ha observado la característica de requerir sales para su desarrollo. Se encuentra dentro de la familia de los metanógenos que habitan en todas las instalaciones de la biodegradación de residuos sólido municipales.

En el Departamento de Energía de EE.UU., se estudia la bioquímica y la biología molecular de las bacterias metanogénicas con los objetivos de maximizar los usos biotecnológicos y convertir materiales de desecho en metano como una alternativa a los combustibles fósiles, así como terminar con la generación y liberación de metano hacia la atmósfera.

Esta especie se encuentra en lugares donde hay agua estancada en putrefacción o en las plantas para el tratamiento de aguas negras. En la actualidad, el hombre ya las está aprovechando y se han podido obtener volúmenes suficientes de gas metano para ser utilizados industrialmente como combustible, hecho que atrae la atención de muchos científicos, ya que propone una alternativa al agotamiento de los energéticos no renovables (Kenealy y Zeikus, 1982).

2.3.1.2 Características de *Methanobacterium formicicum*

Methanobacterium formicicum habita en sedimentos acuáticos, en vacunos endosimbiontes o en protozoarios. Microscópicamente tiene forma de bacilos curvados, no esporulados, inmóviles y Gram negativo (Fig. 3). Son *Arqueas* anaerobias estrictas, quimiorganotróficas o quimioheterotróficas.

Pueden encontrarse en suelos pantanosos, sedimentos u otros ambientes anóxicos, produce metano como producto del metabolismo catabólico, su temperatura óptima de proliferación para especies termófilas es de 55°C.

Este tipo de bacterias se encuentran en los estómagos de los rumiantes, donde se degrada la celulosa y en el tracto digestivo de la mayoría de los animales. También se pueden encontrar en el fondo de los océanos o de los manantiales de aguas termales, lo que demuestra que, a pesar de su intolerancia al oxígeno, se encuentran ampliamente distribuidas sobre la Tierra. Actualmente estas bacterias se mantienen, en condiciones adecuadas en varios laboratorios del mundo y son utilizadas en las investigaciones sobre sus procesos metabólicos (Schauer y Ferry, 1980).

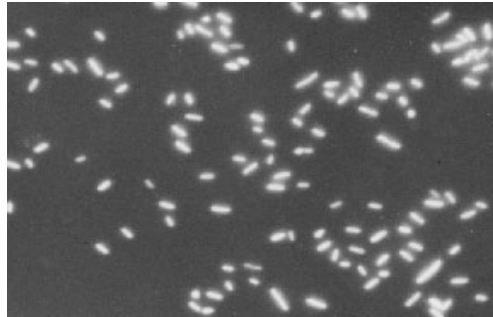


Fig. 3. *Methanobacterium formicicum*
(García-Rodríguez y García-Sánchez,1983)

2.3.1.3 Características de *Methanobacterium wolfei*

Este tipo de bacterias son halófilas extremas, que requieren altas concentraciones de sal para vivir. Se localizan comúnmente en aguas que contienen cantidades saturantes de cloruro de sodio, como por ejemplo a lo largo de las costas, los grandes lagos salados y el Mar Muerto.

Las halófilas extremas dan un color rojizo a la sal en los pozos de evaporación y son capaces de descomponer el pescado salado. Estas bacterias han llamado la atención de los microbiólogos básicamente por dos razones: la primera es que presentan mecanismos para mantener diferencias en la concentración de iones (sodio o cloro), muy grandes entre el interior y el exterior de la célula, utilizando estas diferencias de concentración para el transporte de sustancias hacia el interior o el exterior de la célula. En segundo lugar, estas bacterias tienen un sistema fotosintético relativamente simple, ya que no se basa en la presencia de clorofila, como es el caso de la molécula que capta la energía luminosa, sino en un pigmento presente en su membrana, llamado bacteriorrodopsina, que es muy similar a uno de los pigmentos que se encuentran en la retina del ojo. Dicho pigmento ha sido muy estudiado y actualmente se conocen su estructura y su función con gran detalle, lo que ha generado un gran avance del conocimiento de las proteínas membranales y sobre todo de aquellas proteínas que transforman la luz en energía química. En la Fig. 4, se puede ver una imagen obtenida mediante microscopía electrónica de la *Metanobacterium wolfei* (Konig *et al.*, 1985).

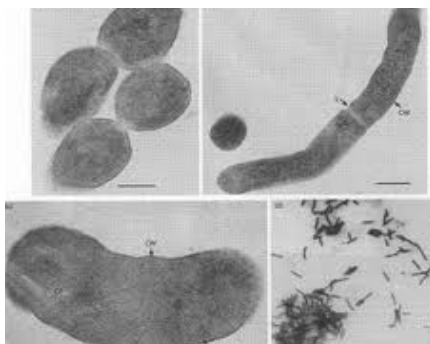
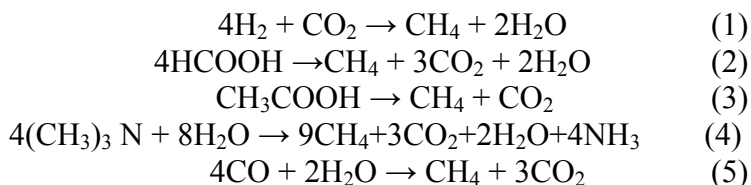


Fig. 4. *Metanobacterium wolfei*
(García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)

2.3.2 Rutas metabólicas de las bacterias metanogénicas (García-Rodríguez y García-Sánchez, 1983)

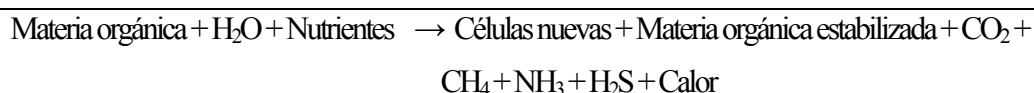
Las bacterias metanogénicas que se han estudiado en cultivo puro constituyen un grupo de microorganismos anaerobios estrictos; vale decir, no crecen en ambientes con concentraciones de oxígeno disuelto mayores a 1 mg L^{-1} y pierden viabilidad cuando se los expone a concentraciones de 10 mg L^{-1} y no forman esporas.

El uso de sustratos es muy restringido. En la actualidad se conoce que los microorganismos metanogénicos utilizan los siguientes sustratos: $\text{CO}_2 + \text{H}_2$, formiato, acetato, metanol, metilaminas y monóxido de carbono. Las reacciones típicas de conversión que producen energía involucrando a estos compuestos son las siguientes:



En la degradación anaerobia, las tres rutas principales en la formación del metano son la conversión del dióxido de carbono y de hidrógeno molecular para dar metano y agua y la conversión de formiato y acetato para dar metano, dióxido de carbono y agua (las tres primeras de la lista anterior).

Los microorganismos metanógenos y acidógenos establecen una relación simbiótica, en la cual los metanógenos convierten los productos finales de fermentación (por ejemplo, hidrógeno, formiato y acetato) en metano y dióxido de carbono. Los microorganismos metanógenos son capaces de utilizar el hidrógeno producido por los acidógenos mediante la eficaz acción de la enzima hidrogenasa. Como los metanógenos son capaces de mantener una presión parcial de hidrógeno extremadamente baja, el equilibrio de las reacciones de hidrólisis se desplaza hacia la formación de productos finales más oxidados (por ejemplo formiato y acetato). La utilización del hidrógeno producido por los acidógenos y por otros anaerobios por parte de los metanógenos se llama transferencia de hidrógeno entre especies. En efecto, las bacterias metanogénicas separan compuestos que inhibirían la proliferación de los microorganismos acidógenos. La degradación anaerobia de materiales sólidos orgánicos puede describirse de manera general mediante la siguiente ecuación (Flaherty *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 1993).



Con fines prácticos, la conversión global de la fracción orgánica de los materiales sólidos en metano, dióxido de carbono y amoníaco puede representarse mediante la siguiente ecuación:



donde:

$$s = a - nw - m$$

$$r = c - ny - 2s$$

Los términos CaHbOcNd y CwHxOyNz , se utilizan para representar, sobre una base molar, la composición de la materia orgánica presente en el comienzo (sustrato) y en el final (biomasa) del proceso, respectivamente. Se supone que los materiales sólidos orgánicos resultan completamente hidrolizados.

En las operaciones donde los materiales sólidos orgánicos han sido mezclados con lodos de aguas residuales, se ha encontrado que el gas recogido de los digestores contiene entre un 50 a un 60% de metano. Este valor se puede elevar hasta a un 70-75% cuando el material sólido orgánico se compone de excretas de animales en producción industrial, alimentados con piensos de composición estandarizada. También se ha reportado que se producen de 0.6 a 1 m³ de gas por cada kg de sólidos volátiles metabolizados (Tchobanoglous *et al.*, 1994).

Capítulo 3. Metodología

3.1 Vinazas

Las vinazas son un residuo industrial del proceso de la destilación alcohólica que poseen características físicas y químicas que las convierten en un agente muy contaminante del medio ambiente. En la Tabla 4 se presentan las características físicas y químicas de vinazas similares a las utilizadas en esta investigación.

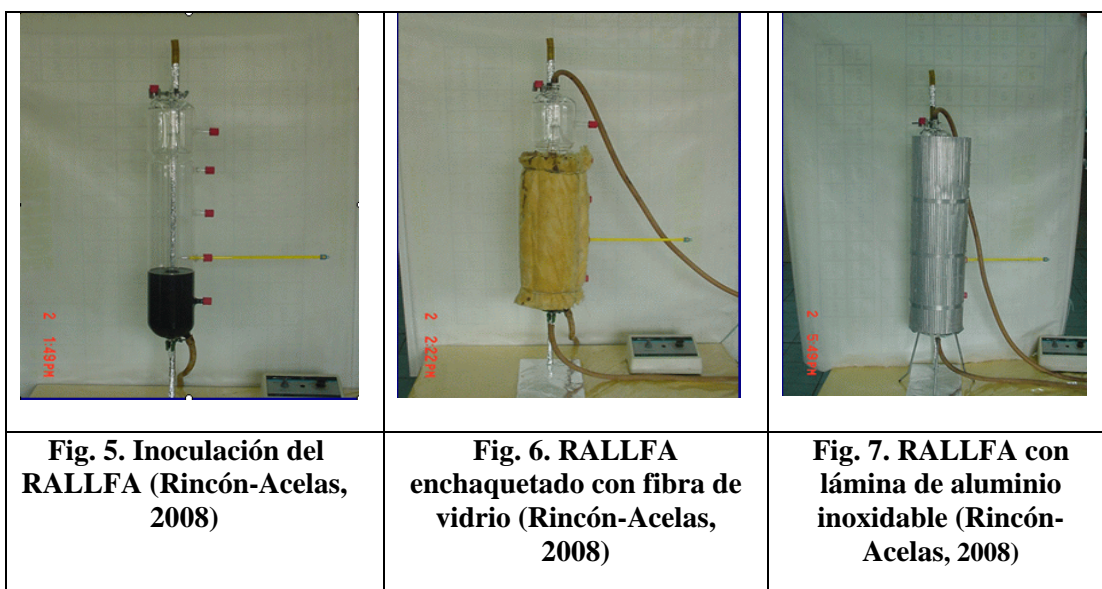
Tabla 4. Características de vinazas de la India y México (Rincón-Acelas, 2008)

Características	Promedio (Nimbalkar, 2005)	Promedio (Rincón-Acelas, 2008)
Temperatura	78.0-82.0	-
Valor de pH	3.7-4.5	4.3
Sólidos totales, mg L ⁻¹	9-12% p/p	85000-91000
Sólidos disueltos volátiles, mg L ⁻¹	-	70000-79000
Sólidos disueltos fijos, mg L ⁻¹	-	5000-7000
Sólidos suspendidos totales, mg L ⁻¹	-	9000
DQO, mg L ⁻¹	80000-120000	100000-116000
DBO ₅ , mg L ⁻¹	45000-50000	67000-98000
Cloruros, mg L ⁻¹	5000-6000	4700-5200
Sulfatos, mg L ⁻¹	4000-8000	7000-8200
Sulfuros, mg L ⁻¹	4000-8000	24-69
Sodio, mg L ⁻¹	400-600	700-2150
Potasio, mg L ⁻¹	8000-1200	8350-9940
Nitrógeno total mg L ⁻¹	1000-1200	5.35-6.1%
Fósforo, mg L ⁻¹	200-300	-
Calcio, mg L ⁻¹	2000-3500	2000-2080

3.2 Reactores RALLFA

Los reactores empleados están contruidos de vidrio (Figura 5). Cuentan con recirculación interna de agua caliente para mantener las tres temperaturas de operación, 45, 55 y 65°C. Para evitar pérdidas de calor en los RALLFA, están enchaquetados con fibra de vidrio (Figura 6) y recubiertos con una lámina de aluminio inoxidable (Figura 7). El volumen de trabajo es de 2.4 L, cuenta con una altura de 65 cm, 3.7 cm de diámetro interno y 7.3 cm de externo. Constituido de una zona de reacción en la parte inferior con una alta concentración de lodos de alta sedimentación (lecho de lodos granulados), como se presenta en la Figura 5, mientras que en la parte intermedia está compuesto de lodos más ligeros (lecho de lodos floculados). Los lodos de inoculación provienen de una empresa petroquímica mexicana ubicada en la zona de Tamaulipas, el cual tiene una consistencia granular y de color negro. Este inóculo se adaptó

desde un 10 hasta un 50% de vinaza (Rincón-Acelas, 2008). En la zona superior se encuentra un separador de fases gas-sólido-líquido que ayuda a la retención de los sólidos en el reactor, a la salida del agua ya tratada y del biogás, tiene la forma de un embudo invertido. Los reactores tienen un extremo inferior cónico por donde se lleva a cabo la alimentación y la purga de los lodos excedentes (Castro-González y Durán-de-Bazúa, 2001; Rincón-Acelas, 2008).



3.3 Diagrama experimental

El diseño experimental se realiza siguiendo la metodología del diagrama de la Figura 8.

3.3.1 Elaboración del medio de cultivo general (Bryant *et al.*, 1971)

Para obtener el medio de cultivo general es necesario preparar las siguientes soluciones:

- a) Agua anóxica: en un matraz Erlenmeyer adicionar el agua desionizada, tapan el matraz con papel aluminio haciendo dos orificios para permitir la salida del vapor, colocar en una parrilla hasta ebullición. Retirar el matraz de la parrilla y dejar enfriar con un burbujeo de N₂, para mantener las condiciones anóxicas, la preparación de dicha agua se realiza en una cámara anaerobia de guante, cuya atmósfera es de N₂, esta campana se muestra en la Figura 9

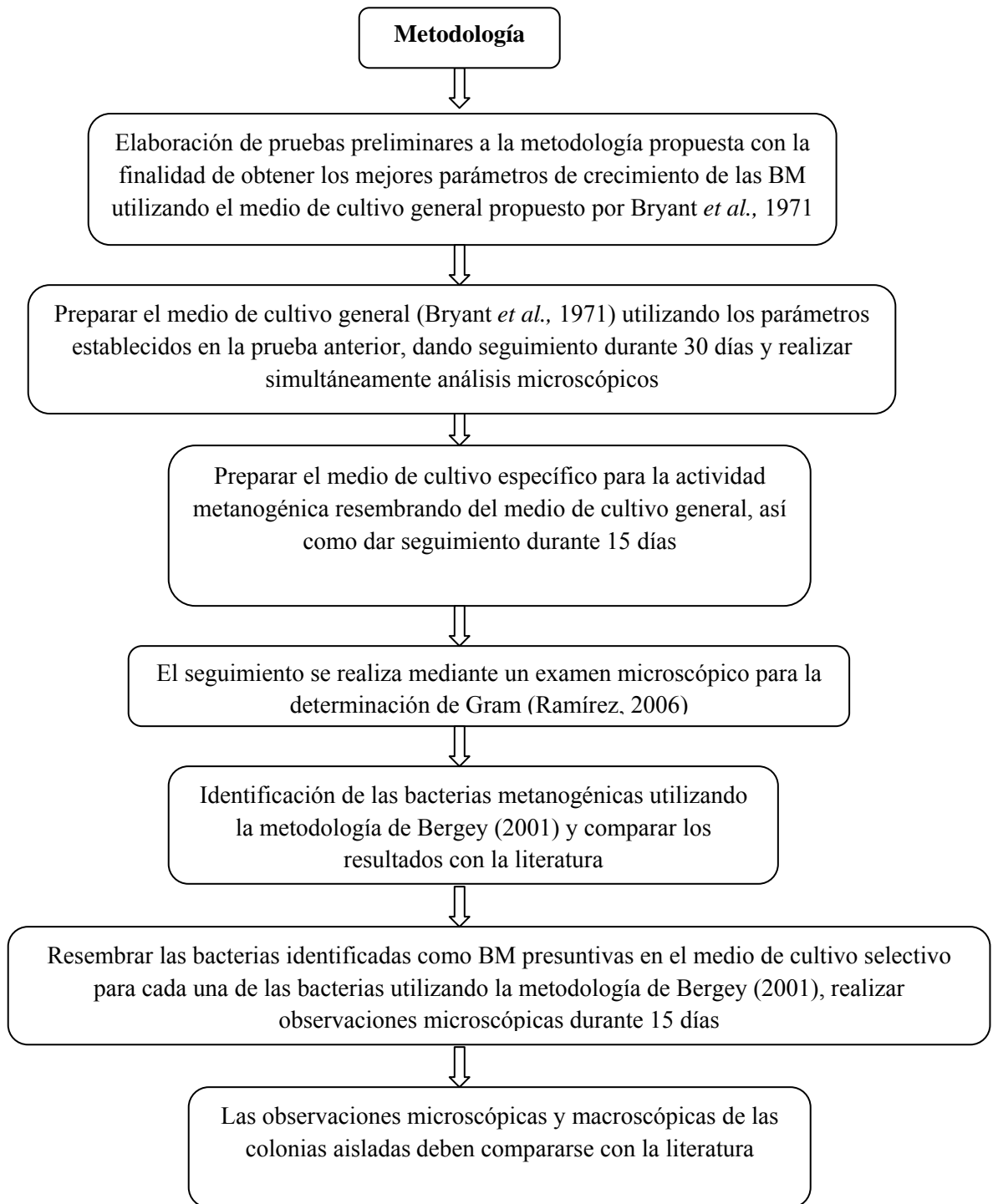


Figura 8. Diagrama experimental

- b) Solución mineral 1, mineral 2, mineral 3 y traza de minerales, cuya composición se presenta en la Tabla 5, todas ellas preparadas con agua anóxica a temperatura ambiente
- c) Las soluciones antes mencionadas se mezclan y adicionan NaCl, NH₄Cl, FeSO₄·7H₂O, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·7H₂O, NaHCO₃, acetato de sodio, formiato de sodio, extracto de levadura, tripticasa, cisteína y Na₂S·9H₂O, en las concentraciones establecidas en la Tabla 5. Posteriormente, se esteriliza en un autoclave vertical de 3 calores, fabricación Nacional ARTES03017, modelo CV-250, por 20 minutos a 121°C (presión manométrica de 15 lb_f/pulg² manométrica *-pounds per square inch gauge-* o psig). Finalmente, se adicionan a la solución previamente esterilizada por filtración la solución de trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

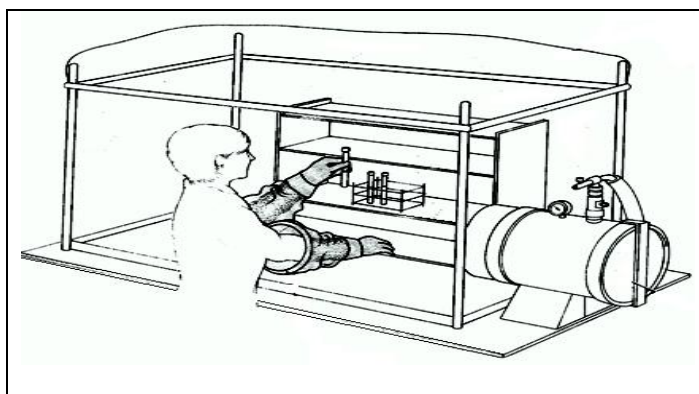


Figura 9. Cámara anaerobia de guante (Atlas y Bartha, 2002)

3.3.2 Elaboración del medio de cultivo específico para la actividad metanogénica (Balch *et al.*, 1979; Flaherty *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 1993)

El medio específico para las bacterias metanogénicas se prepara realizando la mezcla de la solución mineral 1, mineral 2, traza de minerales, oligoelementos, FeSO₄·7H₂O (0.1%), resarzurina (0.1%), extracto de levadura, bicarbonato de sodio, peptona de caseína, molibdato de sodio, cisteína en las cantidades especificadas en la Tabla 6. La mezcla se esteriliza por 20 minutos a 121°C (15 lb_f pulg⁻² o psig). Posteriormente, se adicionan a la solución previamente esterilizada por filtración trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo general (Bryant *et al.*, 1971)

Medio general (para 1 litro)		Solución mineral 1	Cantidad añadida a 1 L
Solución	Volumen añadido	K ₂ HPO ₄	6 g
Solución mineral 1,	50 mL	Solución mineral 2	Cantidad añadida a 1 L
Solución mineral 2,	50 mL	K ₂ HPO ₄	6.0 g
Solución mineral 3,	500 mL	KH ₂ PO ₄	6.0 g
Solución de vitaminas	10 mL	(NH ₄) ₂ SO ₄	6.0 g
Solución de oligoelementos	10 mL	NaCl	12.0 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.6 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·7H ₂ O	0.02 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.16 g
NaHCO ₃	7.5 g	Solución mineral 3	Cantidad añadida a 1 L
Acetato de sodio	2.5 g	KCl	0.671 g
Formiato de sodio	2.5 g	MgCl ₂ ·2H ₂ O	5.5 g
Extracto de levadura	2.0 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	6.9 g
Trypticasa	2.0 g	NH ₄ Cl	0.5 g
Cisteína hidrocloreuro	0.6 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.28 g
Na ₂ S·9H ₂ O	0.6 g	K ₂ HPO ₄	0.28 g
Solución de vitaminas	Cantidad añadida a 1 L	Solución de oligoelementos	Cantidad añadida a 1 L
Biotina	0.002 g	Acido nitrilo-acético	1.5 g
Acido fólico	0.002 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.0 g
Piridoxina hidrocloreuro	0.01 g	MnSO ₄ ·2H ₂ O	0.5 g
Tiamina hidrocloreuro	0.005 g	NaCl	1.0 g
Riboflavina	0.005 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
Acido nicotínico	0.005 g	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g
Pantotenato de calcio	0.005 g	CoSO ₄ o CoCl ₂	0.1 g
Vitamina B12	0.00001 g	ZnSO ₄	0.1 g
Acido para-amino benzoico	0.005 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.001 g
Acido lipolítico	0.005 g	AlK(SO ₄) ₂	0.01 g
		H ₃ BO ₃	0.01 g
		NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.01 g

3.3.3 Elaboración de los medios de cultivo selectivos para cada una de las bacterias seleccionadas, para esta investigación

3.3.3.1 *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Kenealy y Zeikus, 1982)

- a) Preparar la solución mineral 2, traza de minerales, resarzurina, NH₄Cl, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, NaHCO₃, acetato de sodio, cisteína, Na₂S·9H₂O, La mezcla se esteriliza, por 20 minutos a 121°C (15 lb_f/pulg² o psig). Posteriormente, se adicionan a la solución previamente esterilizada por filtración la solución de trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

Tabla 6. Composición del medio de cultivo para la actividad específica de BM (Flaherty *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 1993)

Medio de cultivo específico BM	
Solución	Cantidades
Solución mineral 1	50 mL
Solución mineral 2	50 mL
Solución de oligoelementos	10 mL
Solución de vitaminas	10 mL
Resazurina	1 mL
Extracto de levadura	1 g
Peptona de caseína	1 g
Bicarbonato de sodio	3 g
Solución de FeSO ₄	1 mL
Molibdato de sodio	20 mM
Cisteína	0.5 g

3.3.3.2 *Methanobacterium formicicum* (Schauer y Ferry, 1980)

- a) Preparar la solución mineral 1, mineral 2, traza de minerales, resazurina, FeSO₄·7H₂O, NaHCO₃, acetato de sodio, formiato de sodio, extracto de levadura, tripticasa, cisteína, Na₂S·9H₂O. La mezcla se esteriliza por 20 minutos a 121°C (15 lb_f/pulg² o psig). Posteriormente, se adicionan a la solución previamente esterilizada por filtración la solución de trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

3.3.3.3 *Methanobacterium wolfei* (Konig *et al.*, 1985)

- a) Preparar la solución mineral 2, traza de minerales, resazurina, NaHCO₃, acetato de sodio, formiato de sodio, cisteína, Na₂S·9H₂O, NH₄Cl, Fe(NH₄)₂ SO₄·7H₂O.
- b) Esterilizar la mezcla por 20 minutos a 121°C (15 lb_f/pulg² o psig). Posteriormente, se adicionan a la solución previamente esterilizada por filtración trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

La Tabla 7 se presenta la composición de los tres medios de cultivos selectivos.

3.4 Observaciones directas en placa

La identificación de las especies *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium wolfei* se lleva a cabo utilizando la técnica de recuento directo en placa:

- a) Preparar los medios de cultivo específico y selectivo para las bacterias como lo indican los puntos 3.3.1 y 3.3.2

- b) Hacer una solución de agar bacteriológico general BD BIOXON que consiste en suspender 46 g del agar en 1 L de agua desionizada, mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 a 2 minutos, esterilizar a 120°C durante 15 minutos

Tabla 7. Composición de los diferentes medios de cultivo selectivo a 45, 55 y 65°C

Composición/Bacteria	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> (Kenealy y Zeikus, 1982) 45°C	<i>Metanobacterium formicicum</i> (Schauer y Ferry, 1980) 55°C	<i>Metanobacterium wolfei</i> (Konig <i>et al.</i> , 1985) 65°C
Componente	Cantidad	Cantidad	Cantidad
Solución mineral 1, mL		50	10
Solución mineral 2, mL	25	50	25
NH ₄ Cl, g	1.25		1.25
Solución de minerales, mL	10	10	10
Solución vitaminas, mL	10	10	10
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , g	0.02		0.02
NaHCO ₃ , g	7.5	5.0	7.5
Cisteína clorhidrato, g	0.6	0.5	0.6
Na ₂ S.9H ₂ O, g	0.6	0.5	0.6
Resazurina, mL	0.25	0.25	0.25
FeSO ₄ .7 H ₂ O, g		0.002	
Acetato de sodio, g		2.5	
Formiato de sodio, g		2.5	1.0
Extracto de levadura, g		2.0	0.5
Tripticasa, g		2.0	0.25

- c) Mezclar el medio correspondiente y agar en proporciones de 85:15, verter la mezcla en cajas Petri estériles de 60 x 15 mm
- d) Tomar 1 mL de lodo, sembrarlo en el medio de cultivo general y realizar las respectivas diluciones hasta obtener una dilución de 10⁻², medir 0.1 mL de esta dilución y sembrarla en la caja Petri por triplicado para cada medio de cultivo correspondiente e inocular a la temperatura respectiva
- e) Incubar por 15 días a la temperatura deseada. Diariamente, retirar las cajas de cada medio de cultivo selectivo y observar en el microscopio óptico de campo claro Olympus BH-2 con objetivo 40X y los resultados se comparan con la literatura.

3.5 Preparación de muestras para observar al microscopio óptico de campo claro (Tinción de Gram)

- a) Seleccionar el microorganismo desarrollado en los diferentes medios de cultivo ya sea sólido o líquido por medio de un “asa” previamente esterilizada, y colocar al microorganismo en un porta objetos
- b) Fijar a la llama la muestra (sin quemar la muestra)
- c) Añadir a la muestra fijada, una gota de cristal violeta (disolver 0.5 g de cristal violeta o violeta de Genciana en 100 mL de agua desionizada, formar una solución homogénea), durante 1 a 2 minutos
- d) Lavar la muestra con agua desionizada estéril (colocar en un matraz Erlenmeyer, 1 L de agua, tapar y esterilizar, por 20 minutos a 121°C), para retirar el exceso de colorante
- e) Colocar una gota de lugol (disolver 0.3 g de yodo y 0.6 g de yoduro de potasio en 100 mL de agua desionizada estéril), en la muestra, durante 1 minuto y repetir el inciso (d)
- f) Adicionar etanol al 95% para decolorar la muestra durante 20 segundos y repetir el inciso (d)
- g) Añadir safranina (0.25 g safranina en 100 mL de agua desionizada estéril), a la muestra y esperar 1 minuto, repetir el inciso (d)
- h) Secar la muestra al aire libre
- i) Observar la muestra al microscopio óptico de campo claro Olympus BH-2 con objetivo 40X
- j) Anotar las observaciones de la forma, tinción Gram según Ramírez (2006).

3.6 Diseño experimental

3.6.1 Selección del medio de cultivo e inoculación de BM a 45, 55 y 65°C

Se elabora el medio de cultivo general de acuerdo con las indicaciones señaladas anteriormente y se extraen aproximadamente 10 mL de lodos por la parte inferior de cada uno de los reactores, cada uno de estos lodos se inocula en un matraz de 250 mL con 100 mL del medio de cultivo general y se incuban a 45, 55, y 65°C por cinco días. Se observa la presencia de desarrollo microbiano (Tabla 8).

Tabla 8. Diseño experimental 1

<i>Nivel</i>	1	2	3	30
<i>Factores</i>				
A: Medio de cultivo	<i>Medio general (MG)</i>			
B: Temperatura, °C	45	55	65	
C: Tiempo, días	1	2	3	30

3.6.2 Prueba 1. Selección de la dilución de trabajo

- Tomar 1 mL lodo de cada RALLFA y 9 mL de medio de cultivo general, realizando 9 diluciones: 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , en tubos de cultivo. Todo el procedimiento se realiza en la cámara anaerobia
- Incubar por 5 días a las temperaturas correspondientes
- Al cabo de los 5 días, tomar una muestra por medio de un “asa” estéril haciendo un frotis en el porta objetos de cada dilución del medio de cultivo líquido
- Realizar una tinción de Gram
- Observar las muestras de cada temperatura al microscopio
- Seleccionar la dilución en la cual las bacterias se encuentren separadas o aisladas y con características físicas definidas. Con los resultados obtenidos, se procede a realizar el segundo experimento.

3.6.3 Prueba 2. Medio de cultivo general sólido

Para aislar las bacterias metanogénicas e identificar sus características de proliferación (“crecimiento”) se seleccionan tres factores: Tipo de medio (A), temperatura (B) y tiempo (C).

- Una vez seleccionados los factores, el siguiente paso es determinar los niveles para cada uno de los factores, obteniendo como resultado los niveles que se muestran en la Tabla 10, lo que permite definir un diseño factorial de $1^1 \times 3^1 \times 30^1$. Para cada una de las corridas presentadas, se realizan tres réplicas, con el fin de facilitar el análisis y mejorar la estimación del error experimental. El medio se expone durante 30 días.

- b) Para realizar el segundo experimento, colocar 0.1 mL del medio de cultivo general a la dilución seleccionada y a las temperaturas de trabajo correspondientes de 45, 55 y 65°C, en 30 cajas Petri, que contienen el medio general para las bacterias y el agar según el punto 3.4. Realizar el procedimiento por triplicado en una cámara anaerobia de guante, dando un total de 90 cajas que se cierran herméticamente
- c) Las 90 cajas se incuban por 30 días a la temperatura correspondiente de 45, 55 y 65°C. Diariamente se retira una caja de cada temperatura y de cada medio específico. Se realiza un frotis en un porta objetos, al cual se le aplica una tinción de Gram. Ésta es observada en un microscopio Olympus BH-2 a 40X. Todos los porta objetos deben estar rotulados inequívocamente para próximas observaciones.

3.6.4 Prueba 3. Medio de cultivo específico para BM

Para realizar el aislamiento de las bacterias metanogénicas, se utilizan los cuatro factores: Medio de cultivo específico para bacterias BM, temperatura, tiempo y dilución, que se muestran en la Tabla 9 con un diseño factorial de $1^1 \times 3^1 \times 15^1 \times 1^1$.

Tabla 9. Diseño experimental 2

<i>Factores/niveles</i>	1	2	3	15
A: Medio de cultivo	<i>Medio específico (BM)</i>			
B: Temperatura, °C	45	55	65	
C: Tiempo, días	0			15
D: Dilución	10^{-2}			

Se toma una colonia aislada del medio de cultivo general y ésta se resiembró en el medio de cultivo específico para BM. Para cada una de las temperaturas presentadas se realizan tres réplicas dando un total de 135 cajas Petri, con el fin de facilitar el análisis y mejorar la estimación del error experimental (Bergey, 2005; Hurley y Roscoe, 1983; Ramírez, 2006).

3.6.5 Prueba 4. Medio de cultivo selectivo de las especies en estudio

Para la determinación de las especies de bacterias *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium wolfeii* se seleccionan tres factores: Tipo de medio (A), temperatura (B), tiempo (C). Una vez seleccionados los factores, el siguiente paso es determinar los niveles para cada uno de los factores, obteniendo como resultado los niveles que se muestran en la Tabla 10, lo que permite definir un diseño factorial de $4^1 \times 3^2$. Para cada una de las corridas presentadas, se realizan tres réplicas, con el fin de facilitar el análisis y mejorar la estimación del error experimental. Los medios se exponen durante 15 días.

Tabla 10. Diseño experimental 3

<i>Nivel</i>	1	2	3
<i>Factores</i>			
A: Medio de cultivo selectivo	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Methanobacterium wolfeii</i>
B: Temperatura °C	45	55	65
C: Tiempo	0	15	

- a) La resiembra consiste en tomar 1 colonia aislada con características presuntivas de cada bacteria del medio específico para la actividad metanogénica de cada una de las temperaturas 45, 55 y 65°C y colocar esta colonia por triplicado en 45 cajas Petri con el respectivo medio de cultivo para cada bacteria a aislar, las cuales se mantienen en incubación por 15 días
- b) Diariamente se retira una caja de cada temperatura y se observa directamente en el microscopio el desarrollo de las colonias.

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 Selección del medio de cultivo general e inoculación de BM a 45, 55 y 65°C

El lodo incubado en el matraz de 250 mL a las tres temperaturas presentó un desarrollo microbiano escaso durante los 2 primeros días. A partir de los días 3 al 5 se incrementó considerablemente el desarrollo, presentando un cambio de color en el medio, además de una proliferación superficial en forma de película, una opacidad persistente y una cantidad de sedimento abundante y viscoso lo cual fue observado de forma macroscópica. Esto se debió a que el medio de cultivo se manejó en forma líquida.


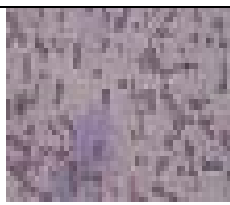

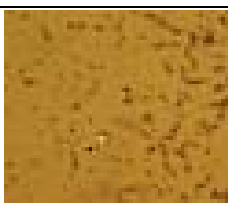
Se observó que en el matraz incubado a la temperatura de 55°C se obtuvo mayor cantidad de sedimento que a las temperaturas de 45 y 65°C.

Durante los cinco días se realizaron tinciones de Gram para cada una de las temperaturas obteniendo 15 preparaciones. Éstas fueron observadas en el microscopio óptico Olympus BH-2 a 40X.

Al final del experimento se identificaron a 45°C microorganismos en forma de bacilos Gram positivos y negativos, cocos Gram negativos, mientras que a 55°C se observaron bacilos Gram positivos y negativos, cocos Gram positivos y, finalmente, a 65°C se observaron bacilos Gram positivos y cocos Gram positivos y negativos.

En la Tabla 11 se presentan las observaciones en el medio de cultivo general en el día 3. El complemento de esta tabla durante los días 1, 2, 3, 4, y 5 se presenta en el Anexo A.


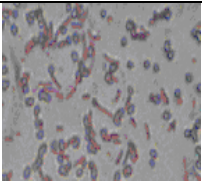
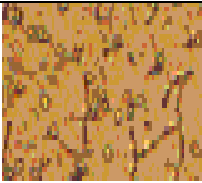

Tabla 11. Observaciones microscópicas y macroscópicas del medio de cultivo general (día 3)

Temperatura	45°C	55 °C	65 °C
			
Se observa un sedimento blanco turbio en el fondo del matraz	Bacterias en forma de bacilos Gram (+) y (-) y alguno cocos Gram (-)	Bacterias en forma de bacilos Gram (+) y (-) y algunos cocos Gram (+)	Bacterias en forma de bacilos Gram (+) y (-) y algunos cocos Gram (+) y (-)

4.2 Prueba 1. Selección de la dilución de trabajo

Obtenido el desarrollo en el medio de cultivo general propuesto, se realizaron las respectivas diluciones de 10^0 a 10^{-8} bajo condiciones de anaerobiosis, durante 5 días de incubación a las diferentes temperaturas de trabajo. Se identificó la dilución con proliferación adecuada según observaciones macroscópicas y microscópicas seleccionando la dilución de 10^{-2} , pues obtuvo el mejor desarrollo y mayor claridad en las observaciones al microscopio óptico (Marca Olympus BH-2 a 40X). Éstas presentaron perfectamente las características microscópicas de cada una de las bacterias; ya que en las otras diluciones eran muy abundantes o escasas en su desarrollo poblacional, lo que no permitió observar características microscópicas representativas de cada una de las bacterias para la siguiente resiembra. Las observaciones obtenidas después de 4 días de incubación se presentan en la Tabla 12 mostrando que, a una temperatura de 45°C , existen bacilos largos y cortos Gram positivos y Gram negativos, además de cocos Gram positivos. Para 55°C , se hallan bacilos largos Gram positivos y negativos y, finalmente, a 65°C se exhiben bacilos cortos Gram positivos y negativos, además de cocos Gram negativos. Las observaciones durante los 5 días a las 3 temperaturas de trabajo se presentan en el Anexo B.

Tabla 12. Observaciones microscópicas en el medio de cultivo general diluido a 10^{-2} (día 4)


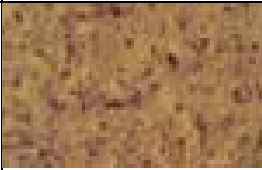
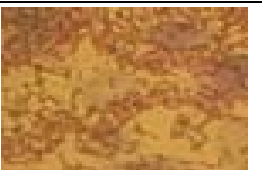
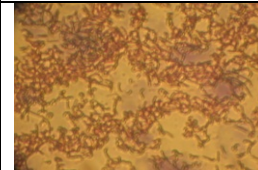
Temperatura, $^{\circ}\text{C}$	45°C	55°C	65°C
			
La opacidad del medio iba disminuyendo conforme iba aumentando la dilución	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (-), se logran ver unos diplococos y bacilos sin agrupación en grandes cantidades	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (-), se logran ver unos diplococos y bacilos sin agrupación en menores cantidades	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (-), se logran ver unos diplococos y bacilos sin agrupación en menores cantidades

4.3 Prueba 2. Medio de cultivo general sólido

Con la dilución seleccionada 10^{-2} de la prueba 1, se realizó una resiembra en el medio sólido en cajas Petri con medio de cultivo general preparado según el punto 3.3.1 a las 3 temperaturas de trabajo, obteniendo un total de 90 cajas Petri. El tiempo de incubación fue de 30 días, de los cuales sólo se realizaron observaciones microscópicas y macroscópicas durante los primeros 15 días. Esto fue debido a que se presentó el fenómeno de deshidratación en las cajas por las temperaturas manejadas, por lo que la proliferación se vio afectada en los 15 días posteriores.

Los resultados obtenidos a partir de día 3 y hasta el 15 fue la identificación macroscópicamente del incremento en la cantidad de colonias en los medios de cultivo a las tres temperaturas, percibiendo un mayor desarrollo de colonias a la temperatura de 55°C en donde se presentaron colonias forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa y con una coloración blanca, con un tamaño promedio de 3mm, algunas eran con características similares pero de color café y gris, mientras que a 45 y 65°C, con un menor desarrollo, se obtuvieron colonias con características similares en cuanto a forma circular, borde entero, elevación convexa, textura viscosa y con una coloración blanca, crema y café de un tamaño promedio de 2 mm. Las observaciones microscópicas se realizaron con ayuda de un microscopio óptico (Marca Olympus BH-2 a 40X). A partir de las tinciones de Gram, se observó que a 45°C había bacilos largos Gram positivos y negativos al igual que cocos Gram positivos. Para 55°C se presentan bacilos largos Gram positivos y negativos y, finalmente, a 65°C se identifican bacilos cortos Gram positivos y negativos, además de cocos Gram negativos. En la Tabla 13 se muestran las características macroscópicas y microscópicas obtenidas en el día 12 utilizando el medio de cultivo general y en el Anexo C se presentan las observaciones durante los 15 días a las tres temperaturas mencionadas.


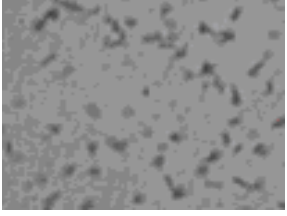
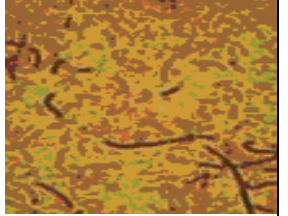

Tabla 13. Observaciones microscópicas y macroscópicas del medio de cultivo general (día 12)

Caja Petri	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Se observan colonias de forma circular, borde entero, elevación convexa, textura viscosa y con una coloración blanca, crema y café	Se observan bacilos regulares y algunos ligeramente curvos Gram (-) y algunos cocos Gram (+)	Se observan bacilos regulares Gram (-) sin agrupación y algunos cocos Gram (-) sin agrupación	Se observan bacilos regulares y algunos ligeramente curvos Gram (+) sin agrupación

4.4 Prueba 3. Medio de cultivo específico para BM

De la prueba 2 se tomó la caja incubada durante 12 días a las tres temperaturas de trabajo y se sembró en un medio de cultivo específico de BM, las cuales se incubaron durante 15 días. Se presentó un incremento en el desarrollo de colonias a partir del día 3 a las tres temperaturas. El comportamiento fue similar a la prueba 2, viendo un mayor desarrollo a la temperatura de 55°C. Se observaron colonias de forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa y con una coloración blanca y crema de aproximadamente 3mm de diámetro. Las características presentadas a 45 y 65°C son semejantes, presentando colonias con forma circular, borde entero, elevación convexa, textura viscosa y una coloración blanca y crema con tamaño promedio de 2mm. Las características microscópicas fueron igualmente obtenidas que en el punto anterior con ayuda de un microscopio óptico (Marca Olympus BH-2 a 40X). Mediante las tinciones de Gram se observó que después de 10 días de incubación del experimento, a 45°C y 55°C, había presencia de bacilos largos Gram positivos y negativos, mientras que los cocos Gram positivos sólo se presentaron a 45°C. Finalmente, a 65°C, se obtuvieron bacilos cortos Gram positivos y negativos. Todo esto se encuentra en la Tabla 14. Las observaciones microscópicas completas del día 1 al día 15 se presentan en el Anexo D.

Tabla 14. Observaciones microscópicas y macroscópicas de los medios de cultivo específicos para las BM (día 10)

Temperatura	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Se observan colonias de forma circular, borde entero, elevación convexa, textura viscosa y con una coloración blancas-crema y blanca	Se observan bacilos regulares y algunos ligeramente curvos Gram (-)	Se observan bacilos regulares Gram (-)	Se observan bacilos regulares y algunos largos ligeramente curvos

4.5 Prueba 4. Medio de cultivo selectivo para las especies en estudio

De la prueba 3, se tomaron las cajas a las 3 temperaturas después de haber incubado el medio específico 10 días y se resembraron las colonias con características presuntivas de las bacterias metanogénicas a estudiar en un medio de cultivo selectivo para cada temperatura de trabajo. Se incubaron durante 15 días. A partir del día 3 se presentó un desarrollo microbiano exponencial en los tres medios de cultivo selectivo utilizados. El mayor desarrollo microbiano fue a la temperatura de 55°C durante los 15 días que duró el experimento.

Macroscópicamente se observaron, a 45 y 65°C, colonias con forma circular, borde entero, elevación convexa, textura viscosa y una coloración blanca con un tamaño promedio de 2mm. A 55°C se vieron colonias de forma circular, borde entero, elevación convexa, textura butirosa y con una coloración blanca, de aproximadamente 3mm de diámetro.

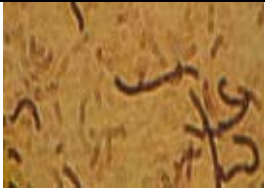


Dentro de las características microscópicas obtenidas con ayuda de un microscopio óptico (Marca Olympus BH-2 a 40X), tinciones de Gram y con un portaobjetos graduado (Marca: Superfrost) se observaron características, forma y tamaño de las bacterias presentes en las cajas a las 3 temperaturas.

A la temperatura de 45°C se obtuvieron bacterias en forma de bacilos largos ligeramente curvos, Gram negativos sin presencia de esporas con un tamaño promedio de las bacterias de 7 μm de ancho x 5 μm de largo. A 55°C se observaron bacilos rectos ligeramente curvos, Gram positivos, sin presencia de esporas, con un tamaño promedio de 0.8 μm de ancho x 6 μm de largo y, finalmente, a 65°C se obtuvieron bacterias en forma de bacilos cortos, Gram positivos, sin presencia de esporas, con un tamaño promedio de 0.6 μm ancho x 6 μm de largo.

En la Tabla 15 se presentan las características microscópicas de los tres medios de cultivo selectivo utilizados al día 10.

En el Anexo E se observa el seguimiento microscópico de los medios selectivos utilizados durante los 15 días.

Tabla 15. Observaciones microscópicas de los medios de cultivo selectivo para las BM a temperaturas de 45, 55 y 65°C (día 10)

Temperatura	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
Imagen			
Bacterias y descripción	<p><i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i></p> <p>Se observan bacilos ligeramente curvos pero no helicoidales Gram(-) sin presencia de esporas</p>	<p><i>Methanobacterium formicicum</i></p> <p>Se observan bacilos ligeramente curvos, no helicoidales Gram(-) sin presencia de esporas</p>	<p><i>Methanobacterium wolfei</i></p> <p>Se observan bacilos cortos Gram(+) y no se logra ver la presencia de esporas</p>

4.6 Discusión

- La selección del medio de cultivo general propuesto por Bryant *et al.* (1971) permitió el desarrollo de bacterias de diversas especies. Eso se corroboró mediante la tinción de Gram, la cual presentó una diversidad de características microscópicas en cada una de las muestras, que indicaba que se tenía más de una especie microbiana en cada muestra.
- En la metodología de la prueba 1 se logró seleccionar la dilución óptima de trabajo de 10^{-2} como la de mejor proliferación bacteriana, es decir, donde se tenían observaciones al microscopio de microorganismos perfectamente aislados y se podía definir perfectamente la caracterización de cada uno.
- El medio de cultivo general propuesto por Bryant *et al.* (1971), esta vez sólido, es decir en cajas Petri, fue de gran ayuda, primeramente para realizar los aislamientos iniciales del trabajo, ya que se seleccionaron aquellas colonias que cumplían con las características que indicaba la literatura de acuerdo con las bacterias en estudio para ser resembradas en un medio específico para bacterias metanogénicas. Además, también ayudó para, de manera macroscópica, verificar que había varias especies bacterianas en el medio de cultivo. Esto se percibió al ver colonias con diversidad de características (color, tamaño y forma), lo cual indicaba diversidad de géneros microbianos.

- El medio de cultivo específico para BM propuesto por Balch *et al.*, (1979), Flaherty *et al.* (1998) y Soto *et al.* (1993) también fue de gran ayuda para el aislamiento de las bacterias en estudio, ya que se pudo observar de manera macroscópica y microscópica que la variación en cuanto a las características de los microorganismos y las colonias se iba haciendo más homogénea. Por las características del medio de cultivo podía predecirse tener solamente bacterias metanogénicas. Esto ayudó para nuevamente seleccionar aquellas colonias que cumplieran con las características proporcionadas por la literatura para resembrarlas en un medio selectivo para cada una de las bacterias e incubarlas a las temperaturas de trabajo.
- La elección del medio de cultivo selectivo para *Methanobacterium thermoautotrophicum* propuesto por Kenealy y Zeikus (1982), para *Metanobacterium formicicum* por Schauer y Ferry (1980) y para *Methanobacterium wolfei* por König *et al.* (1985), fue efectivo al lograr la proliferación de éstas bajo las condiciones de trabajo seleccionadas en los objetivos de esta investigación (45, 55 y 65°C). Al utilizar la metodología de Bergey (2001), se obtuvieron las características microscópicas de cada especie y con los resultados microscópicos descritos en los Anexos A, B, C, D y E se comparó con la literatura, coincidiendo las características obtenidas en esta investigación con las reportadas por García-Rodríguez y García-Sánchez (1983), dando como resultado las siguientes características de cada especie:
- *Methanobacterium thermoautotrophicum*: bacilos ligeramente curvos pero no helicoidales Gram(-), sin presencia de esporas, con un tamaño promedio de las bacterias de 7 µm de ancho x 5 µm de largo. Se desarrolló abundantemente a 45°C, ya que a 55 y 65°C hubo proliferación escasa
- *Metanobacterium formicicum*: bacilos rectos curvos, Gram positivos, sin presencia de esporas, con un tamaño promedio de 0.8 µm de ancho x 6 µm de largo. Se desarrolló abundantemente a 55°C, ya que a 45°C no hubo proliferación y a 65°C fue escasa
- *Methanobacterium wolfei*: bacilos cortos, Gram positivos, sin presencia de esporas, con un tamaño promedio de 0.6 µm ancho x 6 µm de largo. Se desarrolló abundantemente a 65°C, a 45°C no hubo crecimiento y a 55°C sí existió proliferación bacteriana.

Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

De acuerdo con el objetivo general, que era el de aislar tres especies de bacterias metanogénicas presentes en los tres reactores tipo RALLFA a 45, 55 y 65°C y los objetivos particulares, que eran los de establecer el medio de cultivo general para el desarrollo de las bacterias metanogénicas que se encuentran en un RALLFA, de identificar la dilución idónea para poder llevar a cabo la caracterización de las bacterias durante el experimento, de establecer el medio de cultivo específico para el desarrollo de las bacterias metanogénicas en estudio y de identificar las bacterias metanogénicas en estudio mediante un medio de cultivo selectivo empleando la tinción de Gram, se tienen las siguientes conclusiones:

- El medio de cultivo general propuesto por Bryant *et al.* (1971), fue óptimo para la proliferación microbiana de BM
- Los factores que afectan directamente el desarrollo de las BM son los medios de cultivo, así como las temperaturas utilizadas, el tiempo de incubación y, finalmente, la dilución de trabajo
- Se desarrollaron las tres especies de trabajo (*Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanobacterium formicicum* y *Methanobacterium wolfei*), presentando una mayor población bacteriana cuantificada macroscópicamente de la especie *Methanobacterium formicicum* a una temperatura de 55°C. En segundo término se tiene la *Methanobacterium thermoautotrophicum* a 45°C y la que presentó el menor desarrollo fue la *Methanobacterium wolfei* a 65°C
- Finalmente, se puede concluir que la mejor temperatura donde existe una población microbiana de los RALLFA que produzca metano es a 55°C, ya que durante todo el trabajo se observó que a esa temperatura tenían mayor proliferación en los medios incubados a esa temperatura.

5.2. Recomendaciones

Con base en la investigación realizada, se puede recomendar para las siguientes etapas de la investigación lo siguiente:


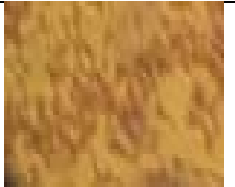



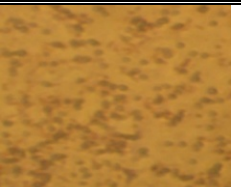
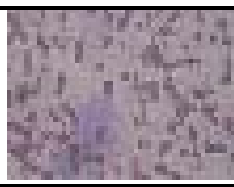

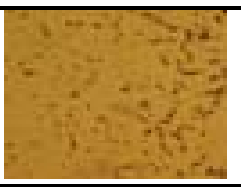





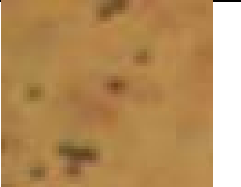
- Para corroborar la presencia de las especies sospechosas de ser BM se podrían realizar análisis de microscopía más potente como la microscopía electrónica de barrido e identificar organelos o estructuras de la pared celular exclusivas o particulares de cada especie
- Otras opciones para identificar a estas bacterias sería la secuenciación de su ADN por métodos como la electroforesis en gel o con la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés)
- Al poder aislar de manera pura estas bacterias se podrían conservar las cepas para el estudio de otras aplicaciones biotecnológicas.

ANEXO A

Medio de cultivo general líquido

(5 días)

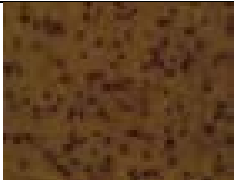






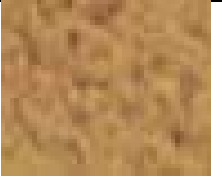

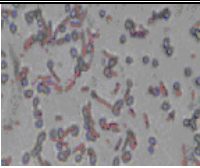
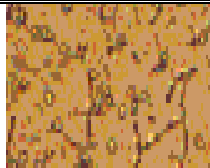
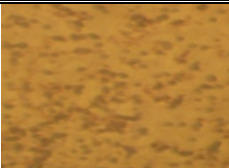



Tabla A1. Medio de cultivo general líquido (5 días)

Día 1	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos cortos y largos Gram (-) sin agrupaciones	Se observan cocos G(+) y bacilos Gram (-) en forma de cadena	Se observan cocos Gram (+) y bacilos muy alargados. Gram (-) sin agrupación
Día 2	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (-) en forma de cadena	Se observan cocos y bacilos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (-) aislados en forma de cadena
Día 3	45°C	55 °C	65 °C
			
Descripción	Bacterias en forma de cocos regulares Gram(+) y bacilos cortos Gram (-), sin agrupación	Bacterias en forma de cocos regulares Gram (+) y bacilos cortos Gram (-) en mayor proporción, sin agrupación	Bacterias en forma de cocos regulares, aislados Gram (+) sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)
Día 4	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) aislados sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) algunos en diplococos	Se observan cocos y bacilos Gram (-) sin agrupación
Día 5	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (-) en forma de cadena	Se observan cocos Gram (-) en su mayoría sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (-) en forma de cadena

Anexo B

**Medio de cultivo general con una
dilución de 10^{-2}
(5 días)**

Tabla B1. Medio de cultivo general con una dilución de 10^{-2} (5 días)




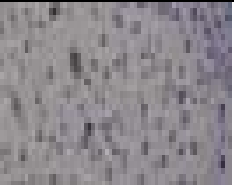


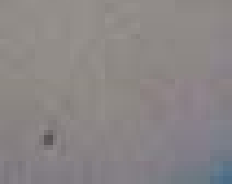





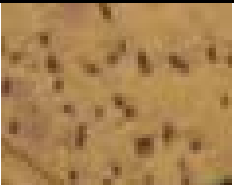


Día 1	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y G (-) aislados sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) algunos en diplococos	Se observan cocos Gram (+) y bacilos muy alargados Gram (-) sin agrupación
Día 2	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y bacilos muy alargados Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y bacilos muy alargados Gram (-) sin agrupación
Día 3	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) aislados sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (-) sin agrupación
Día 4	45°C	55°C	65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (-), se logran ver unos diplococos y bacilos sin agrupación en grandes cantidades	Se observan cocos Gram (-) y bacilos Gram (-), se logran ver unos diplococos	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (-), se logran ver unos diplococos y bacilos sin agrupación en menores cantidades
Día 5	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) aislados sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (-) sin agrupación

Anexo C












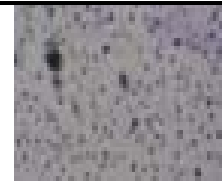
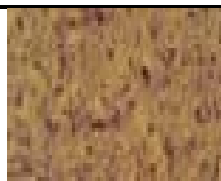


Medio de cultivo general sólido

(30 días)


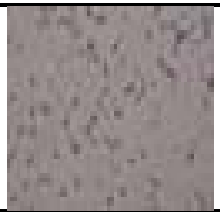
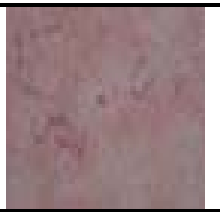
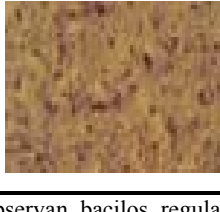


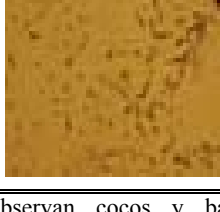
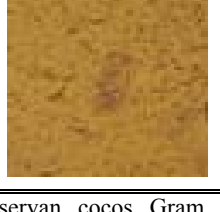
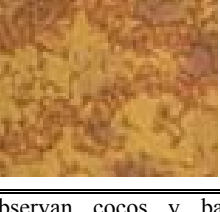
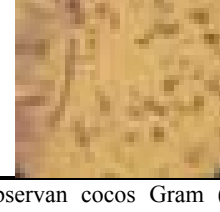
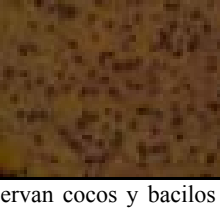
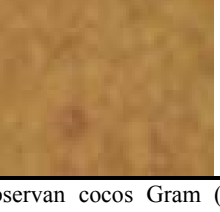
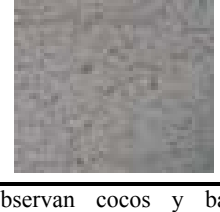
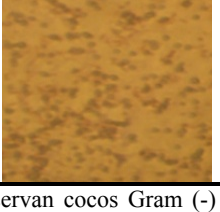

Tabla C1. Medio de cultivo general sólido (30 días)

Día 1	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos ligeramente curvos Gram (+) y algunos cocos y G Gram (+)	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)	Se observan bacilos ligeramente curvos Gram (+) y algunos cocos y Gram (+)
Día 2	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) sin agrupación y algunos bacilos Gram (-) y Gram (+)	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación	Se observan bacilos ligeramente curvos Gram (+) y algunos cocos y Gram (-)
Día 3	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación	Se observan algunos cocos y bacilos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) sin agrupación y algunos bacilos Gram (-) y Gram (+)
Día 4	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) y bacilos Gram (+) y Gram (-)	Se observan bacilos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación
Día 5	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) en su mayoría y algunos bacilos Gram (-) sin agrupación	Se observan diplococos Gram (+) en su mayoría y algunos bacilos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-)

...continuación **Tabla C1**

Día 6	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos largos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (+) sin agrupación	Se observan algunos cocos y bacilos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación
Día 7	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos largos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (+) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación
Día 8	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos largos Gram (+) sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (-) aislados en forma de cadena	Se observan algunos cocos y bacilos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación
Día 9	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y bacilos Gram (+) sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y Gram (+) en algunas agrupaciones en forma de cadena	Se observan bacilos largos Gram (+) sin agrupación
Día 10	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y algunos bacilos Gram (+) en forma de cadena	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación y algunos bacilos G(-)	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (+) y Gram (-).

...continuación **Tabla C1**³

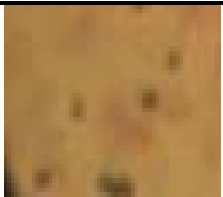


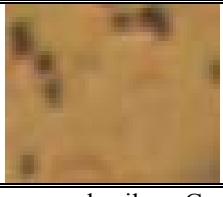
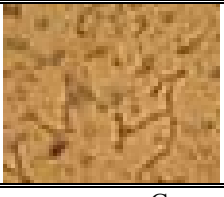
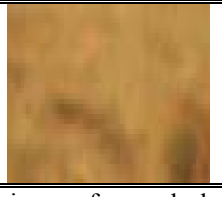








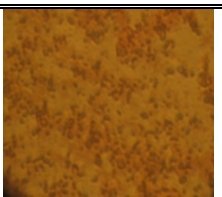
Día 11	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y algunos bacilos Gram (+) en forma de cadena	Se observan cocos y bacilos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)
Día 12	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos regulares y algunos ligeramente curvos Gram (-) y algunos cocos Gram (+)	Se observan bacilos regulares Gram (-) sin agrupación y algunos cocos Gram (-) sin agrupación	Se observan bacilos regulares y algunos ligeramente curvos Gram (+) sin agrupación
Día 13	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y bacilos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y bacilos muy alargados Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (-) aislados en forma de cadena
Día 14	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (+) y bacilos Gram (-) en cadena	Se observan cocos y bacilos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación
Día 15	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y bacilos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (-) en su mayoría sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)	Se observan cocos Gram (+) y Gram (-) sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)

³ **Nota:** A partir del día 15 los medios de cultivo de las cajas se empezaron a deshidratar dejando de haber proliferación microbiana por lo que ya no se hicieron las observaciones pertinentes.

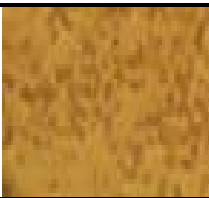




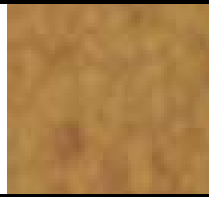
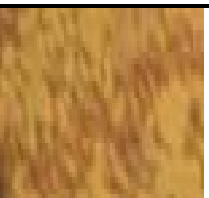





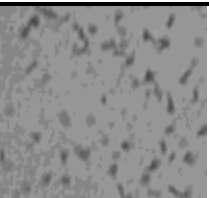
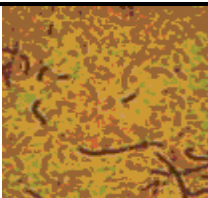
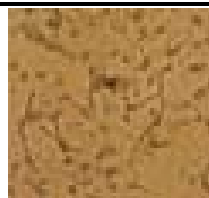
Anexo D

Medio de cultivo específico para bacterias metanogénicas (15 días)




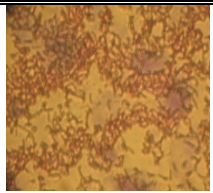

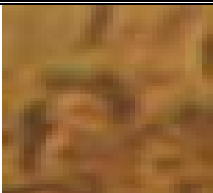




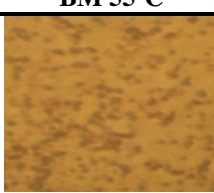
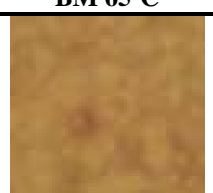



Tabla D1. Medio de cultivo específico para BM (15 días)

Día 1	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (-) sin agrupación	Se observan bacilos Gram (-) y algunos cocos G(-)	Bacterias en forma de bacilos regulares Gram (-)
Día 2	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)	Se observan cocos Gram (-) sin agrupación y algunos bacilos Gram (+)	Bacterias en forma de bacilos regulares y algunos largos ligeramente curvos Gram (-)
Día 3	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)
Día 4	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)	Se observan cocos Gram (+) sin agrupación y bacilos Gram (-)	Bacterias en forma de bacilos regulares Gram (-)
Día 5	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos Gram (+) sin agrupación y bacilos Gram (-)

...continuación **Tabla D1**

Día 6	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)	Se observan cocos Gram (+) sin agrupación y bacilos Gram (-)	Bacterias en forma de bacilos regulares Gram (-)
Día 7	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Bacterias en forma de bacilos regulares Gram (-)	Se observan cocos Gram (+) sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)
Día 8	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (+)	Se observan algunos cocos y bacilos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Bacterias en forma de bacilos regulares Gram (-)
Día 9	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (-) en su mayoría sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)	Bacterias en forma de bacilos regulares Gram (-)
Día 10	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos regulares y algunos ligeramente curvos Gram (-)	Se observan bacilos regulares Gram (-)	Se observan bacilos regulares y algunos largos ligeramente curvos

...continuación **Tabla D1**


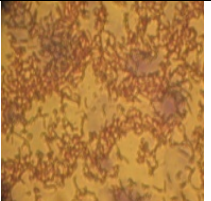
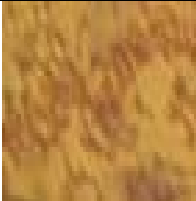
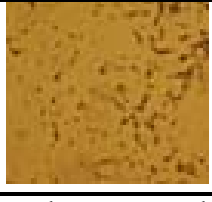
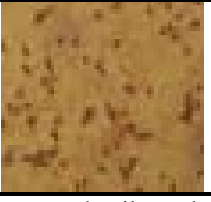
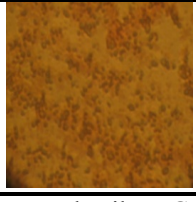
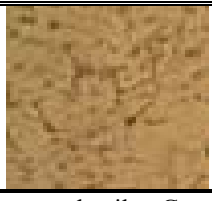
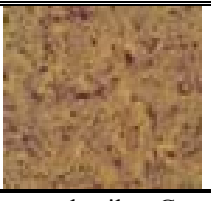

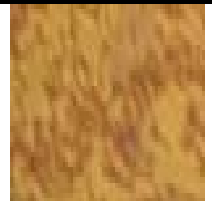

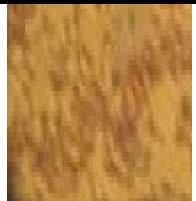
Día 11	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)	Se observan cocos Gram (-) en su mayoría sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)	Bacterias en forma bacilos regulares y algunos ligeramente curvos Gram (-)
Día 12	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (-) en su mayoría sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)	Bacterias en forma de bacilos regulares Gram (-)
Día 13	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)	Bacterias en forma bacilos regulares y algunos ligeramente curvos Gram (-)	Se observan cocos Gram (-) en su mayoría sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)
Día 14	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos Gram (-) en su mayoría sin agrupación y algunos bacilos Gram (-)	Se observan cocos Gram (-) sin agrupación	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)
Día 15	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)	Bacterias en forma bacilos regulares y algunos ligeramente curvos Gram (-)	Se observan cocos y bacilos Gram (-) y algunos cocos Gram (-)

Anexo E

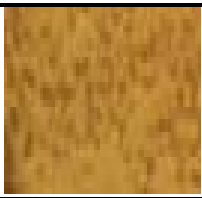
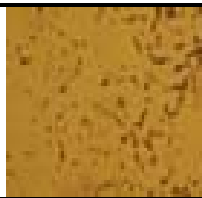
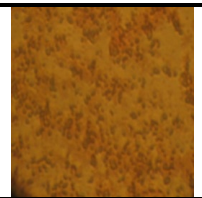

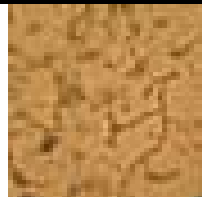
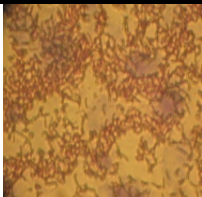
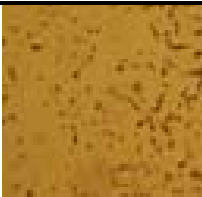
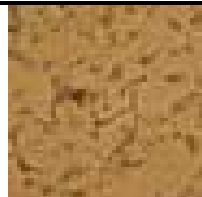


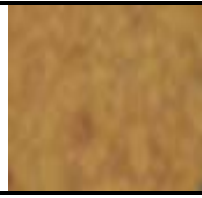
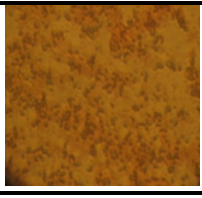
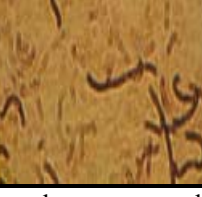


Medio de cultivo selectivo

(15 días)

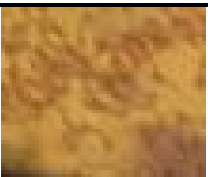

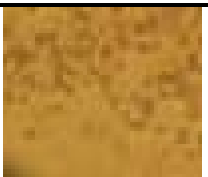

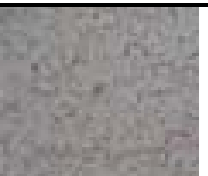
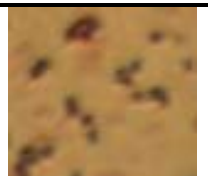






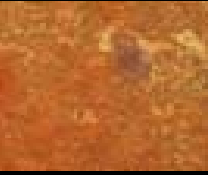
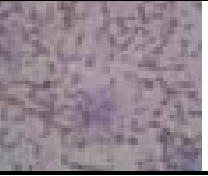

Tabla E1. Medio de cultivo selectivo (15 días)

Día 1	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
Descripción	No hay desarrollo de bacterias	No hay desarrollo de bacterias	No hay desarrollo de bacterias
Día 2	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos Gram (-) sin agrupación	Se observan bacilos Gram (-) unos en forma de cadena	Se observan bacilos muy pequeños Gram (+) y Gram (-)
Día 3	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos ligeramente curvos pero no helicoidales Gram (-)	Se observan bacilos alargados Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación
Día 4	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos muy pequeños Gram (+) y Gram (-)
Día 5	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos ligeramente curvos pero no helicoidales Gram (-)	Se observan bacilos Gram (-) no alargados	Se observan bacilos cortos Gram (+)

...continuación **Tabla E1**

Día 6	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos Gram (-) alargados	Se observan bacilos alargados Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos cortos Gram (+)
Día 7	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos alargados Gram (-) sin agrupación	Se observan bacilos alargados Gram (-)	Se observan bacilos cortos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación
Día 8	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos alargados Gram (-)	Se observan bacilos alargados Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos cortos Gram (+)
Día 9	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos alargados Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos cortos Gram (+)
Día 10	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos ligeramente curvos pero no helicoidales Gram (-)	Se observan bacilos ligeramente curvos, no helicoidales Gram (-)	Se observan bacilos cortos Gram (+)

...continuación **Tabla E1**

Día 11	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos alargados Gram (-) y Gram (+)	Se observan bacilos Gram (-) sin agrupación	Se observan bacilos cortos Gram (+)
Día 12	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos alargados Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos alargados Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos cortos Gram (+)
Día 13	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos Gram (-) y Gram (+) alargados	Se observan bacilos Gram (-) y Gram (+)	Se observan bacilos largos Gram (+) sin agrupación
Día 14	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos Gram (-) y Gram (+) sin agrupación	Se observan bacilos Gram (-) alargados	Se observan bacilos Gram (-) y G(+)
Día 15	BM 45°C	BM 55°C	BM 65°C
			
Descripción	Se observan bacilos Gram (-) y Gram (+) alargados	Se observan bacilos alargados Gram (-) sin agrupación	Se observan bacilos cortos Gram (+)

Bibliografía

- Atlas, R., Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Cuarta edición. Pearson Educación S.A, 696 p. Madrid, España.
- Balch, W., Fox, L., Magrum, C., Wose, R., Wolfe, R. 1979. Methanogens reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.*, 43:260-296.
- Bergey. 2001. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. D. R. Boone, R. W. Castenholz, eds. Volume 1. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, EEUU.
- Bergey. 2005. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Co. 8a ed. 4:20-105. Baltimore, EEUU.
- Bryant, M., Tzeng, S., Robinson, I. M., Joyner, A. E. 1971. Nutrient requirements of methanogenic bacteria. En *Advances in Chemistry Series*, 105, pp. 23-40. American Chemical Society. Washington, D.C. EEUU.
- Casanova, D. M. 2005. Evaluación del impacto del protocolo de azúcar CE-AP. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales. Universidad de Barcelona, España.
- Castro, A. 2004. Efecto de la temperatura en la actividad metanogénica y sulfato-reductora de consorcios microbianos en condiciones anaerobias. Tesis de Doctorado. UNAM, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas (Ingeniería Química). Facultad de Química. Pp. 81-85. México D.F. México.
- Castro-González, A., Bernal-González, M., Durán-de-Bazúa, C. 2005. Methanogenic and sulfatoreducing activity of microbial anaerobic communities adapted to different temperatures (35, 45, 55°C). Presentado en 5th International Symposium on Industrial Microbiology and Biotechnology. In Honor of Professor Army Demain. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Committee on Molecular Microbiology & Biotechnology, Chinese Society for Microbiology, Shanghai Society for Microbiology, School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, East China University of Science & Technology, Fujian Institute of Microbiology. Junio 27-29. Shanghai, China.
- Castro-González, A., Durán-de-Bazúa, C. 2001. Estabilización de un reactor anaerobio para el tratamiento de vinaza a condiciones mesofílicas. Presentado en la XLI Convención Nacional del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos. Puebla, Pue., México. P. 66. Pub. IMIQ. México D.F. México.
- Díaz, B., M., Espitia, S., Molina, F. 2002. Digestión "anaerobia", una aproximación a la tecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Fang, H. H. P., Chen, T., Li, Y.Y., Chui, H.K. 1996. Degradation of phenol in wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Res.*, 30(6):1353-1360.
- Filho, O. J., Gloria, N.A. 1987. Aplicação da vinhaça como fertilizante. *Boletín Técnico PLANALSUCAR (Brasil)*, 5 (1): 5-38.
- Flaherty, V., Lens, P., Leahy, B., Colleran, E. 1998. Long term competition between sulphate-reducing and methane-producing bacteria during anaerobic digestion of sulphate-containing wastewater from the industrial production of citric acid. *Wat. Res.*, 32:815-825.

- García, A., Duarte, F., Magaña, A. 1991. Crecimiento y finalización de cerdos con diferentes niveles de vinaza. *Livestock Research for Rural Development*, 3(1):41-46.
- García-Rodríguez, J. A., García-Sánchez, J.E. 1983. Bacteriología y tratamiento de la sepsis anaerobia en aspectos actuales en biología y medicina de la Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. Valladolid, España.
- Gorris, L.G.M., van Deursen, J.M.A., van der Drift, C., Vogels, G.D. 1988. Inhibition of propionate degradation by acetate in methanogenic fluidized bed reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29:95-102.
- Hulshoff Pol, L., Lens, P., Stams, A., Lettinga, G. 1998. Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters. *Biodegradation*, 9(3-4):213-224.
- Hurley, A. M., Roscoe, M. E. 1983. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *J. Appl. Bacteriol.*, 55:159-164.
- Jiménez-Ambríz, R. M., Martínez-Garza, M. A., Espinosa-Fuentes, A., Noyola-Robles, A., Durán de Bazúa, C. 1995. La caña de azúcar, su entorno ambiental. Parte II. Tratamiento de vinazas en una planta piloto en México en un reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente. INFORME TÉCNICO DE PROYECTO VIN-02-95. Pub. Prog. Ing. Quim. Amb. y de Quím. Amb. 83 pags. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Kenealy, W.R., Zeikus J.G. 1982. Characterization and function of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 14: 7-10.
- König, H., Semmier, R., Lerch, C., Winter, J. 1985. Evidence for the occurrence of autolytic enzymes in *Methanobacterium wolfei*. *Arch Microbiol.*, 141:177-180.
- Nimbalkar, D. 2005. Distillery effluent treatment. Vasantdada Sugar Institute. Pune, India.
- Observatorio Agrocadenas Colombia. 2006. Información Mundial Agrocadena. Azúcar, Producto: caña de azúcar. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. <http://agrocadenas.gov.co>
- Ojeda-Berra, L. 2008. Modelo matemático de un reactor anaerobio con bacterias sulfatorreductoras para el tratamiento del efluente del proceso de flotación de una planta minera. Tesis de Maestría en Ingeniería (Química, Procesos). UNAM, Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería. Facultad de Química. México D.F. México.
- Okabe, S., Ito, T., Satoh, H. 2003. Sulfate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63:322-334.
- Pavlostathis, S. G., Giraldo, E. 1991. Kinetics of anaerobic treatment. *Wat. Sci. Technol.*, 24:35-59.
- Ramírez, G. 2006. Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química, UNAM. 2a ed. 5:20-55. México, D.F., México.
- Ravot, G., Ollivier, B., Magot, M., Patel, B. K. C., Crolet, J. L., Fardeau, M. L., Gracia, J. L. (1995). Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order *Thermotogales*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:2053-2055.
- Rincón-Acelas, I. R. 2008. Cinética de la degradación anaerobia termofílica de vinazas de caña. Tesis de Maestría en Ingeniería (Ambiental, Agua). UNAM, Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería. Facultad de Química. México D.F. México.

- Rivas-Solórzano, H. 1996. Estudio y evaluación de algunas propiedades físicas y químicas de los suelos agrícolas aledaños al ingenio azucarero “El Potrero” en Córdoba, Veracruz, México. Tesis profesional (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. México.
- Rodríguez-Rivera, B. 1993. Tratamiento de vinazas empleando reactores anaerobios avanzados (UASB Y FA) con eliminación de H₂O. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México, D.F. México.
- Schauer, N. L., Ferry, J. G. 1980. Metabolism of formate in *Methanobacterium formicum*. J. Bacteriol., 142:800-807.
- Shin, H., Jung, J., Bae, B., Paik, B. 1995. Phase- separated anaerobic toxicity assays for sulphate and sulphide. Wat. Environ. Res., 67:802-806.
- Schoberth, M. 1983. Microbiology of the Phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol., 69:1875-1883.
- Soto, M., Méndez, R., Lerma, J. 1993. Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basic and experimental set up. Wat. Res., 27(8):1361-1376.
- Tchobanoglous, G., Thiesen, H., Vigil, S. 1994. Gestión integral de residuos sólidos. McGraw-Hill. Madrid, España.
- Villatoro-Reséndiz, R. 1998. Estudio de la transformación de la materia orgánica biodegradable de la vinaza cruda y tratada en los suelos acrisol y vertisol del municipio Miguel Alemán en el estado de Veracruz, México. Tesis profesional (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Zehnder, G., Kloepper, J., Yao, C., Wei, G. 1978. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles by plant growth-promoting rhizobacteria. J. Econ. Entomol. 90: 391-396.