



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

**“IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS METANOGÉNICAS Y SULFATO-
REDUCTORAS EN TRES REACTORES DE LECHO DE LODO DE
FLUJO ASCENDENTE (RALLFA) OPERANDO A 45, 55 Y 65°C”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SANDRA VERGARA SALGADO

DIRECTORA:

DRA. MARISELA BERNAL GONZÁLEZ

ASESOR EXTERNO:

DR. ISAÍAS H. SALGADO UGARTE



2010



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. ALEJANDRINA G. ÁVILA ORTIZ
VOCAL	DRA. MARISELA BERNAL GONZÁLEZ
SECRETARIO	DR. ISAIAS H. SALGADO UGARTE
SUPLENTE	BIÓL. RAUL ARCOS RAMOS
SUPLENTE	BIÓL. VERÓNICA MITSUI SAITO QUEZADA

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN

- (I) LABORATORIO 301, 302 Y 303 DEL CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
- (II) INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, LABORATORIO 301 UNIDAD DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

ASESOR DEL TEMA

DRA. MARISELA BERNAL GONZÁLEZ



ASESOR INTERNO

DR. ISAIAS H. SALGADO UGARTE



SUSTENTANTE

SANDRA VERGARA SALGADO

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**, por su apoyo decidido, generoso y desinteresado durante mis estudios de licenciatura-y desde luego en muchas otras ocasiones a través de sus múltiples instancias.

A la **FES ZARAGOZA** por ser tan generosa y darme todos los medios necesario para poder terminar con mis estudios de licenciatura

Esta investigación fue parcialmente financiada por el proyecto PAPIME clave PE101709 “Apoyo a la enseñanza experimental de las asignaturas terminales de la carrera que se imparte en la facultad de química de la UNAM” de la DGAPA de la UNAM.

A la **Dra. en ING. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa**, por el apoyo y conocimiento brindado en esta investigación

A la **Dra. Araceli Patron soberano y la Biól. Rosa María Picaso Hernández**, del instituto de fisiología celular, laboratorio 301 Unidad de Microscopia electrónica, por su participación, ayuda y elaboración del proceso de las muestras observadas a través del microscopio electrónico de barrido.

I.Q. Iván Puente Lee y M. C Karina Jiménez Duran, por su apoyo y colaboración en la observación de las muestras empleadas en esta investigación

A todo el comité tutorial

Dra. Alejandrina G. Ávila Ortiz
Dra. Marisela Bernal González
Dr. Isaias H. Salgado Ugarte
Biol. Raúl Arcos Ramos
Biol. Verónica Mitsui Saito Quezada

Por haber revisado mi tesis de licenciatura

Dra. Marisela Bernal González

Debo agradecerle de manera sincera los conocimientos que compartió conmigo, en especial su valioso tiempo que invirtió en mí, y sobre todo la paciencia y apoyo en la dirección de este trabajo.

Sin usted esta tesis no se habría podido realizar.

DEDICATORIAS

PARA MI HERMOSA Y EXTRAORDINARIA MADRE

Este trabajo te lo dedico a ti por ser la mejor madre, amiga y cómplice de todas mis grandes locuras, agradezco tu gran amor y esfuerzo que me has obsequiado, ya que lo he tenido todo, nunca me a faltado nada, he sido la persona más feliz y afortunada por tenerte a mi lado. T.A.

A Paola mi hermana

Te doy las gracias por consentirme, quererme y apoyarme siempre, te admiro ya que aunque halla conflictos tú los resuelves y haces que mi vida siga siendo perfecta. T.K

Mi familia

Gracias por el apoyo que me brindan, por ser tan unidos y sobre todo hacen que me sienta muy orgullosa de la hermosa familia que me rodea. En especial a mi tía que me ha enseñado a luchar por todo lo que quiero.



Karla

Eres una gran bendición en mi vida, gracias por estar y seguir en ella.

“Tania”

Estuviste conmigo y me has apoyado en todo, agradezco los grandes momentos y sobre todo las locuras que me has hecho pasar, tu amistad es demasiado valiosa.

Daniel.

Por su paciencia y por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría.

A todos mis amigos;

Carlos, Richi, Pablo, Ale G, Sergio G, Janet, Nadia, Miguel, Rodrigo, Alita, Juan y los mails que son muchos.....

“A y a mis súper amigos del museo”.

Gracias a todos, por convivir conmigo y hacer que esta etapa de mi vida fuera muy divertida y agradable.

Dr. Arcadio Monroy Ata

Gracias profesor por ser una persona tan importante para mi, lo respeto y admiro, ya que sus consejos y sobre todo su amistad, me han ayudado durante este proceso

Dr. Isaias H. Salgado Ugarte

Mil gracias por apoyarme y ayudarme en todo este proceso tan largo, le agradezco su paciencia y sobre todo sus consejos.

Debo de agradecer de manera especial a M.C Armando Cervantes, Dra. Berta Peña, Biól. José Luis Guzmán, Dr. Antonio Valencia, Biol. Verónica Mitsui Saito Quezada, por sus grandes consejos y sobre todo su apoyo.

Agradezco de manera sincera a la Carrera de biología, en especial al Biólogo Rubén Sulvaran por su gran apoyo y a tener calma ante todo.



Índice	Pág.
Resumen	1
CAPITULO 1	
PROBLEMA	
1.1. Introducción	2
1.2. Marco Teórico	3
1.2.1. Procesos de producción de azúcar a partir de la caña de azúcar	4
1.2.2. Procesos de producción de azúcar cruda	4
CAPITULO 2	
ANTECEDENTES	
2.1. Clasificación de los seres vivos	8
2.2. Dominio Eucarya	9
2.3. Dominio Bacteria	10
2.3.1. Bacterias sulfato-reductoras (BSR) (Campos 2001)	12
2.3.1.1 <i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	14
2.4. Dominio Archaea	15
2.4.1. Bacterias metanogénicas (BM) (Campos, 2001)	15
2.4.1.1. <i>Methanobacterium formicicum</i>	17
2.4.1.2. <i>Methanobacterium ivanov</i>	19
2.4.1.3. <i>Methanobacterium wolfeii</i>	20
2.5. Degradación anaerobia	21
2.5.1. Microbiología de la degradación anaerobia	21
2.5.1.1. Bacterias “fermentativas”o hidrolíticas	24
2.5.1.2. Bacterias acidogénicas	25
2.5.1.3. Bacterias acetogénicas	25
2.6. Cinética de proliferación (“crecimiento”)	25
2.7. Planteamiento del problema	27
2.8. Justificación del trabajo	27
2.9. Objetivos	27

CAPITULO 3	
METODOLOGÍA	
3.1. Vinazas	29
3.2. Reactores RALLFA	29
3.2.1 Funcionamiento de un reactor anaerobio	30
3.3. Experimentos	30
3.4. Medios de cultivo	30
3.4.1. Medio de cultivo general (Bryant <i>et al.</i> , 1971)	30
3.4.2. Medio específico para la actividad metanogénica y sulfato reductora (Soto <i>et al.</i> , 1993; Balch <i>et al.</i> , 1979; Flaherty <i>et al.</i> , 1998)	32
3.4.3. Medio de cultivo selectivo para cada una de las bacterias seleccionadas para esta investigación	34
3.4.3.1. <i>Methanobacterium formicicum</i>	34
3.4.3.2. <i>Methanobacterium ivanov</i>	34
3.4.3.3. <i>Methanobacterium wolfeii</i>	34
3.4.3.4. <i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	34
3.5. Cuantificación de microorganismos, número más probable (NMP)	34
3.5.1 Numero mas probable (NMP)	34
3.6. Recuento directo en placa	35
3.7. Cinética de proliferación para el medio de cultivo selectivo	35
3.8. Preparación de muestras para observar al microscopio	36
3.8.1. Microscopio electrónico de barrido	36
3.8.2. Microscopio confocal	37
3.8.3. Microscopio de campo claro	38
3.9. Diseño experimental	38
3.9.1. Primer experimento	38
3.9.2. Segundo experimento	39
3.9.3. Tercer experimento	39
3.9.4. Cuarto experimento	40
CAPITULO 4	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Primer experimento, medios de cultivo general a tres temperaturas	42
4.2. Segundo experimento, medio de cultivo específico para la actividad metanogénica y sulfato-reductora,	43
4.3. Tercer experimento, cuantificación de las BM y BSR por el método del NMP	44
4.4. Cuarto experimento, medios de cultivos selectivos para <i>Methanobacterium formicicum</i> (Belyaev <i>et al.</i> , 1983; Boone <i>et al.</i> , 1986; Bryant <i>et al.</i> , 1978; Bryant <i>et al.</i> , 1971; Bryant <i>et al.</i> , 1967); <i>Methanobacterium ivanov</i> (Jain <i>et al.</i> , 1987; Kneifel <i>et al.</i> , 1986; Konig, 1984; Patel <i>et al.</i> , 1990; Worakit <i>et al.</i> , 1986); <i>Methanobacterium wolfeii</i> (Winter y Zellner, 1987; Zellner <i>et al.</i> , 1989) y <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> (Campbell y Postgate, 1965).	46

4.4.1. <i>Methanobacterium formicicum</i>	46
4.4.2. <i>Methanobacterium ivanov</i>	48
4.4.3. <i>Methanobacterium wolfeii</i>	49
4.4.4. <i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	52
4.4.4.1. Recuento directo en placa para el medio de cultivo selectivo	54
a). <i>Methanobacterium formicicum</i>	56
b). <i>Methanobacterium ivanov</i>	56
c). <i>Methanobacterium wolfeii</i>	56
d). <i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	56
4.4.4.2. Cinética de proliferación en el medio de cultivo selectivo	57
a). <i>Methanobacterium formicicum</i>	57
b). <i>Methanobacterium ivanov</i>	57
c). <i>Methanobacterium wolfeii</i>	58
d). <i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	62
5.2. Recomendaciones	64
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	
Anexo A. Clasificación de las bacterias según Bergey's (2005)	75
Anexo B. Tablas de números más probables de bacterias	82
Anexo C. Características de los medios de cultivo a las tres temperaturas	83
Anexo D. Cuantificación de las bacterias en estudio usando NMP	96

Índice de tablas

Tabla	Nombre	Pág.
1	Reacciones llevadas a cabo por las bacterias metanogénicas, BM (Lens <i>et al.</i> , 2000)	13
2	Reacciones llevadas a cabo por las bacterias sulfato-reductoras, BSR (Lens <i>et al.</i> , 2000)	16
3	Taxonomía de las Archaeas metanogénicas (Southam <i>et al.</i> , 1992)	17
4	Características de las especies del género <i>Methanobacterium formicicum</i> (Belyaev <i>et al.</i> , 1983; Boone <i>et al.</i> , 1986; Bryant <i>et al.</i> , 1967; 1971; 1978), <i>Methanobacterium ivanov</i> (Jain <i>et al.</i> , 1987; Kneifel <i>et al.</i> , 1986; König, 1984; Patel <i>et al.</i> , 1990; Worakit <i>et al.</i> , 1986), <i>Methanobacterium wolfeii</i> (Winter <i>et al.</i> , 1987; Zellner <i>et al.</i> , 1989)	18
5	Factores que determinen la competencia entre las BSR y las BM en reactores anaerobios (Lens <i>et al.</i> , 2000)	22
6	Ventajas y desventajas de la metanogénesis en condiciones mesófilas y termófilas (modificado de Castro, 2004)	23
7	Características de las vinazas de la India y México (Nimbalkar, 2005)	29
8	Medios de cultivo	33
8.A	Medio general, incubación durante 5 días. (Bryant <i>et al.</i> , 1971)	33
8.B	Medio específico para la actividad metanogénica y para la sulfato reductora durante 30 días incubación (Balch <i>et al.</i> , 1979; Flaherty <i>et al.</i> , 1998; Soto <i>et al.</i> , 1993)	33
8.C	Medio selectivo (Balch <i>et al.</i> , 1979; Widdel, 1998)	33
9	Segundo experimento	39
10	Tercer experimento	40
11	Cuarto experimento	40
12	Características del medio de cultivo general a las tres temperaturas, durante 5 días	43
13	Características del medio de cultivo específico para las BM a las tres temperaturas en el día 30	44
14	Características del medio de cultivo específico para las BSR en el día 30	45
15	Resultados del NMP de BM y BSR a 45, 55, 65°C, durante 30 días	46
16	Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína para <i>Methanobacterium formicicum</i> a 45°C	47
17	Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína para <i>Methanobacterium formicicum</i> a 55°C	48
18	Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína para <i>Methanobacterium ivanov</i>	49
19	Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína para <i>Methanobacterium wolfeii</i> a 45°C	50

20	Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína para <i>Methanobacterium wolfeii</i> a 55°C	51
21	Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína para <i>Methanobacterium wolfeii</i> a 65°C	52
22	Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína para <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> a 55°C	53
23	Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína para <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> a 65°C	54
24	Placas en el medio de cultivo selectivo a las tres temperaturas, en el día 15	55
25	Desarrollo de las especies en el medio de cultivo selectivo	60
26	Cinética de proliferación (“crecimiento”)	60
27	Tiempo de generación en la fase exponencial	60
28	Gráficas en el medio de cultivo selectivo, durante 15 a 17 días	61

Índice de figuras

Figura	Nombre	Pág.
1	Productos obtenidos del procesamiento de la caña de azúcar (Espinel, 2005)	5
2	Generación de subproductos y principales derivados de la agroindustria de la caña de azúcar (modificado de Jiménez-Ambriz <i>et al.</i> , 1995)	6
3	Ubicación geográfica de la agroindustria cañera de México (Manual Azucarero Mexicano, 2008)	7
4	Árbol filogenético universal que muestra los tres dominios encontrados mediante comparación de secuencias de rRNA (Woese <i>et al.</i> , 1990)	8
5	Esquema de los 5 reinos clásicos de Whittaker y sus relaciones evolutivas: reino Metazoa (animalia), reino Metafitas (plantae), reino Fungi (hongo), reino Protista (protozoa) y reino Monera (procariota) (Whittaker y Margulis, 1978)	9
6	Árbol filogenético de los grupos mayores del dominio Bacteria. Las ramas en color negro corresponden a los 12 Phylum originales descritos por Woese (1987); las partes en color blanco corresponden a las 14 divisiones con los representantes de cultivos reconocidos, desde 1987; en el color gris están representados los 26 Phylum no cultivados representativamente. Este árbol fue construido a partir de 600 secuencias de 16S rRNA por el método de matrices de distancia utilizando el software de ARB (Rappe y Giovannoni, 2000)	11
7	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> (Campbell y Postgate, 1965)	14
8	<i>Methanobacterium formicicum</i> (Balch <i>et al.</i> , 1979)	18
9	<i>Methanobacterium ivanov</i> (Belyaev <i>et al.</i> , 1987)	19

10	<i>Methanobacterium wolfeii</i> (Winter <i>et al.</i> 1985)	20
11	Diagrama del equilibrio del proceso anaerobio (Castro-González <i>et al.</i> , 2004)	24
12	Fases de desarrollo (Arias, 2006)	26
13	Inoculación del RALLFA (Rincón-Acelas, 2008)	30
14	RALLFA enchaquetado con fibra de vidrio (Rincón-Acelas, 2008)	30
15	RALLFA con lámina de aluminio inoxidable (Rincón-Acelas, 2008)	30
16	Diagrama del diseño experimental	31
17	Cámara anaerobia de guante (Atlas y Bartha, 2002)	32
18	Dilución 10^{-1}	42
19	Dilución 10^{-2}	42
20	Dilución 10^{-3}	42
21	Cuantificaciones de las BM	45
22	Cuantificaciones de las BSR	45
23	<i>Methanobacterium formicicum</i> a 45°C	55
24	<i>Methanobacterium formicicum</i> a 55°C	55
25	<i>Methanobacterium formicicum</i> a 65°C	55
26	<i>Methanobacterium ivanov</i> a 45°C	55
28	<i>Methanobacterium ivanov</i> a 55°C	55
28	<i>Methanobacterium ivanov</i> a 65°C	55
29	<i>Methanobacterium wolfeii</i> a 45°C	55
30	<i>Methanobacterium wolfeii</i> a 55°C	55
31	<i>Methanobacterium wolfeii</i> a 65°C	55
32	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> a 45°C	55
33	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> a 55°C	55
34	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> a 65°C	55

Índice de gráficas

Gráfica	Nombre	Pág.
1	<i>Methanobacterium formicicum</i> a 45°C	61
2	<i>Methanobacterium formicicum</i> a 55°C	61
3	<i>Methanobacterium ivanov</i> a 45°C	61
4	<i>Methanobacterium wolfeii</i> a 45°C	61
5	<i>Methanobacterium wolfeii</i> a 55°C	61
6	<i>Methanobacterium wolfeii</i> a 65°C	61
7	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> a 55°C	61
8	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i> a 65°C	61

RESUMEN

Los consorcios microbianos que proliferan en reactores de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA) a tres diferentes temperaturas 45, 55, 65°C, empleando como medio de cultivo vinazas de ingenios azucareros-alcoholeros diluidas a un 50% con agua de la llave fueron caracterizados para determinar la presencia de grupos de bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras y corroborar si poseen características y cantidades diferentes de ellas en los tres sistemas. Para ello, se calculó el número más probable de Bacterias Metanogénicas (BM) y Bacterias sulfato-reductoras (BSR). Se encontró que, a la temperatura de 55°C, proliferan mayor cantidad de BM con 1500000 bacterias/mL, aproximadamente. Para las BSR, el RALLFA a 65°C tenía un mayor número de bacterias sulfato-reductoras, con 11000 bacterias/mL. A partir de estos dos grupos, se realizó una siembra con medios de cultivo selectivos a las tres diferentes temperaturas en estudio, 45, 55, 65°C, en los cuales proliferaron cuatro especies de bacterias *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium ivanov*, *Methanobacterium wolfeii* y *Desulfotomaculum nigrificans*. Debido a que la temperatura es un factor importante en su desarrollo, la especie *Methanobacterium formicicum* no presentó desarrollo a 65°C. A 55°C, fue mayor la proliferación bacteriana que a 45°C, con un desarrollo de 21100 y 7100 bacterias/mL, respectivamente. *M. wolfeii* fue la única especie que se desarrolló a las tres temperaturas. A 45°C, con 8500 bacterias/mL; a 55°C, con 20800 bacterias/mL, presenta la mayor cantidad y, por último, a 65°C, con 19100 bacterias/mL. La especie *M. ivanov* sólo se desarrolló a 45°C, con la mayor cantidad de bacterias/mL (37800) y la especie *D. nigrificans*, que pertenece al grupo de las sulfato-reductoras, a 55°C tuvo 19100 bacterias/mL y a 65°C tuvo 15900 bacterias/mL. Estos resultados indican que las bacterias pertenecientes al grupo de las metanogénicas obtienen una mayor proliferación a temperaturas menores de 65°C y, para las bacterias que pertenecen al grupo de las sulfato-reductoras, se obtiene una mayor proliferación a partir de 65°C. Con estos datos puede decirse que los reactores a 45 y 55°C, producen una mayor cantidad de metano, ya que las bacterias proliferan mejor a dichas temperaturas.

CAPITULO 1

PROBLEMA

1.1 Introducción

Los procesos anaerobios han ganado popularidad en el tratamiento de aguas residuales industriales durante las últimas décadas. Cerca de 1000 reactores a escala industrial se han reportado en el año 2000 (Lens *et al.*, 2000). Asimismo, el interés en el tratamiento de las aguas residuales de la industria de las bebidas alcohólicas y de la producción de bioetanol como fuente de energía, empleando sistemas que generen metano como fuente secundaria de energía se ha incrementado en los últimos 20 años (Durán *et al.*, 1988; 1994a, b; Durán-de-Bazúa *et al.*, 1994a, b).

Las aguas residuales que contienen materia orgánica y sulfatos son generados por muchos procesos industriales que emplean ácido sulfúrico (por ejemplo, industrias procesadoras de mariscos). La presencia de sulfatos ha causado problemas en el tratamiento anaerobio metanogénico de estas aguas residuales industriales y de otras, incluyendo las corrientes de las aguas residuales de la industria alcohólica. Para la obtención de alcohol etílico en un ingeniero azucarero, las melazas incristalizables se fermentan con *Saccharomyces cerevisiae*, a un pH ácido alcanzando por la adición de ácido sulfúrico para evitar competencia de otras especies por los azúcares. El mosto fermentado es después destilado para obtener alcohol y otros productos. De este proceso de destilación, se obtiene un subproducto denominado vinazas, aguas residuales que son descargadas directamente a suelos o cuerpos acuíferos con un promedio de 6,000 a 20,000 mg L⁻¹ de iones sulfatos y materia orgánica medida como demanda química de oxígeno total (DQO_T) de 40,000 a 150,000 mg L⁻¹ (Durán-de-Bazúa, 1994; Durán *et al.*, 1988; 1994a, b; Klomp *et al.*, 1995).

En México, por cada litro de alcohol etílico producido se generan 12 litros de vinazas. Así, se estima que de la producción de 70,000 m³ año⁻¹ de etanol se generan 840,000 m³ año⁻¹ de vinazas (Jiménez-Ambríz *et al.*, 1995). La composición química de las vinazas provoca serios problemas ambientales manifestados principales por su descarga a cuerpos receptores como suelos o cuerpos de agua, como los ríos. Las vinazas incrementan la temperatura del cuerpo receptor (agua o suelo) y disminuyen la cantidad de oxígeno disuelto disponible. También su acidez disminuye el pH, lo cual puede disolver algunos metales y volverlos biodisponibles (Bautista-Zúñiga *et al.*, 2000a, b).

La turbidez de los sólidos suspendidos restringe la penetración de la luz. Los sólidos suspendidos presentes en las vinazas disminuyen la permeabilidad del suelo o el lecho del río, obstruyendo su infiltración y provocando un proceso de degradación anaerobia dando como resultado olores desagradables (por la generación de metano y ácido sulfhídrico). En resumen, los efectos ambientales de las vinazas pueden cesar la capacidad de purificación natural de los cuerpos receptores acuíferos o alterar la composición de los suelos (Bautista-Zúñiga *et al.*, 2000a, b; García *et al.*, 1997)

Las vinazas pueden ser tratadas mediante reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA). En ellos, la materia orgánica que constituye los compuestos disueltos en las vinazas es degradada por la acción de consorcios microbianos, que pueden sustentar sus necesidades metabólicas a través del rompimiento enzimático de las moléculas orgánicas. Globalmente, se estudian como cuatro reacciones globales de degradación, las cuales son hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. En ellas se lleva a cabo la formación de biogás (metano en su mayoría), que es el principal subproducto del proceso biológico anaerobio (Castro-González y Durán-de-Bazúa, 2002; Hulshoff Pol *et al.*, 1998). Este tratamiento biológico, mediante estos reactores, conocidos como RALLFA o *UASB reactors* en inglés, trabajan a nivel comercial a temperaturas mesofílicas, de 25 a 35°C, con eficiencias de conversión de los compuestos carbonosos a biogás de alrededor de 63% (Fang *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 1993). Recientemente se ha mostrado que los RALLFA pueden trabajar en condiciones termofílicas, aunque no hay estudios sobre temperaturas mayores a 65°C y tampoco sobre la identificación de los consorcios microbianos a dichas temperaturas (Bello-Cabrera *et al.*, 2008; Minami *et al.*, 1991; Rincón-Acelas *et al.*, 2008; Rintala *et al.*, 1991).

Debido a que las vinazas son descargadas a una temperatura cercana a los 80-90°C, fue necesario realizar un estudio sobre los consorcios microbianos que se desarrollan a temperaturas termofílicas, por lo cual el objetivo de esta investigación es identificar las bacterias del grupo de las sulfato-reductoras y metanogénicas que se encuentran en los reactores tipo RALLFA a tres diferentes temperaturas, 45, 55 y 65°C.

1.2 Marco Teórico

A través del tiempo, la agricultura ha sido una actividad de gran importancia estratégica para la autosuficiencia y riqueza de una nación. La agricultura industrial es aquella que por las magnitudes de producción provee de cantidades suficientes para obtener beneficios por encima de las cantidades mínimas necesarias para la subsistencia de una región o grupo de personas. Tal es el caso de la caña de azúcar que poco a poco ha llegado a convertirse en bastión fundamental para países con economías emergentes. (CEPAL, 1998).

La caña de azúcar es originaria de la India, especialmente del territorio conocido con el nombre de Bengala, situado entre la parte sur de los montes del Himalaya y al norte del golfo de Bengala en la desembocadura del Ganges. (CEPAL, 1998).

La actividad azucarera participa de manera importante en el Producto Agrícola Bruto (PAB) de cada país de América Latina y el Caribe. En Costa Rica por ejemplo, la caña de azúcar aporta el 4.3 por ciento del PIB (Producto Interno Bruto) agropecuario. En El Salvador alrededor del 3 por ciento, en Guatemala más del 8.5 por ciento, en Nicaragua alrededor del 8 por ciento, en tanto que en Cuba, República Dominicana y Brasil la cifra se ubica en alrededor del 10 por ciento. En México, la caña de azúcar aporta el 7.3 por ciento del PAB (CEPAL, 1998).

En América Latina y el Caribe constituyen la principal región azucarera del mundo, con más del 30 por ciento de la producción de azúcar y el 45 por ciento de las exportaciones mundiales de ese producto. En la región se destinan 7.4 millones de hectáreas a la producción de caña de azúcar y se cuenta con una capacidad instalada de aproximadamente 2 millones de toneladas métricas de caña por día.

La agroindustria azucarera regional genera más de dos y medio millones de empleos y las exportaciones por más de 13 millones de toneladas al año, que generan ingresos superiores a los 3 mil millones de dólares (CEPAL, 1998).

Más de cien países, producen azúcar a nivel mundial, 74% de la cual es hecha a partir de caña de azúcar, principalmente en zonas tropicales, con un creciente aumento de la producción a partir de remolacha (CEPAL, 1998).

A la par de la producción de azúcar se generan otros productos como las melazas que contienen una gran cantidad de azúcares invertidos (glucosa y fructosa) y que son utilizados para la producción de etanol y CO₂ en un proceso que genera grandes cantidades de aguas residuales, conocidas como vinazas, como ya se mencionó párrafos arriba (Manuelita, 2008).

Plinio Nastari, director de la consultora internacional Datagro de Brasil señala que, en la actualidad, el 46% del etanol que se elabora en el mundo se obtiene del azúcar y el 54% restante de granos, como el maíz. La cifra estimada de la producción mundial de etanol para el presente año ronda los 49700 millones de litros y, de acuerdo con datos de las consultoras internacionales Datagro y Fo-Licht (Datagro, 2006), los principales productores son Estados Unidos con el 35.6%; Brasil con el 36.3%; China el 8.5% e India que ronda los 3.8%, siendo Brasil el mayor productor y explotador mundial de etanol elaborado a base de caña de azúcar.

A continuación se presenta una descripción de los procesos productivos del azúcar y del etanol, la cual conducirá a encontrar el entorno en el que se presenta la generación de las vinazas como aguas residuales, entendiendo su impacto ambiental y la necesidad de buscar usos para ella que permitan obtener productos reutilizables en cualquier ámbito (Jiménez-Ambríz *et al.*, 1995).

1.2.1 Procesos de producción de azúcar a partir de la caña de azúcar

La caña de azúcar es una Gramínea perenne con fácil adaptación a climas tropicales y temperaturas superiores a 20°C, dependiendo de la variedad. La planta puede llegar a medir entre 3 y 5 m de altura y de cada siembra inicial se puede llegar a obtener 6 cosechas. El procesamiento de la caña de azúcar en los ingenieros permite obtener diversos productos, bagazo, cachaza, jarabe, miel fina, azúcar crudo, blanco y refinado como se muestra en la Figura 1 (Rincón-Acelas *et al.*, 2008).

1.2.2 Procesos de producción de azúcar cruda

a) Preparación de suelos, cosechas y recolección

En esta primera parte, llevada a cabo fuera de los ingenieros, el primer factor a tener en cuenta es la preparación del suelo en el cual se realiza la siembra, tratando de utilizar suelos franco arcillosos de buen drenaje. El control integrado de las plagas y un óptimo tiempo de maduración llevado a cabo con el control de grados Brix del jugo al interior de los tallos de la caña, conducen a resultados favorables en cuanto a rendimiento y productividad se refiere. Una vez cortada la caña es transportada a los ingenieros para su procesamiento, dicho procesamiento se muestra en la Figura 2 (Incauca, 2006).

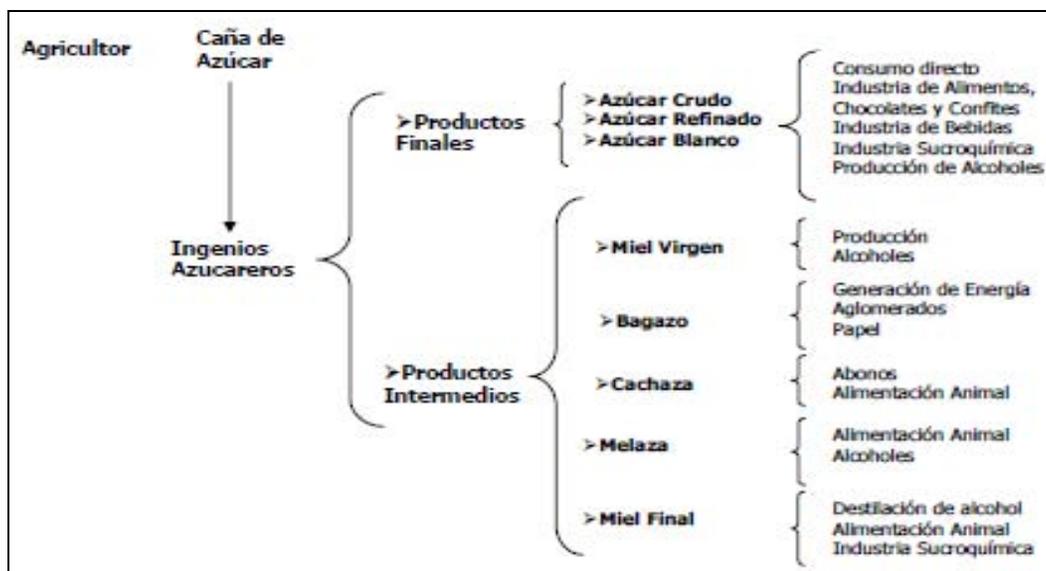


Figura 1. Productos obtenidos del procesamiento de la caña de azúcar (Espinel, 2005)

b) Proceso productivo del azúcar

Después del corte, la caña es llevada al ingenio, donde se limpia y pasa a las picadoras. A continuación, pasa por los molinos, en donde se extrae el jugo de caña.

Este jugo también es denominado *miel virgen* o *guarapo*, el cual, además de emplearse en la elaboración de azúcar, se puede usar para producir alcoholes (potables y no potables).

El jugo de caña obtenido en la molienda pasa al proceso de clarificación, en donde se le adiciona cal para reducir la acidez y evitar la inversión de la sacarosa. El jugo “alcalizado” resultante se calienta y se le adiciona un agente floculante para que en el clarificador se sedimenten y decanten los sólidos. Estos últimos pasan a los filtros rotatorios, los cuales separan el jugo de la torta de sólidos, conocida como *cachaza*, la cual es empleada como abono en las plantaciones o como alimento para animales. (Incauca, 2006).

Los jugos clarificados pasan a los evaporadores, en los cuales se extrae el 75% del contenido de agua del jugo, para obtener el jarabe o meladura. El paso siguiente consiste en la cristalización de la sacarosa del jarabe, lo cual se realiza en tachos al vacío.

Este proceso general, de acuerdo con variantes en sus operaciones unitarias, produce, azúcar crudo o mascabado o para refinación, azúcar blanco o azúcar estándar, entre otros.

El azúcar crudo se utiliza para la elaboración de azúcar refinada o se vende para mercados especiales. El azúcar blanco y el estándar se dirigen al consumo directo o como insumo en la producción de alimentos y bebidas para consumo humano y en otras industrias.

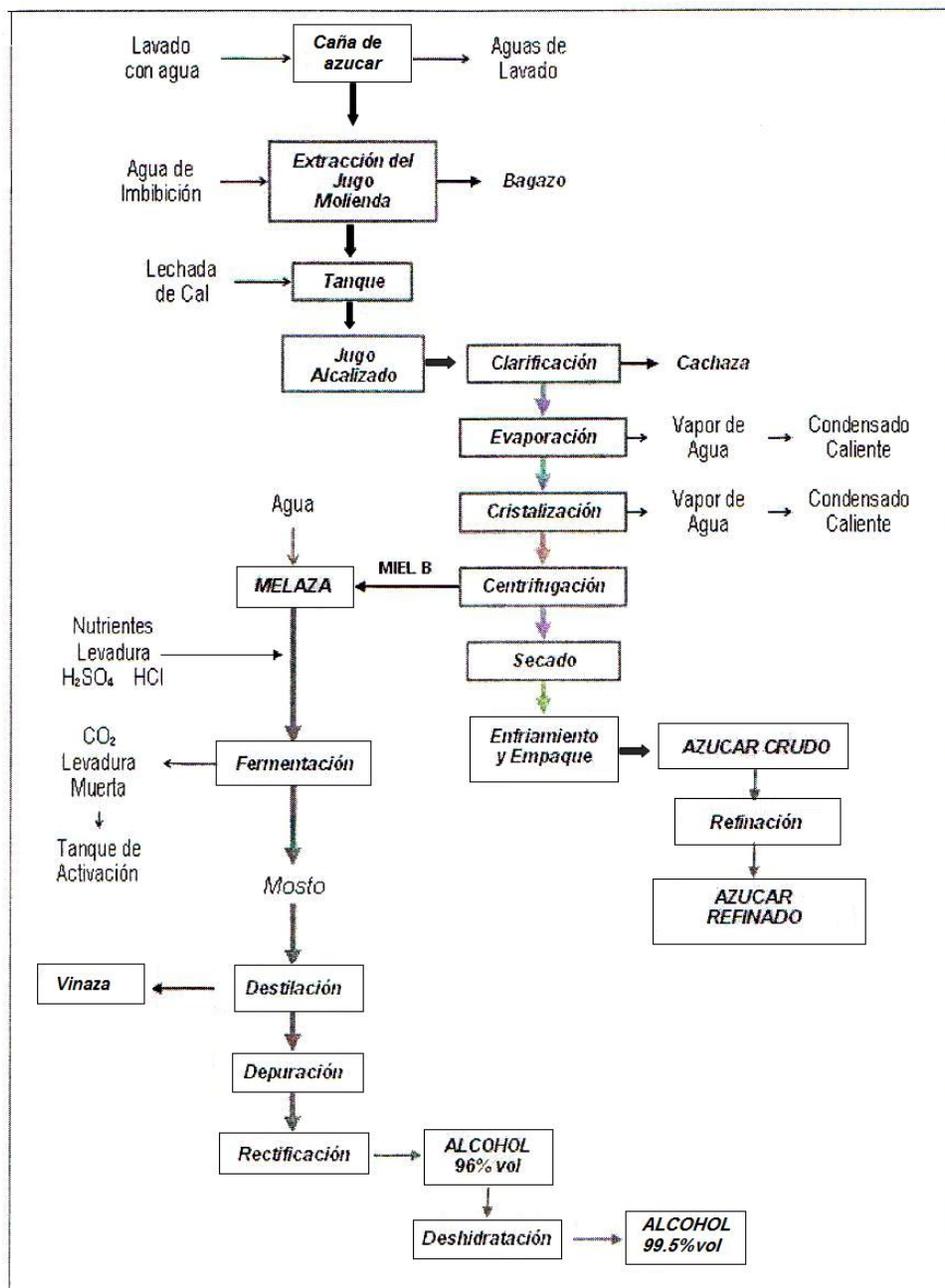


Figura 2. Generación de subproductos y principales derivados de la agroindustria de la caña de azúcar (Jiménez-Ambriz *et al.*, 1995)

A continuación, los cristales de azúcar pasan a las centrifugas donde se separan la miel incristalizable de los cristales de azúcar. Esta operación unitaria tiene varias etapas a las que genéricamente se les denomina A, B y C. A los evaporadores donde se procesan estas mieles se les conoce como *tachos*.

La miel obtenida de la primera etapa, miel A, pasa por un segundo tacho para repetir el proceso de cristalización y forma la masa B, la cual se vuelve a separar en las centrifugas. La miel obtenida en esta segunda separación, denominada miel B, pasa a un tercer tacho y se forma la masa C, la cual se vuelve a pasar por las centrifugas, obteniendo los cristales C y la miel final o melaza o miel incristalizable. Esta última se emplea como fuente de carbono para las levaduras que producen alcohol etílico o en alimentación animal o como insumo de la industria sucroquímica y biotecnológica.

Los cristales de azúcar cruda obtenidos de la centrifugación, se disuelven en agua caliente y se envían a la refinería, en donde se remueven las impurezas y colorantes que tiene el licor, obteniendo el azúcar refinada. Esta última es empacada y vendida en el mercado nacional e internacional. Como se puede ver, la caña y los productos derivados del proceso productivo del azúcar se emplean como insumos de diversas industrias, entre ellas las de bebidas y alimentos para humanos, alimentos para animales, abonos, sector energético, sucroquímica, papel, aglomerados, producción de alcoholes, entre otros (Jiménez-Ambriz *et al.*, 1995).

En la actualidad, en México se cuenta con 58 ingenios azucareros con presencia en 15 estados del territorio nacional, como son: Campeche, Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz, siendo este último el de mayor importancia con 22 ingenios. Dichos estados se observan en la Figura 3. Durante la Zafra 2005/2006 el total de caña molida en el país fue de 47.3 millones de toneladas, lo cual generó una producción de azúcar total de 5.3 millones de toneladas y 1.8 toneladas métricas de melaza cuyo destino principal es la producción de alcohol en distintas ciudades (Unión Nacional de Cañeros, 2006).

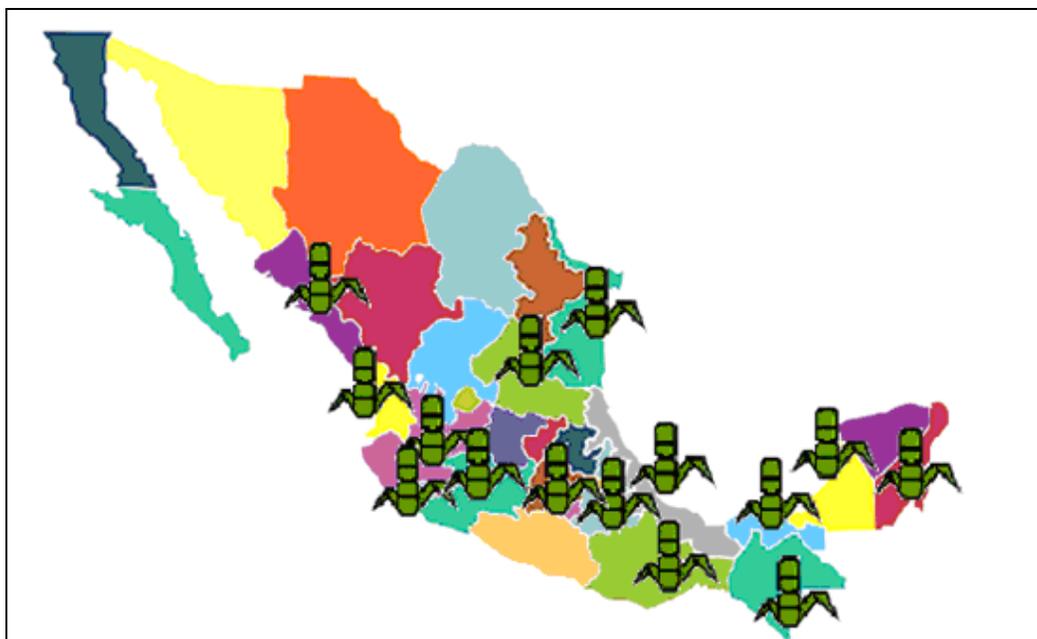


Figura 3. Ubicación geográfica de la agroindustria cañera de México (Manual Azucarero Mexicano, 2008)

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Clasificación de los seres vivos

Para clasificar a los seres vivos taxonómicamente existen varias teorías, una de ellas es la clasificación clásica que considera dos grupos: animales y vegetales. Haeckel en (1866), acabó con esta dicotomía al reconocer que los protistas, tienen formas celulares sencillas y no tenían lugar dentro de estas dos agrupaciones. En 1938, Chatton dividió los seres vivos en dos categorías primarias: procariotas (organismos carentes de núcleo celular) y eucariotas (organismos con núcleo celular) (Chatton, 1938). Ese mismo año, 1938, Copeland, propuso la creación de un nuevo reino para acomodar a las bacterias y, más tarde, Whittaker creó un quinto reino para los hongos (Whittaker y Margulis, 1978). De esta manera, hasta principios de 1990, todo ser vivo tenía su lugar dentro del esquema de los cinco reinos propuestos por Whittaker, siendo estos: 1. Monera, 2. Protista, 3. Animalia, 4. Plantae y 5. Fungi.

A mediados del siglo veinte, la clasificación de las bacterias seguía siendo un problema sin solución para los microbiólogos, llegando a considerarse que las bacterias no podrían ser filogenéticamente ordenadas (Stanier y Van Niel, 1962; Stanier, 1970). Esta idea se veía además reforzada por la incapacidad y dificultad de obtener cultivos selectivos puros de muchos microorganismos. Carl Woese de la Universidad de Illinois, propuso una nueva técnica para analizar la biodiversidad microbiana mediante el estudio de los ácidos nucleicos, especialmente el ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S, que es un marcador molecular que se utilizó y que se sigue empleado en los estudios de filogenia y taxonomía bacteriana (Olsen y Woese, 1993). Los estudios de Woese originaron la división de las procariotas en dos grupos o reinos: *Archaea* y *Bacteria*. Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. Este último engloba a todos los seres eucarióticos como animales, plantas, etc. (Woese, 1987). Dicha filogenia se observa en la Figura 4.

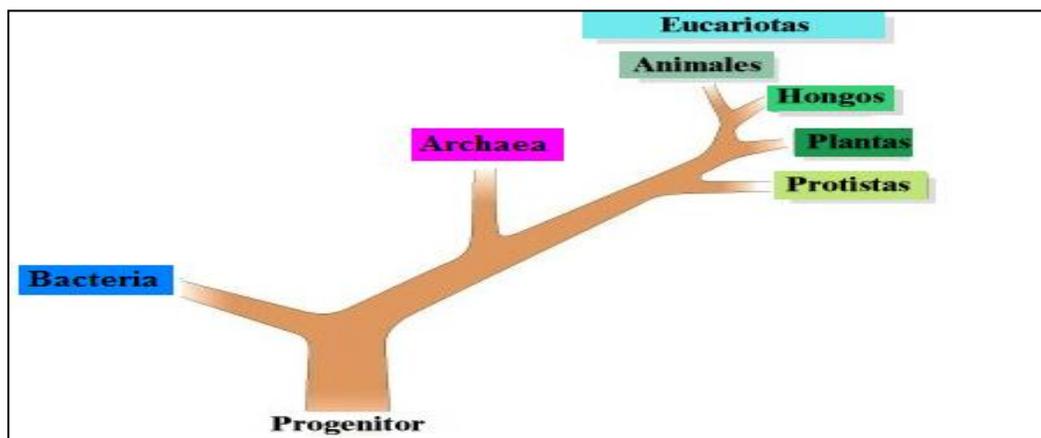


Figura 4. Filogenia molecular que muestra los tres dominios encontrados mediante comparación de secuencias de ARNr (Woese *et al.*, 1977)

Desde entonces, el análisis del ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana.

A partir de que Woese cambiara la clasificación taxonómica, surgió una forma nueva para clasificar a los seres vivos. Para realizar este proceso, se debe tener en cuenta que la organización que establece la taxonomía tiene una estructura arbórea en la que las ramas se dividen en otras y éstas, a su vez, están subdivididas en ramificaciones menores. A todas estas divisiones se les denomina "Taxón".

La taxonomía tiene como objetivo agrupar a los seres vivos que presentan semejanzas entre sí o diferencias con otros. Actualmente, se componen por ocho categorías jerárquicas, que se posicionan de mayor a menor y éstas son: Dominio, Reino, Phyla o Phylum, Clase, Orden, familia, género y especie (Pace, 1997)

2.2 Dominio Eucarya

Los eucariontes o eucariotas pertenecen al dominio Eucarya, en este dominio se incluyen los 4 reinos que se presentan en la Figura 5 y son:

- 1) Hongos (moho, levadura, champiñones, etc.)
- 2) Protistas (algas verde azules, diatomeas, algas pardas, etc.)
- 3) Plantas
- 4) Animales

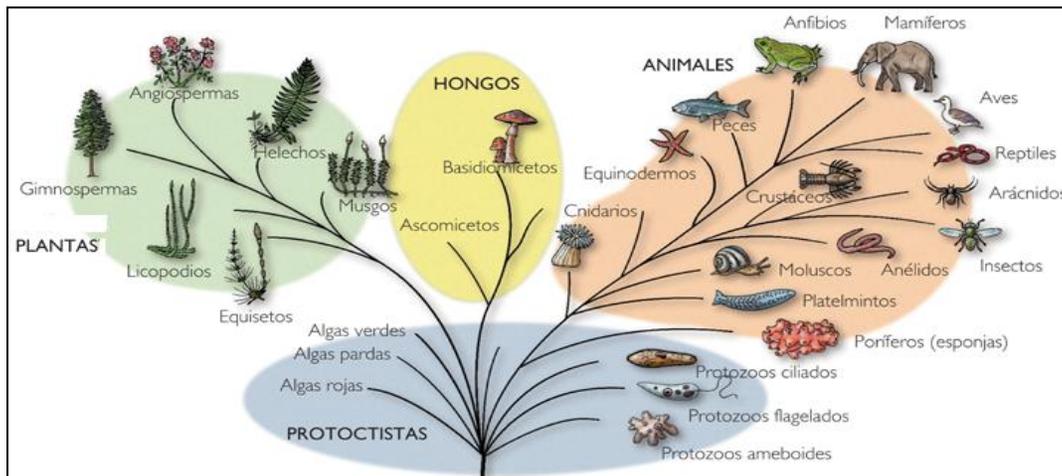


Figura 5. Esquema de los 4 reinos y sus relaciones evolutivas: Reino Animalia (animales) Reino Plantae (plantas), Reino Fungi (hongo), Reino Protoctistas (protista) (Pace 1997)

Este grupo de organismos posee un aparato mitótico, que son estructuras celulares que participan de un tipo de división nuclear denominada mitosis, la célula eucariota es típicamente mayor y estructuralmente más compleja que la célula procariota. Es decir, las células de estos reinos tienen el ácido desoxirribonucleico (ADN) confirmado por una doble membrana biológica llamada envoltura nuclear.

Además, las células eucarionte tienen en general varios compartimientos en donde se realizan diversas funciones. Ejemplos de estos compartimientos son los organelos como el núcleo, la mitocondria, el cloroplasto, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, los lisosomas y los peroxisomas. También presentan otros componentes muy organizados como el citoesqueleto. Además, las células eucariontes, en general, se divide por medio de mitosis, un proceso diferente al de la bipartición de procariontes, aunque las células eucariontes no tienen plásmido como las bacterias, sí presentan ADN fuera del núcleo en las mitocondrias y en los cloroplastos. Este ADN, sin embargo, presenta características similares a las del ADN de los procariontes. (Jiménez, 2006).

2.3 Dominio Bacteria

Las bacterias son procariontes o procariotas, debido a que son unicelulares y no poseen núcleo celular diferenciado, es decir, su ADN y ARN no están confinados en el interior de un núcleo, sino libremente en el citoplasma. Carecen, además, de membrana nuclear, mitocondria, aparato respiratorio organizado y cloroplastos, por lo que no se reproducen por mitosis sino por división binaria transversal (escisiparidad). Cada bacteria está rodeada por una pared rígida que delimita su forma. El tamaño de las bacterias es variable y su límite inferior es de 0.2 μm y el superior está en los 50 μm . Estos microorganismos son seres vivos que nacen, crecen, se reproducen y mueren y, además, están presentes en aire, polvo, tierra, suelo, agua, piel, plumas, pelo, boca, nariz, garganta, tracto intestinal, etc. (Aron y Grasse, 1969).

Aunque las más conocidas son las bacterias patógenas, éstas son sólo una pequeña parte del universo bacteriano. En general, son las responsables de la fermentación y la putrefacción. Con estos procesos, transforman la materia orgánica en gases y sustancias inertes, por lo que su papel es importante en la naturaleza. En el Dominio Bacteria existen varias de ellas con intensa actividad enzimática. Por este motivo, algunas son aprovechadas por la industria de las biorreacciones¹ y, además, se localizan en los estómagos de algunos mamíferos para ayudar, durante el proceso de digestión de sus alimentos (Aron y Grasse, 1969).

En el 2001 surgió una nueva clasificación del Dominio Bacteria, como se muestra en la Figura 6, en la cual se encuentran sólo los Phyla mayores y en la Tabla A1 del Anexo A, se encuentra la clasificación completa de las bacterias (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2005), aunque hay que tener en cuenta que sólo se presentan las bacterias que se han podido aislar para realizar su clasificación taxonómica.

Cada bacteria tiene una forma y dimensión característica que sirven para su clasificación e identificación. Las formas predominantes son: esféricas (cocos), alargadas (bacilos) y en forma de coma (vibrios). Principalmente estas estructuras aparecen aisladas, agrupadas o en cadenas. En el caso de los cocos se observan características en forma de cadenas llamadas estreptococos.

¹ Fermentación fue el nombre que Louis Pasteur dio a la biorreacción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con la glucosa en condiciones anaerobias produciendo alcohol etílico y dióxido de carbono. Todas las demás reacciones bioquímicas NO son fermentaciones, aunque muchos biólogos y microbiólogos usen este término de manera errónea, incluso en libros de texto y artículos científico-tecnológicos

También pueden estar agrupadas en racimos bajo el nombre de estafilococos, mientras que los bacilos tienen formas alargadas, rectas o ligeramente encorvadas, con extremos redondeados o rectos, pueden aparecer aisladas o en cadena. Por último, los vibrios muestran forma de virgula o coma. (Aron y Grasse, 1969)

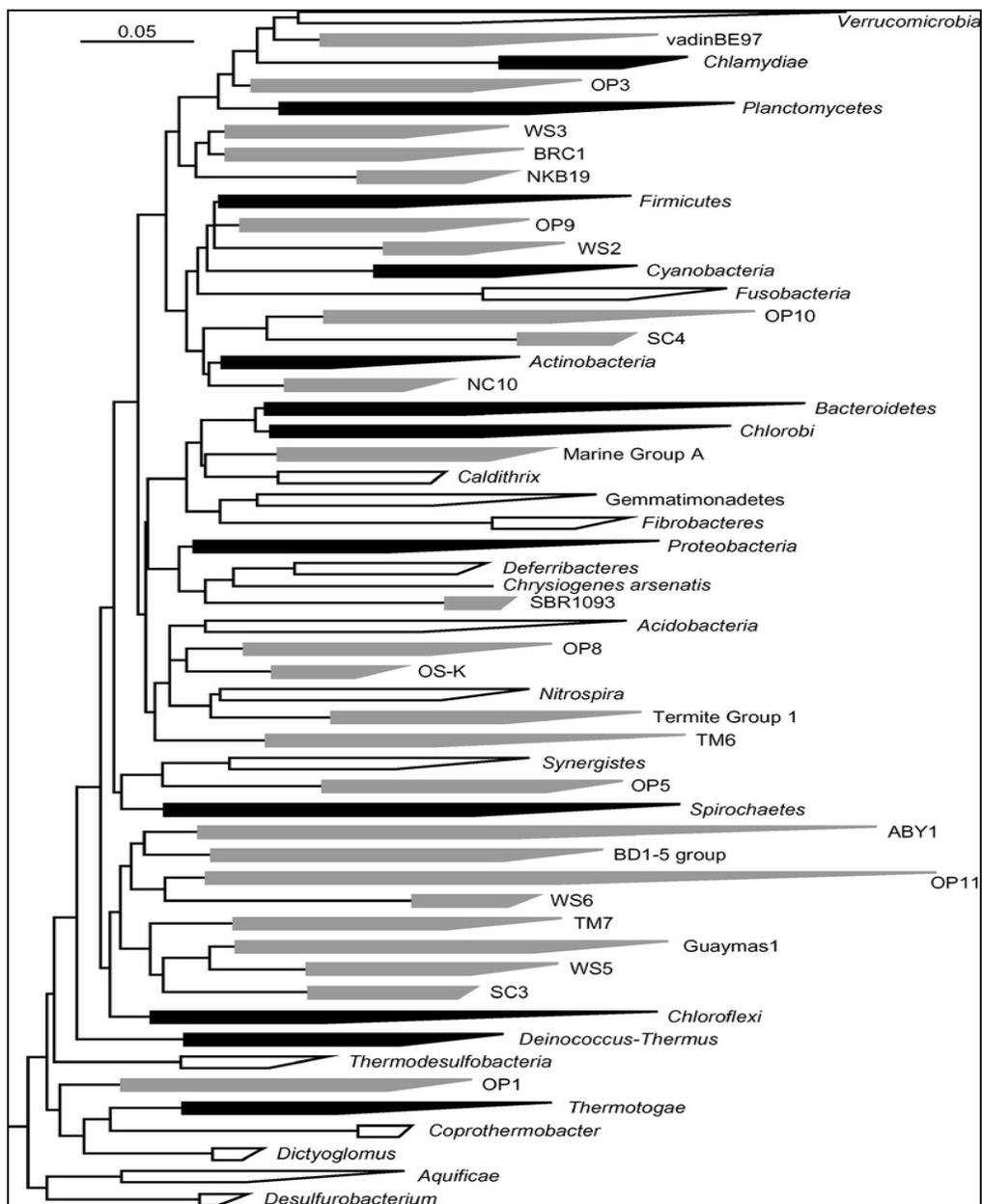


Figura 6. Árbol filogenético moléculas de los grupos mayores del Dominio Bacteria. Las ramas en color negro corresponden a los 12 Phylum originales descritas por Woese (1987). Las partes en color blanco corresponden a las 14 divisiones con los representantes de cultivos reconocidos, desde 1987. En el color gris están representados los 26 Phylum no cultivados representativamente. Este árbol fue construido a partir de 600 secuencias de 16S rRNA por el método de matrices de distancia utilizando el software de ARB (Rappé y Giovannoni, 2000)

Por tanto, la clasificación de las Bacterias es algo compleja, debido a su carácter polimorfo y a la relativa falta de estudios sobre ellas.

Se clasifican por su morfología, por la capacidad de formar o no esporas (esporógenas y no esporógenas), por la estructura de su pared celular, identificada mediante una tinción específica (Gram positivas o Gram negativas), por su metabolismo (aerobia, anaerobia, anóxica o facultativa, etc.) y según las reacciones que lleva a cabo para obtener su energía como son las sulfobacterias a través de la oxidación del ácido sulfhídrico (SH_2), las ferrobacterias de la oxidación de carbonatos y sulfatos de hierro, y las bacterias sulfato reductoras (BSR) la obtienen de la oxidación de sustratos orgánicos, estas bacterias son las que nos interesan para esta investigación y se explica con más detalle en el siguientes puntos. (Aron y Grasse, 1969)

2.3.1 Bacterias sulfato reductoras (BSR) (Campos, 2001)

Las bacterias sulfato reductoras son anaerobias estrictas, Gram negativas. Obtienen energía para su proliferación a través de la oxidación de sustratos orgánicos empleando a los sulfatos como aceptores externos de electrones y, como resultado de esto, los sulfatos se reducen a H_2S . Asimismo, emplean iones sulfatos para oxidar los productos de la hidrólisis o acetogénesis. Como sustratos usan compuestos de baja masa molecular² como lactato, hidrógeno, ácidos grasos lineales de cadena corta, ácidos grasos de cadena larga, ramificados, metanol, etanol, butanol, ácidos dicarboxílicos, compuestos aromáticos, ácidos orgánicos cíclicos saturados, colina, aminoácidos, azúcares y glicerol. Muchas BSR degradan a los ácidos propiónico y butírico, algunas oxidan estos ácidos grasos completamente a CO_2 y otras los transforman simplemente a ácido acético. (Campos, 2001)

Otros compuestos que pueden ser completamente degradados por las BSR son los compuestos de cadenas divididas y ácidos grasos de cadena larga, alcoholes, ácidos orgánicos (ácido láctico, succínico, málico) y compuestos aromáticos como ácido benzoico, catecol, fenoles y anilina. Aún compuestos sin un grupo funcional, tales como el tolueno, pueden degradarse por las BSR. Los metales pesados presentes se precipitan como sulfuros y, por lo tanto, se reduce su efecto tóxico para las BSR. Dichas bacterias pueden metabolizar inhibidores orgánicos como compuestos aromáticos (tolueno y etilbenceno), alcanos, compuestos clorados (cloroformo), etc. (Widdel, 1998). Las reacciones llevadas a cabo por las BRS se presentan en la Tabla 1.

El pH óptimo de las BRS está en el intervalo de 7.3 a 7.6 y son inhibidas a valores de pH de 6 y 9, además por la cantidad de sulfuros totales (H_2S , HS^- etc.) y por la presencia de H_2S no disociado (Hilton y Oleszkiewicz, 1998). Éstas también llegan a generar competencia con las bacterias metanogénicas (BM) a un pH de 7.7 (Visser, 1995).

² La masa molecular es el término actualmente empleado en vez de peso molecular ya que masa y peso NO son sinónimos. El **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

Actualmente se cree que la principal distinción taxonómica de las sulfato-reductoras, debe situarse entre aquellas que pueden oxidar acetato y las que lo acumulan como resultado de la oxidación parcial de otros sustratos orgánicos. (Campos, 2001)

Tabla 1. Reacciones llevadas a cabo por las BSR (Lens *et al.*, 2000)

Reacción	ΔG (kJ mol ⁻¹)
Ácido láctico a ácido acético y sulfuro	
$2\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}^+$	-160.8
$2\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^- + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 6\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + \text{H}^+$	-255.3
Ácido acético	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^-$	-47.6
Ácido propiónico	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 3\text{H}_2$	76
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 0.75\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{HCO}_3^- + 0.75\text{HS}^- + 0.25\text{H}^+$	-37.7
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 1.75\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 3\text{HCO}_3^- + 1.75\text{HS}^- + 0.5\text{H}^+ + 0.25\text{OH}^-$	-88.9
Ácido butírico y otros	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{2n}\text{COO}^- + n/2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow (n+1)\text{CH}_3\text{COO}^- + n/2\text{HS}^- + n/2\text{H}^+$	ND
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{2n+1}\text{COO}^- + n/2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow n\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{CO}_2\text{COO}^- + n/2\text{HS}^- + n/2\text{H}^+$	ND
Metanol	
$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-314.6
$4\text{CH}_3\text{OH} + 3\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 4\text{HCO}_3^- + 3\text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$	-364.4

ND= no determinados

Las fuentes de carbono sobre las que se desarrollan las BSR pueden ser el CO₂, cierto número de compuestos orgánicos, incluyendo el benzoato pero excluyendo azúcares e hidrocarburos y ácidos orgánicos desde el acetato al estearato.

La clasificación de las BSR, se basa principalmente en características nutricionales y morfológicas, así como el contenido de ARNr y la presencia de algunos pigmentos particulares llamados citocromos, que son proteínas que desempeñan una función vital en el transporte de energía química. De acuerdo con sus capacidades metabólicas, las BSR han sido divididas en dos grandes categorías:

Grupo I: pueden utilizar algunos de los ácidos grasos volátiles, ácido benzoico o aún desarrollarse quimioautótrofamente con H₂ o ácido fórmico como donadores de electrones y CO₂ como única fuente de carbono. Los géneros representativos de este grupo son *Desulfobacter*, *Desulfococcus* y *Desulfosarcina*.

Grupo II: proliferan en presencia de lactato pero no pueden emplear ácido acético, propiónico o butírico como únicos donadores de electrones y fuente de carbono. En dicho grupo resaltan los géneros *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*, y *Desulfotomaculum* (Castro, 2004), este último pertenece a la bacterias de interés en este trabajo, del cual se hablará en el siguiente punto.

Las bacterias sulfato-reductoras pertenecen al Phyla o Phylum *Firmicutes*, que se divide en la Clase *Clostridia*, que se subdividen en el Orden *Clostridiales*, conformada por la Familia *Peptococcaceae*, ramificada en el género *Desulfotomaculum* que posee una pared celular delgada. (Campbell *et al.*, 1957; Postgate y Campbell, 1963

Por este motivo se tiñe como cocos Gram positivo. Son anaerobios obligados, proliferan en presencia de lactato pero no pueden emplear ácido acético, propiónico o butírico como únicos donadores de electrones y fuente de carbono. Se pueden encontrar en alimentos mal procesados, lagos y suelos (Campbell *et al.*, 1957; Postgate y Campbell, 1963). Dentro de dicho género se encuentra la especie de estudio descrita en el siguiente punto.

2.3.1.1 *Desulfotomaculum nigrificans* (Campbell y Postgate, 1965; Werkman y Weaver, 1927)

Las bacterias *Desulfotomaculum nigrificans*, son células de forma ovalada cuyas dimensiones aproximadas son 0.3 a 0.5 μm de ancho y de largo de 3 a 6 μm . Además, su estructura externa adquiere forma denticulada. Esto se observa en la Figura 7. Dicha bacteria posee movimientos lentos debido a que contiene en sus extremo una estructura llamada flagelo peritricoso que le ayuda a trasportarse. Este movimiento que realiza, lo hace en línea recta, el porcentaje en mol de la guanina y citosina en el ARN es de 45%. Crecen en un medio especializado, que contenga lactato o piruvato. Su desarrollo puede ser inhibido al utilizar formiato de sodio o acetato de sodio. La temperatura óptima de proliferación es de 55°C, pero puede desarrollarse a temperaturas de 65 o 70°C y temperaturas inferiores de 37 a 30°C, aunque su proliferación disminuye a esta temperatura. Su hábitat puede estar en el suelo, en pilas de “composta”, alimento en mal estado o en el fondo del mar a temperaturas altas (Campbell *et al.*, 1957; Postgate y Campbell, 1963).

Esta bacteria no produce ninguna patología en el hombre, las esporas que se producen a partir de las bacterias antes mencionadas son de forma ovalada, manchan como Gram negativo debido a que las especies del género *Desulfotomaculum* tienen pared celular. Las colonias que se generan en agar a partir de dichas esporas son de color negro, debido a la oxidación de sulfato ferroso a diferentes sales. En 1965 se descubrió la especie *Desulfotomaculum nigrificans*, la primera bacteria descrita que pertenece al género *Desulfotomaculum*. Alrededor de 20 especies diferentes del género *Desulfotomaculum* han sido identificadas en una variedad de entornos, en el suelo, agua, regiones geotermales y en el contenido del rumen de los animales.

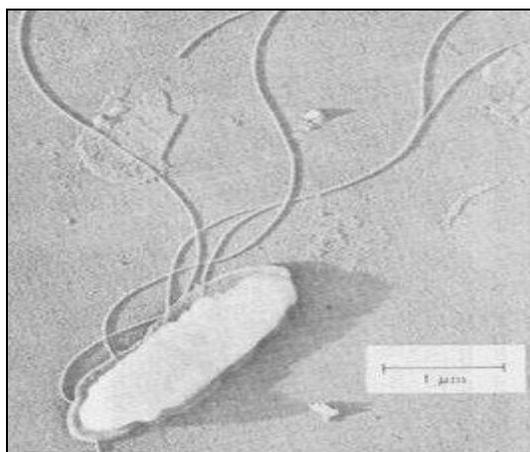


Figura 7. *Desulfotomaculum nigrificans*
(Campbell y Postgate, 1965)

2.4 Dominio Archaea

Las Archaeas fueron descubiertas y clasificadas por Carl Woese *et al* (1987). Éstas representan un Dominio distinto al de las Bacteria y Eucarya. Las Archaea se considera como el último en evolucionar en comparación con los demás Dominios.

Los estudios sobre su estructura del ARNr, indican que es similar en tamaño a la de las Bacteria; sin embargo, la mayoría de las proteínas contenidas en dichas Archaea, tienen características del Dominio Eucarya, lo que indica una estrecha relación durante el transcurso de la evolución. Esto quiere decir que las Archaea y las Eucarya, probablemente tuvieron un ancestro común. Por lo tanto, éste dio origen a toda la vida existente, debido a que seguía evolucionando cuando la Tierra era mucho más caliente de lo que es en la actualidad (Woese, 1978; Woese *et al.*, 1990).

El dominio Archaea está formado por un grupo heterogéneo de microorganismos entre sus características generales distintivas destacan las siguientes (Woese, 1990)

- a) Carecen en todos los casos del ácido murámico (peptidoglicano) como constituyente de la pared celular
- b) Presentan una morfología que no se ha encontrado en ninguno de los microorganismos que componen el Dominio Bacteria, como por ejemplo, las formas poligonales que tienen algunas arqueas halófilas o los cocos extremadamente irregulares que presentan algunas hipertermófilas
- c) No catabolizan la glucosa mediante glicólisis, sino que emplean una vía metabólica de oxidación simple
- d) Su maquinaria fundamental de transcripción es muy similar a la que poseen los organismos pertenecientes al dominio Eucarya
- e) Manchan como Gram positivo. Esto se basa debido a la presencia de pseudomureína en la pared celular
- f) Sus principales grupos fisiológicos son: Archaea halofílicas, Archaea termofílicas y Archaea metanogénica, esta última es de importancia para esta investigación y de la cual se hablará en el siguiente punto.

2.4.1 Bacterias metanogénicas (BM) (Campos, 2001)

Las bacterias metanogénicas o Archaeas metanogénicas, pertenecen al Phylum *Euryarchaeota* (Maidak, *et al* 1996). Dicho Phylum ocupa ambientes anaerobios. Generalmente se reproducen por fisión, como la mayoría de las bacterias y su único modo de obtener energía es mediante la formación de CH₄ (Forterre y Poulliquen, 2002). Fenotípicamente, son muy semejantes a las BSR, ya que miden entre 0.5 a 8µm de largo y presentan características morfológicas parecidas, como barras alargadas o cortas, cocos, cocos lanceolados, con una apariencia de discos, triangulares, cuadrados o en espiral.

Las bacterias metanogénicas son anaerobias estrictas (aquéllas que no requieren oxígeno y la presencia de éste las inhibe), producen metano como principal producto del mecanismo energético. Se dividen principalmente de acuerdo con el tipo de metanogénesis llevada a cabo, en acetoclásticas e hidrogenofílicas. Las primeras son las más importantes dentro de este proceso y se encargan de convertir el ácido acético en metano y dióxido de carbono.

Tienen un desarrollo lento en su proliferación (de aproximadamente 2 a 3 días), poseen gran influencia en los cambios de pH, debido a la eliminación de ácido acético, ya que a menor acidez en el pH, mayor producción de metano. Las hidrogenofílicas controlan el potencial de oxidación-reducción (redox) del proceso, al igual que la formación de ácidos grasos volátiles. Asimismo, consumen hidrógeno y ácido fórmico para la formación de metano (Rincón-Acelas, 2008).

Las bacterias metanogénicas utilizan compuestos simples para la formación de metano. La mayoría de sus sustratos contienen un solo átomo de carbono o son de baja masa molecular. En la Tabla 2 se muestran las reacciones llevadas a cabo por las BM. Para obtener su energía, se transporta el protón a la membrana celular y éste se emplea para la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés). Además, dicha reacción redox genera la síntesis de carbono. La cantidad de ATP existente se utiliza para biosíntesis y esta cantidad empleada depende de las rutas de fijación del carbono en la composición celular (Lens *et al.*, 1998).

Las BM proliferan en un intervalo de pH óptimo de 6.7 a 7.8 y poseen la propiedad de producción de metano a partir de compuestos con un número limitado de carbonos.

Tabla 2. Reacciones llevadas a cabo por las BM (Lens y Hulshoff Pol, 2000)

Reacción	ΔG kJ/mol CH ₄
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130.4
$4\text{HCOO}^- + 4\text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-119.5
$4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$	-185.5
$4\text{CH}_3\text{OH} \longrightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-103
$4\text{CH}_3\text{NH}_3^+ + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{NH}_4^+$	-74
$2(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+ + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{NH}_4^+$	-74
$4(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 6\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_4$	-74
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-32.5

Como se mencionó, las BM pertenecen al Phylum *Euryarchaeota*. Dentro de éste, se abarca un amplio rango ecológico, como se observa en la Tabla 3. Por este motivo, solamente se nombrará la taxonomía de las especies de estudio. Dentro de dicho Phylum, se encuentra la Clase *Metanobacteria*, dividida dentro del Orden *Methanobacteriales* que, a su vez, está subdividida en la Familia llamada *Methanobacteriaceae*. Ésta se ramifica y comprende al género *Methanobacterium*. Dicho género obtiene su energía a través de sustratos monocarbonosos, como el acetato de sodio, H₂, CO₂, formiato de sodio, metanol y algunas metilaminas. A partir de la oxidación de dichos compuestos se generan gases, la mayoría metano. Es por este motivo que a estos microorganismos se le denomina con el nombre de Archaea Metanogénica o Bacteria Metanogénica (BM). Dentro de este género se encuentran diversas especies, tales como: *bryantii*, *alcaliphilum*, *espanolense*, *subterraneum*, *uliginosum*, *formicum*, *wolfeii*, *e ivanov* (Bergey, 2005), siendo estas tres últimas las de mayor importancia para esta investigación, las cuales se presentan a continuación.

2.4.1.1 *Methanobacterium formicicum* (Belyaev *et al.*, 1983)

Las Archaea o Bacteria *Methanobacterium formicicum* posee una morfología en forma de bacilo con apariencia de varilla larga, torcida y delgada, con una punta redondeada, a menudo formando cadenas o filamentos llamados estreptobacilos. Además, tiene un tamaño de 0.4 a 0.8 μm de ancho por 2 a 15 μm de largo, como se observa en la Figura 8. El porcentaje en mol de la guanina y citosina en el DNA (ADN) es de 41:42.

Tabla 3. Taxonomía de las Archaeas metanogénicas (Bergey's, 2005)

Order	Order
Family	Family
Genus	Genus
Species	Species
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i> (Continued)
<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanoplanus</i>
<i>Methanobacterium</i>	<i>M. limicola</i> , <i>M. endosymbiosus</i>
<i>M. formicicum</i> , <i>M. bryantii</i> ,	<i>Methanoculleus</i>
<i>M. uliginosum</i> , <i>M. alcaliphilum</i> ,	<i>M. olentangyi</i> , <i>M. marisnigri</i> ,
<i>M. ivanovii</i> , <i>M. thermoalcaliphilum</i> ,	<i>M. thermophilicus</i>
<i>M. thermoaggregans</i> , <i>M. espanolae</i> ,	<i>Methanofollis</i> gen. nov.
<i>M. thermophilum</i> , " <i>M. palustre</i> "	<i>M. tationis</i> comb. nov.
<i>Methanothermobacter</i> gen. nov.	<i>Methanocorpusculaceae</i>
<i>M. thermoautotrophicus</i> comb. nov.,	<i>Methanocorpusculum</i>
<i>M. wolfeii</i> comb. nov.	<i>M. parvum</i> , <i>M. labreanum</i> ,
<i>Methanobrevibacter</i>	<i>M. bavaricum</i> , <i>M. sinense</i>
<i>M. arboriphilicus</i> , <i>M. ruminantium</i> ,	<i>Methanospirillaceae</i> fam. nov.
<i>M. smithii</i>	<i>Methanospirillum</i>
<i>Methanosphaera</i>	<i>M. hungateii</i>
<i>M. stadtmaniae</i> , <i>M. cuniculi</i>	<i>Methanosarcinales</i>
<i>Methanothermaceae</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>
<i>Methanothermus</i>	<i>Methanosarcina</i>
<i>M. fervidus</i> , <i>M. sociabilis</i>	<i>M. barkeri</i> , <i>M. mazeii</i> ,
<i>Methanococcales</i>	<i>M. thermophila</i> , <i>M. acetivorans</i> ,
<i>Methanococcaceae</i>	<i>M. vacuolata</i>
<i>Methanococcus</i>	<i>Methanolobus</i>
<i>M. vanniellii</i> , <i>M. voltaei</i> ,	<i>M. tindarius</i> , <i>M. siciliae</i> , <i>M. vulcani</i> ,
<i>M. maripaludis</i> , " <i>M. aeolicus</i> "	<i>M. oregonensis</i> comb. nov.
<i>Methanothermococcus</i> gen. nov.	<i>Methanococcoides</i>
<i>M. thermolithotrophicus</i> comb. nov.	<i>M. methylutens</i>
<i>Methanocaldococcaceae</i> fam. nov.	<i>Methanohalophilus</i>
<i>Methanocaldococcus</i> gen. nov.	<i>M. mahii</i> , <i>M. halophilus</i>
<i>M. jannaschii</i> comb. nov.	<i>Methanohalobium</i>
<i>Methanoignis</i> gen. nov.	<i>M. evestigatum</i>
<i>M. igneus</i>	<i>Methanosalsus</i> gen. nov.
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>M. zhilinaeae</i> comb. nov.
<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanosaetaceae</i> fam. nov.
<i>Methanomicrobium</i>	<i>Methanosaeta</i>
<i>M. mobile</i>	<i>M. concilii</i> , <i>M. thermophila</i> comb.
<i>Methanolacinia</i>	nov.
<i>M. paynteri</i>	<i>Methanopyrales</i> ord. nov.
<i>Methanogenium</i>	<i>Methanopyraceae</i> fam. nov.
<i>M. cariaci</i> , <i>M. organophilum</i> ,	<i>Methanopyrus</i>
<i>M. liminatans</i>	<i>M. kandleri</i>

Este valor se determinó por la densidad de flotación (Bd). Esto significa que a un mayor contenido en G+C el ADN posee mayor densidad, teniendo menor capacidad de flotación. Las características se pueden observar a detalle en la Tabla 4.

Algunas cepas que se forman de la proliferación de consorcios de bacterias son autótrofas. Esto significa que, para nutrirse, elaboran su propia materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas. En este caso, el acetato y la cisteína son estimulantes para su desarrollo, obteniendo la máxima tasa de proliferación ("crecimiento específico") que es aproximadamente de 0.053 cel h^{-1} , así como la máxima tasa de absorción de H_2 de 0.13 $\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ (Magingo y Stumm, 1991).

Dicha Archaea pueden encontrarse en sedimentos anaerobios, en digestores o biorreactores anaerobios o también pueden estar presentes, aunque no tan abundantes en el rumen del ganado (Van Bruggen *et al.*, 1984).

Tabla 4. Características de las especies del género *Methanobacterium*
formicicum (Belyaev *et al.*, 1983; Boone *et al.*, 1986; Bryant *et al.*, 1978; Bryant *et al.*, 1971; Bryant *et al.*, 1967); ***Methanobacterium ivanov*** (Jain *et al.*, 1987; Kneifel *et al.*, 1986; Konig, 1984; Patel *et al.*, 1990; Worakit *et al.*, 1986); ***Methanobacterium wolfeii*** (Winter y Zellner; 1987; Zellner *et al.*, 1989)

especies			
<i>Methanobacterium</i>			
Propiedades	<i>formicicum</i>	<i>ivanov</i>	<i>wolfeii</i>
Morfología	varilla	Varilla	varilla
Ancho de la célula(μm)	0.4-0.8	0.5-0.8	0.4-
Largo de la célula(μm)	2-15	1.2	2.4-2.7
Filamentos (μm)	Si tiene	2-15	Si tiene
Mancha de Gram	+	+	+
pH, rango óptimo	6.6-7.8	7.0-7.4	7.0-7.5
T (°C), rango óptimo	35-45	45	55-65
Sustrato	H ₂ , for. (iP, iB)	H ₂	H ₂
Autótrofas	+	+	+
Factores de crecimiento	[ac, cys]	[ac]	[El]
% mol G + C	41-42(Bd)	37(Tm)	61(Tm)
Tipo de cepa	DSM 1535	DSM 2611	DSM2970

Sustrato que necesitan para la metanogénesis: H₂=gas hidrógeno; for= formiato; iP=isopropanol; iB=isobutanol; (): indican actividad en las cepas hacia estos sustratos. Factores de crecimiento: Ac=acetato; Cys= cisteína; El= Extracto de levadura; []: los factores son estimulantes, pero no necesaria para el crecimiento. El % mol Guanina + Citosina: Bd = determinada por la densidad de flotación; Tm = determinado por el punto de fusión. Colección de cultivos: DSM, Colección Alemana de Microorganismos (Braunschweig, Alemania, 1994).

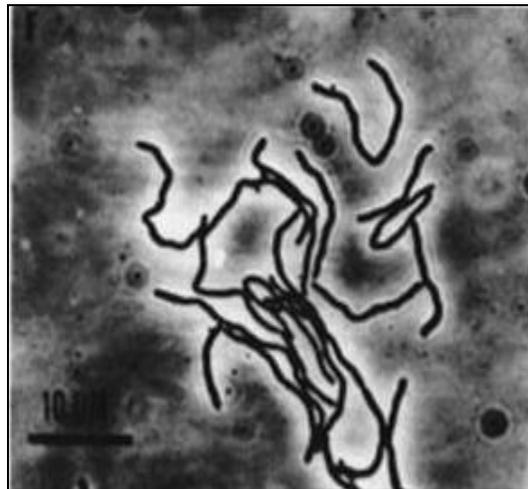


Figura 8. *Methanobacterium Formicicum*
(Balch *et al.*, 1979)

Las colonias que se forman a partir de la Archaea antes mencionada son planas, de color blanco a gris, además de ser filamentosas, viscosas, en forma de esfera. Después de 3 a 5 días, llega a alcanzar un diámetro de hasta 5 mm. El medio de cultivo selectivo de Balch *et al* (1979), en el que se encuentra las *Methanobacterium formicicum* puede llegar a infectarse, creando bacterias patógenas de otra especie.

Por este motivo, se deben tomar en cuenta estas características para evitar una contaminación; su color es café oscuro y tiene apariencia turbia, muestra granulación uniforme en el medio líquido que no se rompe o deshace, incluso con una vigorosa agitación. Si dicho medio se encuentra saludable, debe tomar un color amarillo claro homogéneo, sin gránulos, ni objetos extraños. La descripción general de dicha especie se presenta en la Tabla 4 también.

2.4.1.2 *Methanobacterium ivanov* (Jain *et al.*, 1987).

El nombre de la *Archaea ivanov* se dio debido al científico ruso Mikhail Vladimirovich Ivanov, quien fue pionero en la bioquímica ambiental y metanogénesis microbiana en ambientes subterráneos. El material original fue complementado por la investigación de Belyaev *et al.*, en 1983 y 1987, así como por Bhatnagar *et al.*, en 1984 y, en dicha bacteria, se observa una morfología en forma de bacilo ligeramente curvo con el extremo redondeado. Mide aproximadamente entre 0.2 y 0.5 de ancho, entre 1 y 15 μm de largo. Dichas bacterias se pueden encontrar solas o en cadenas cortas, manchan como Gram positivo y no poseen estructuras externas. Debido a esto se encuentran inmóviles y se presentan en la Figura 9.

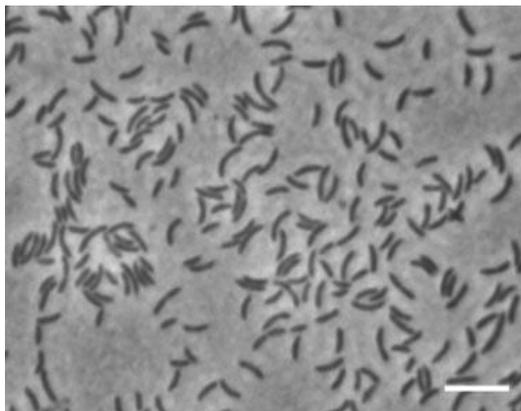


Figura 9. *Methanobacterium ivanov*
(Belyaev *et al.*, 1987)

Las colonias de esta especie presentan en la superficie un color amarillo verdoso y su forma es redonda. Después de 14 días de incubación, el diámetro de una colonia es aproximadamente de 3 a 6 mm, crecen y se desarrollan preferentemente con amoníaco o nitrógeno (Magot *et al.*, 1986; Souillard y Silbold, 1986). Su principal fuente de nitrógeno y azufre es el sulfuro, cisteína y la metionina, en el momento en que se aísla la bacterias se le nombra cepa, es por este motivo que la primera cepa que se logro aislar se nombro como cepa 31 DSMZ 2611, OCM140 (Belyaev *et al.*, 1987) o cepa ivanov (Belyaev *et al.*, 1987; Jain *et al.*, 1987).

Su porcentaje en mol de la guanina y citosina en el DNA (ADN) es de es 37 TM. Dicho porcentaje se determina por el punto de fusión de las bacterias (TM). Se determinó en la investigación de Belyaev *et al* en 1987.

La composición y descripción de dicha especie se muestra en la Tabla 4.

2.4.1.3 *Methanobacterium wolfeii* (Winter *et al.*, 1985)

Las bacterias *Methanobacterium wolfeii* presenta una estructura morfológica de bacilos, con aspecto de barras delgadas y cilíndricas. Cuentan con una longitud $2\pm 5\ \mu\text{m}$ y de ancho $0\pm 35\pm 0\pm 5\ \mu\text{m}$. Se producen en cadenas largas, en parejas o en solitario, manchan como Gram-positivo, lo que significa que poseen una pared celular rígida. Además, no tienen movilidad, ya que no contienen cilios ni flagelos, no forman endosporas (estructura creada dentro de la bacteria para soportar ciertas condiciones ambientales) y se presentan en la Figura 10. A las poblaciones de células que se forman se les llaman colonias. Éstas se producen en agar, tienen un diámetro de $1\pm 2\ \text{mm}$ de color amarillento y su forma es convexa. El desarrollo de estas colonias es rápido si se utiliza un medio mineral a base de NH_3 , como única fuente de nitrógeno, sulfuro de azufre como fuente de azufre e H_2/CO_2 o formiato como fuente de carbono que, asimismo, le sirve como fuente de energía.

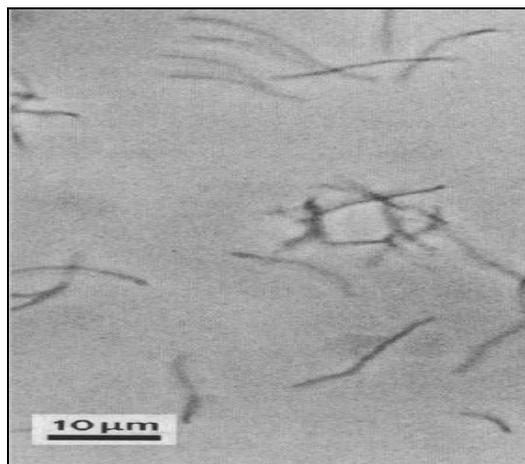


Figura 10. *Methanobacterium wolfeii*
(Winter *et al.*, 1985)

Al identificar y aislar la especie *Methanobacterium wolfeii* de otras se le denomina cepa. Dicha cepa está desprovista de elementos extracromosómicos (plásmidos) que son los que codifican la información genética imprescindible o necesaria para la supervivencia del microorganismo en ambientes naturales. Asimismo, su hábitat se produce por la descomposición anaerobia o en los lodos de los digestores o biorreactores anaerobios. El porcentaje en mol de la guanina y citosina en el ADN es de 61% determinado por desnaturalización térmica. El tipo de cepa de dicha bacteria es llamado DSM 2970T (AYCC 43096T) y fue aislada por medio de un inóculo de la mezcla de lodos de una planta depuradora de aguas residuales y por sedimentos de ríos en 1982 (Winter *et al.*, 1985).

La comparación de las tres bacterias que se nombraron, pertenecientes al género *Methanobacterium*, se muestran en la misma Tabla 4.

2.5 Degradación anaerobia

La digestión o degradación anaerobia es un proceso de transformación de la materia orgánica, en el cual no hay presencia de oxígeno molecular como agente oxidante. La capacidad de transferencia de electrones de la materia orgánica permanece intacta en el metano producido. Este proceso se debe al consorcio de bacterias que son sensibles o completamente inhibidas por el oxígeno. En la digestión o degradación anaerobia más del 90% de la energía disponible por oxidación directa se transforma en metano, consumiéndose sólo un 10% de la energía en proliferación microbiana (Muñoz-Valero *et al.*, 1987). En las reacciones bioquímicas que ocurren en la digestión o degradación anaerobia, sólo una pequeña parte de la energía es liberada, mientras que la mayor parte de esa energía permanece como energía química en el metano producido.

La primera descripción sobre la producción de metano en la naturaleza fue hecha por Volta en 1776, quien lo definió como “el gas de los pantanos”. Un siglo después, se demostró la producción de este gas en el estómago de los rumiantes (Zehnder, 1988).

En 1868, Béchamp a través de la realización de experimentos con heces de conejo, observó que la producción de metano es debida a la acción de microorganismos. A finales del siglo XIX, Popoff, Van Senu y Omelianski realizaron estudios detallados sobre la producción microbiológica de metano, encontrando que la metanogénesis es un proceso derivado del rompimiento de materiales poliméricos, dependiente de la temperatura (McCarty, 1982).

Los microorganismos que pertenecen a dicho proceso se nombrarán en el siguiente punto.

2.5.1 Microbiología en la degradación anaerobia

Los microorganismos anaerobios juegan un papel importante en el ciclo global del carbono por la remineralización de grandes cantidades de materia orgánica en condiciones anóxicas, tanto en el mar como en ambientes de agua dulce. El metano y el CO₂ son los productos finales de la descomposición anaerobia la cual se presenta en una diversidad de hábitat (Ferry, 1992).

Los sulfatos disueltos en las vinazas no son considerados una amenaza directa para los ecosistemas, pues es un compuesto químicamente inerte, no volátil y no tóxico en condiciones aerobias (Shin *et al.*, 1995). Sin embargo, existe un gran interés acerca de la aplicación del tratamiento biológico anaerobio para este tipo de aguas residuales, debido a que en condiciones anaerobias, la presencia de iones sulfato en agua residuales incrementan considerablemente la complejidad de las rutas de biodegradación anaerobia de un sustrato complejo con presencia de sulfatos. Comúnmente, el 70% del ácido acético generado es empleado por las bacterias metanogénicas acetotróficas y el 30% del H₂ y CO₂ producidos es utilizado por las bacterias metanogénicas hidrogenotróficas para la obtención de metano y CO₂, como resultado de la metanogénesis. Pero, cuando existe presencia de sulfatos, se genera una vía de degradación, que es la sulfato-reducción. Dentro de dicha degradación se presentan las BSR hidrogenotróficas que compiten con las BM hidrogenotróficas por los sustratos H₂ y CO₂ (Omil *et al.*, 1996).

Esto permite corroborar que las BSR hidrogenotróficas ganan más energía debido al hidrógeno molecular y poseen una mayor afinidad que las BM hidrogenotróficas haciendo que disminuya la concentración de hidrógeno por debajo del valor inicial para las BM hidrogenotróficas (Oude *et al.*, 1994). Esto podría explicar la rápida inhibición de las BM hidrogenotróficas cuando se alimentan iones sulfato a un reactor anaerobio. Las BSR acetotróficas compiten con las BM acetotróficas por el ácido acético (Castro, 2004). Se ha reportado que las BSR pueden competir por el hidrógeno y formiato de sodio que se encuentra en el proceso intermedio de la degradación anaerobia, con las BM y las bacterias acetogénicas sintróficas (Isa *et al.*, 1986), al igual que también pueden competir por el ácido acético (Isa *et al.*, 1986; Parkin *et al.*, 1990), ácido propiónico (Parkin *et al.*, 1990; Visser *et al.*, 1993) y ácido butírico (Visser *et al.*, 1993)

Puesto que las BSR tienen más afinidad por el sustrato de las BM, es común pensar que, en condiciones de presencia de iones sulfatos, las BSR pueden competir con las BM por el hidrógeno y el ácido acético (Castro-González *et al.*, 2004).

Todos estos mecanismos de competencia reducen el sustrato disponible para las BM. El resultado de esta competencia es importante para determinar los niveles de producción final como metano y ácido sulfídrico. El efecto de los iones sulfato se explica si la metanogénesis y la sulfato-reducción se consideran como una alternativa a las reacciones de degradación que compiten por sustratos comunes (Castro-González *et al.*, 2004).

Dentro de la competencia de las BSR y las BM existe otro factor aparte de la composición de la materia orgánica, que es la temperatura. Este factor se ha estudiado someramente por Visser *et al.* (1992). Dichos factores se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Factores que determinen la competencia entre las BSR y las BM en reactores anaerobios (Lens y Hulshoff Pol, 2000)

Factor		
Composición del inóculo	Composición del influente	Condiciones operacionales
<ul style="list-style-type: none"> • Tipo de inóculo • Composición bacteriana • Propiedades de adhesión de las bacterias • Tiempo de las corridas experimentales • Inoculación con una nueva especie bacteriana 	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo de DQO • Concentración de ácido acético • Concentración de iones sulfato • Concentración de sulfuros • Concentración Ca^{+2} y Mg^{+2} 	<ul style="list-style-type: none"> • pH, licor mezclado • Temperatura

Las investigaciones en este campo se han enfocado sobre la competencia entre las BM y BSR en condiciones termofílicas (55°C), empleando ácido acético y sulfatos como sustratos en un reactor anaerobio obteniendo predominio de las BSR sobre las BM. Dentro de los reactores anaerobios a condiciones mesofílicas se han identificado 32 especies de BSR contra 33 especies de las BM mesofílicas, mientras que se han reportado 3 especies de BSR termofílicas contra 14 de las BM termófilas. Principalmente, son los géneros *Methanobacterium*, *Methanothrix* y *Methanosarcina* (Ahring, 1994; Griffin *et al.*, 1998; Shigeki y Harada, 1993).

Independientemente de la competencia de las BSR con las BM, el tratamiento anaerobio termofílico (45 a 65°C) de cualquier agua residual, permite la degradación de materia orgánica más eficientemente con una mayor eliminación de organismos patógenos (Fang y Chung, 1996). Otras ventajas y desventajas con respecto a las condiciones mesofílicas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Ventajas y desventajas de la metanogénesis en condiciones mesófilas y termófilas (Castro, 2004)

Metanogénesis mesofílica 20 a 40°C	Metanogénesis termofílica 45°C a 65°C
<ul style="list-style-type: none"> • Menos vapor de agua en el gas • Mayor población metanogénica • Menos CO₂ en el gas • Balance energético más favorable* • Mayor experiencia en su aplicación 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor actividad (incremento de la velocidad de reacción) • Menor THR y menor volumen del reactor • Menor formación de lodos • Eliminación de microorganismos patógenos • Equilibrio microbiano frágil • Mayor actividad metanogénicas de la biomasa • Baja viscosidad, para el lavado de bacterias menos densas • Mayor requerimiento de energía para el incremento de la temperatura*

* A menos que el medio de cultivo (agua residual en el caso de plantas de tratamiento de aguas) venga a esas temperaturas relativamente elevadas

Aunado a que los reportes sobre el efecto de la temperatura sobre las BSR son limitados, existen miles de plantas a escala industrial que se han instalado en la década pasada para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales pero todas en condiciones mesofílicas. Su aplicación al tratamiento de aguas residuales generadas a alta temperatura de diversas industrias es aún limitada. El proceso se ha investigado para tratamiento termofílicos de aguas residuales a nivel de laboratorio (Castro, 2004; Rincón-Acelas, 2008; Shi y Forster, 1993; Van Lier *et al.*, 1993; Wiegant, 1985), como también en reactores a escala piloto (Ohtsuki *et al.*, 1994; Souza *et al.*, 1992).

Omil *et al* (1997) probaron el efecto de la temperatura sobre las BSR y las BM elevando la temperatura por choques térmicos en una biomasa mesofílica. Utilizaron sustratos como ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, obteniendo aumentos en la actividad sulfato-reductora y disminución de la actividad metanogénica. Concluyeron que las BM requieren de un mayor tiempo de adaptación para obtener una conclusión fiel sobre el efecto de la temperatura en la competencia entre las dos especies microbianas y poder entender mejor la competencia entre las BM y BSR. Se deben tener en cuenta los microorganismos que intervienen en dicho proceso. Esto se muestra en la Figura 11 y se describen en el siguiente punto.

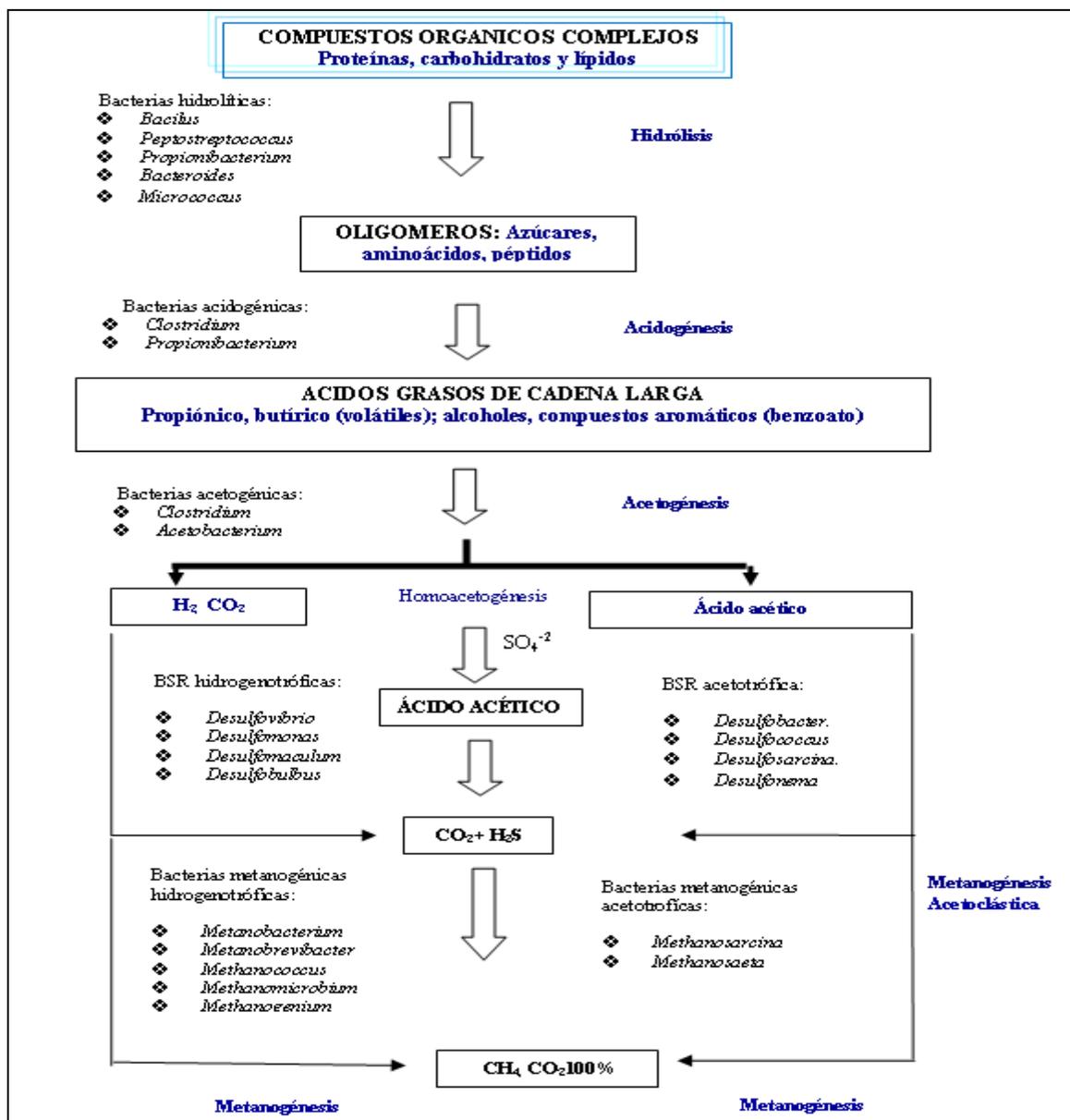


Figura 11. Diagrama del equilibrio del proceso anaerobio (Castro-González *et al.*, 2004)

2.5.1.1 Bacterias “fermentativas” 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 el primer paso necesaria 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*, además de los géneros: *Bacillus*, *Peptostreotococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* (Díaz *et al.*, 2002).

2.5.1.2 Bacterias acidogénicas (formadoras de ácido)

El segundo proceso para la degradación de la materia orgánica es elaborado por este tipo de bacterias que utilizan la glucosa para generar una mezcla de ácidos propiónico, acético y butírico, además de hidrógeno y CO₂. Tienen tasas de reproducción altas con velocidades de duplicación de 30 minutos. Algunos de los microorganismos presentes en estas etapas son del género *Clostridium* y *Propionibacterium* (Pavlostathis y Giraldo, 1991).

2.5.1.3 Bacterias acetogénicas

Son las encargadas de convertir los ácidos propiónico y butírico en acético, además de hidrógeno y CO₂. Éste es el tercer proceso llevado a cabo para dicha degradación. Su proliferación es relativamente lenta (tiempo de duplicación de 1.5 a 4 días). Representantes de los microorganismos acetogénicos son *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophomonas sapovarans*, *Syntrophospora bryantii*, *Syntrophus buswellii* y *Syntrophobacter wolinii*. Todos pertenecen filogenéticamente al 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).

2.6 Cinética de proliferación (“crecimiento”)

Como se había planteado en los puntos anteriores, la temperatura es probablemente el factor más importante para esta investigación, ya que dependiendo de ella, las bacterias se desarrollan adecuadamente o se ve inhibida su reproducción y proliferación, causando con esto la defunción de los microorganismos. Por este motivo, se investiga la temperatura idónea para las 4 especies de interés ya que con esto se podrá obtener la cinética de proliferación (“crecimiento”) que tienen dichas bacterias.

En el desarrollo microbiano es posible observar su proliferación a temperaturas de alrededor de -8 hasta +90°C. El intervalo de temperaturas en que los microorganismos se desarrollan adecuadamente, es alrededor de 30°C, aunque algunas especies se pueden desarrollar, benéficamente en temperaturas mayores o menores, como las especies en estudio.

Dentro de este intervalo, la temperatura afecta algunas características de los microorganismos como: velocidad o tasa de proliferación (“crecimiento”), número final de células, necesidades nutritivas, composición química y enzimática de las células. Cualquier temperaturas por encima de la máxima tasa de proliferación (“crecimiento”) de un determinado microorganismo resulta letal para el mismo y cuanto más elevada sea la temperatura en cuestión, tanto mas rápida será la pérdida de viabilidad. Sin embargo, la letalidad de cualquier exposición a una determinada temperatura por encima de la máxima tasa de proliferación (“crecimiento”) depende de la termoresistencia.

Ésta es, fundamentalmente, una característica de los microorganismos considerados. Para poder medir la cinética de dicha proliferación, se divide en 4 fases: (1) La fase de latencia en la que el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones y pone en marcha su maquinaria metabólica para poder reproducirse activamente. La duración de esta fase es variable y, en general, es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo. (2) La fase exponencial es en la que se lleva a cabo el mayor desarrollo. (3) La fase estacionaria es aquella en la que no hay aumento del número de microorganismos, debido a que la proliferación (“crecimiento”) de unos se equilibra con la muerte de otros. (4) La fase de muerte es en la que el número de microorganismos disminuye debido a que el sustrato se agota o a que la población muta o “envejece”. En la Figura 12 puede apreciarse un gráfico referente a las fases mencionadas (Arias, 2006).

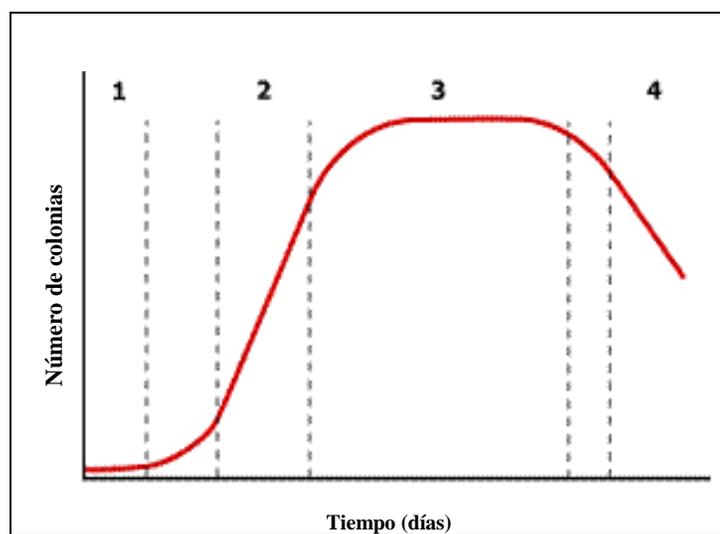


Figura12 Fases de crecimiento (Arias, 2006)

2.7. Planteamiento del problema

Las vinazas contienen materia orgánica abundante, especialmente de compuestos carbonosos, que incluyen una cantidad considerable de fenoles y polímeros naturales. Su empleo se ha diversificado tratando de encontrar la mejor opción para minimizar su impacto ambiental, ya que incrementan la temperatura de los cuerpos receptores (agua o suelo) y disminuye la cantidad de oxígeno disuelto disponible. También su acidez disminuye el pH, lo cual puede disolver algunos metales y volverlos biodisponibles debido a este motivo se ha tratado de utilizar como fertilizante ó como alimento para cerdos de engorda o ganado pero su empleo solamente puede ser en cantidades relativamente pequeñas en comparación con los grandes volúmenes que se producen diariamente. Es por esto que se han llevado a cabo pruebas de degradación anaerobia de las vinazas con el fin de obtener biogás rico en metano (Castro-González y Durán-de-Bazúa, 2001a; Rintala *et al.*, 1991). El biogás pueda ser utilizado como fuente de energía para producir vapor de agua para la fase de destilación, logrando así un ahorro significativo de combustible y, de esta manera, disminuir el impacto ambiental en ambos casos (Widdel, 1998).

2.8 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 y sulfato-reductoras no resisten estas temperaturas. Por lo tanto, se plantea en esta investigación el estudio de los consorcios microbianos que proliferan³ a temperaturas termofílicas en donde se ha reportado la existencia de algunos microorganismos metanogénicos y sulfato-reductores (Ravot *et al.*, 1995; Rincón-Acelas, 2008; Shin *et al.*, 1995).

2.9 Objetivos

Objetivo general

- Identificar y cuantificar bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras que se encuentran en reactores tipo RALLFA a 45, 55 y 65°C alimentados con vinazas de caña de azúcar

Objetivos particulares

- Establecer el medio de cultivo general, específico y selectivo para el desarrollo de las bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras que se encuentran en los RALLFA
- Determinar el tipo de bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras, mediante un examen de frotis teñido por coloración Gram

³ EL término inglés growth puede traducirse al español como proliferar, crecer o desarrollarse. En la biología ha dado en traducirse como “crecer” más que como proliferar o desarrollarse. Pareciera que las bacterias “crecen” (como árboles o animales) y no que “proliferan”, se “reproducen” o se “desarrollan”. En este documento se ha optado por no usar el verbo “crecer” sino las otras acepciones de “to grow” o del sustantivo “growth” traducido como “proliferación” o “desarrollo” y no como “crecimiento”

- Aislar a las bacterias metanogénicas y sulfato reductoras que se encuentran en los RALLFA a 45, 55 y 65°C
- Identificar taxonómicamente las bacterias metanogénicas y sulfato reductoras hasta llegar a género o especie que se encuentran en los RALLFA a 45, 55 y 65°C

En el siguiente capítulo se presenta la metodología seguida en esta investigación.

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Vinazas

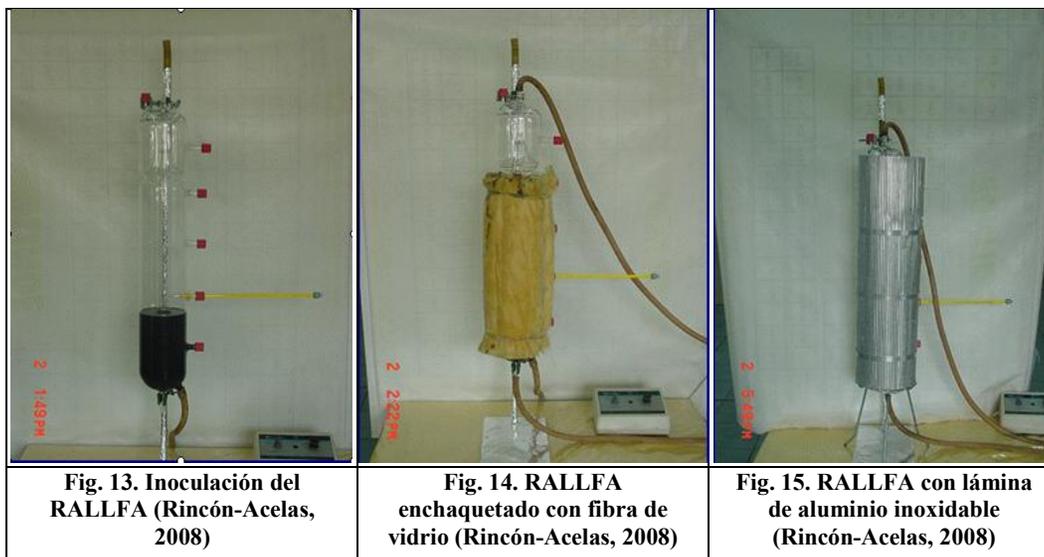
El trabajo consistió en alimentar los reactores con un residuo industrial del proceso de la destilación alcohólica (vinazas), que posee características físicas y químicas que las convierten en un agente muy contaminante del medio ambiente. En la Tabla 7 se presentan las características físicas y químicas de vinazas similares a las utilizadas en esta investigación.

Tabla 7. 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	9-12%p/p	85000-91000 mg/L
Sólidos disueltos volátiles	-	70000-79000 mg/L
Sólidos disueltos fijos	-	5000-7000 mg/L
Sólidos suspendidos totales	-	9000 mg/L
DQO, mg/L	80000-120000	100000-116000
DBO ₅ , mg/L	45000-50000	67000-98000
Cloruros, mg/L	5000-6000	4700-5200
Sulfatos, mg/L	4000-8000	7000-8200
Sulfuros, mg/L	4000-8000	24-69
Sodio, mg/L	400-600	700-2150
Potasio, mg/L	8000-1200	8350-9940
Nitrógeno total	1000-1200 mg/L	5.35-6.1%
Fósforo, mg/L	200-300	-
Calcio, mg/L	2000-3500	2000-2080

3.2 Reactores RALLFA

Los reactores empleados están contruidos de vidrio (Fig. 13). Cuentan con recirculación interna de agua caliente para mantener las tres temperaturas de operación, 45, 55 y 65°C. Para mantener la temperatura de los RALLFA están encaquetados con fibra de vidrio (Fig. 14) y ésta está recubierta con una lámina de aluminio (Fig. 15). El volumen de trabajo es de 2.4 L. Tienen una altura de 65 cm, un diámetro interno de 3.7 cm y uno externo de 7.3 cm. Consisten de una zona de reacción en la parte inferior con una alta concentración de lodos de alta tasa de sedimentación (lecho de lodos granulados), como se presenta en la Figura 13. En la parte intermedia se tienen lodos más ligeros (lecho de lodos floculados). Los lodos de inoculación provienen de una empresa petroquímica mexicana ubicada en la zona de Tamaulipas, con 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 tratada clarificada y a la salida del biogás por arriba. 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, 2001b; Rincón-Acelas, 2008).



3.2.1 Funcionamiento de un reactor anaerobio

Los reactores anaerobios pueden ser utilizados para tratar efluentes domésticos o industriales con altas cargas orgánicas. Como se mencionó arriba, estos reactores constan de tres partes esenciales:

- 1) Sistema hidráulico. En este proceso el agua residual entra a los digestores por el fondo. La alimentación de los reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (RALLFA), consta de 1 g de bicarbonato de sodio, 16.6 mL de sulfato ferroso 0.1 N, 50% de vinaza y 50% de agua de la llave, con un pH entre 4.5 y 5.5. Ésta 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 la conversión de materia orgánica a metano y dióxido de carbono, principalmente,
- 2) Lecho de lodos, que es la parte bioquímicamente activa del reactor y
- 3) Una cámara superior de acumulación de gas (Díaz *et al.*, 2002).

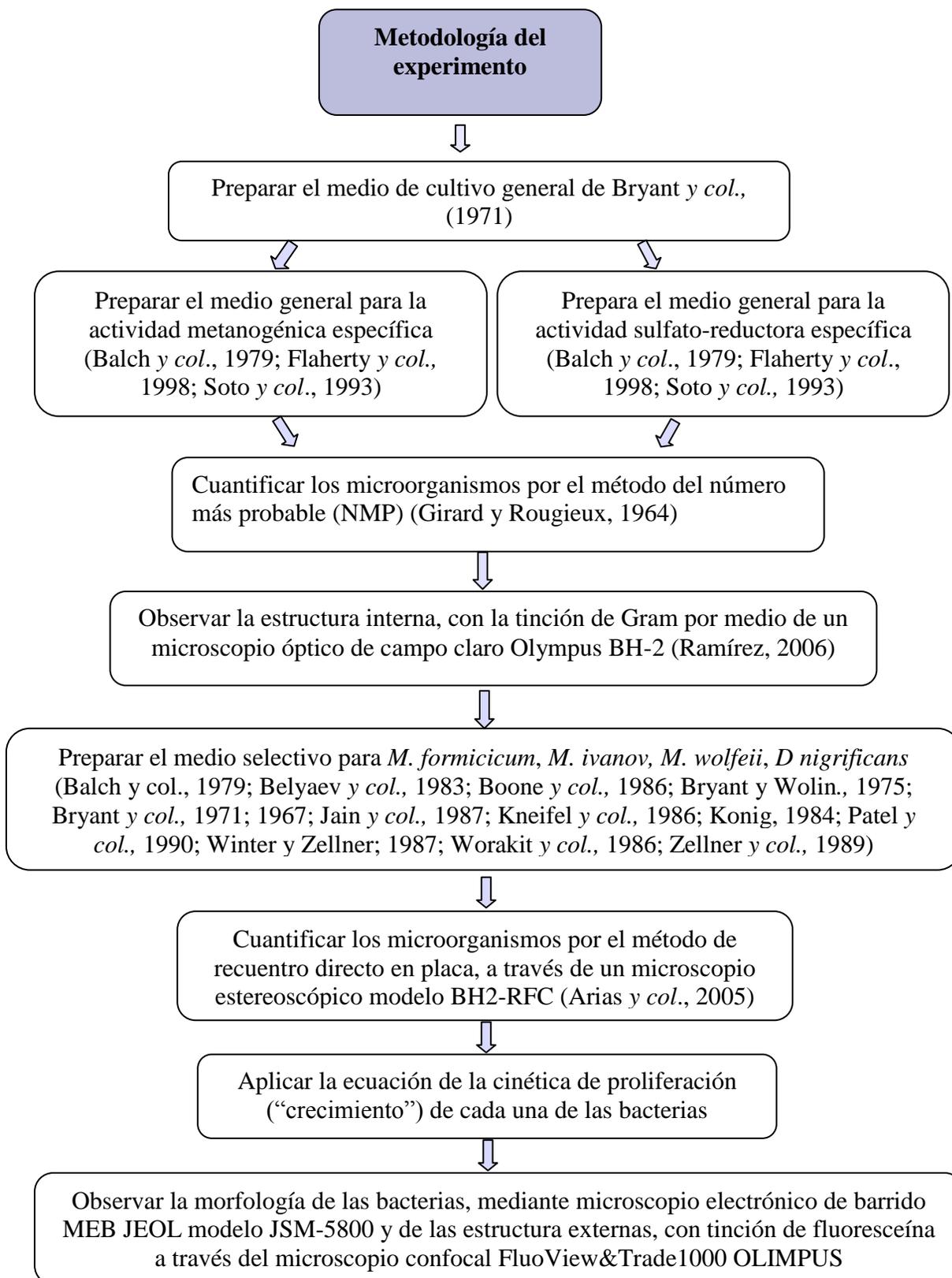
3.3 Experimentos

La estrategia de trabajo para esta investigación tendiente a alcanzar el objetivo propuesto se explicará a detalle en este capítulo, de acuerdo con las condiciones experimentales. Se aplicó el diagrama experimental de la Figura 16.

3.4 Medios de cultivo

3.4.1 Medio de cultivo general (Bryant *et al.*, 1971)

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

**Figura 16. Diagrama del experimento**

- a) Agua anóxica: en un matraz Erlenmeyer adicionar el agua desionizada, tapar 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 N_2 , para mantener las condiciones anóxicas, la preparación de dicha agua se realiza en una cámara anaerobia de guante, cuya atmósfera es de N_2 , esta campana se muestra en la Figura 17.
- b) Solución mineral 1, mineral 2, mineral 3 y traza de minerales, cuya composición se presenta en la Tabla 8A, todas ellas preparadas con agua anóxica a temperatura ambiente.
- c) Las soluciones antes mencionadas se mezclan y adicionan $NaCl$, NH_4Cl , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 7H_2O$, $NaHCO_3$, acetato de sodio, formiato de sodio, extracto de levadura, tripticasa, cisteína y $Na_2S \cdot 9H_2O$, en las concentraciones establecidas en la Tabla 8A. Posteriormente, se esteriliza en una autoclave vertical de 3 calores, fabricación Nacional ARTES03017, modelo CV-250, por 20 minutos a $121^\circ C$ (15 lb/pulg^2 o psig). Finalmente, se adicionan a la solución previamente esterilizada por filtración trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

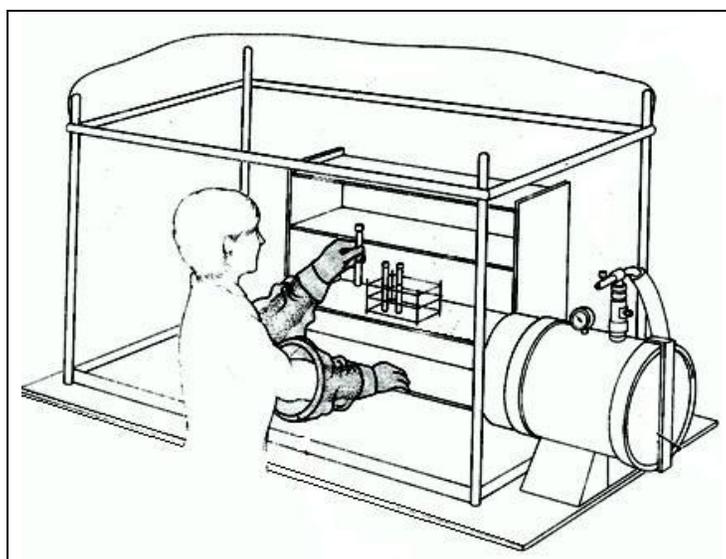


Figura 17. Cámara anaerobia de guante (Atlas y Bartha, 2002)

3.4.2 Medio de cultivo específico para la actividad metanogénica y sulfato-reductora (Balch *et al.*, 1979; Flaherty *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 1993)

- a) El medio específico para las bacterias metanogénicas se prepara realizando la mezcla de la solución mineral 1, mineral 2, traza de minerales, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (2%), $NiCl_2$ (5 mg/10 mL), rezarsurina (0.1%), extracto de levadura, bicarbonato de sodio, peptona de caseína, en las cantidades especificadas en la Tabla 8B. La mezcla se esteriliza por 20 minutos a $121^\circ C$ (15 lb/pulg^2 o psig). Posteriormente, se adicionan a la solución previamente esterilizada por filtración trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

- b) El medio específico de las bacterias sulfato-reductoras se prepara realizando la mezcla de las solución mineral 1, mineral 2, rezarsurina al 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2%), ácido láctico, cisteína, ácido bromoetanol sulfónico, en las cantidades descritas en la Tabla 8B. Aforar a 1L con agua anóxica. La mezcla se esteriliza, por 20 minutos a 121°C (15 lb_f/pulg² o psig).

3.4.3 Medio de cultivo selectivo para cada una de las bacterias seleccionadas, para esta investigación

3.4.3.1 *Methanobacterium formicicum* (Balch *et al.*, 1979)

- a) Preparar la solución mineral 1, mineral 2, traza de minerales, rearszurina, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , acetato de sodio, formato de sodio, extracto de levadura, tripticasa, cisteína, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 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 trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

3.4.3.2 *Methanobacterium ivanov* (Belyaev *et al.*, 1983)

- a) Preparar la solución mineral 1, traza de minerales, rezarsurina, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, cisteína hidrocloreuro, $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y penicilina G. 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 trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

3.4.3.3 *Methanobacterium wolfeii* (Winter, 1985)

- a) Preparar la solución mineral 2, traza de minerales, rezarsurina, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , acetato de sodio, formato de sodio, extracto de levadura, tripticasa, cisteína, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, La mezcla esterilizarla, 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.

3.4.3.4 *Desulfotomaculum nigrificans* (Klemps *et al.*, 1985)

- a) Preparar la solución mineral 2, traza de minerales, NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y rezarsurina al 0.2%. 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 trazas de vitaminas, aforando todo a 1L con agua anóxica.

3.5 Cuantificación de microorganismos, numero más probable (NMP)

3.5.1 Número más probable (NMP)

La cuantificación de las BM y de las BSR, se lleva a cabo utilizando la técnica del número más probable descrita por Girard y Rougieux, 1964.

- a) Para la cuantificación de las bacterias metanogénicas se prepara el medio específico como se indica en el punto 3.4.2a y el procedimiento se realiza en una cámara anaerobia de guante
- b) Tomar 1 mL de lodo y sembrarlo en el medio de cultivo específico, realizando 15 diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} , cada una con tres repeticiones
- c) Colocar una campana de Durham en cada tubo, cerrar herméticamente e incubar por 30 días a las temperaturas seleccionadas
- d) En el caso de las bacterias sulfato-reductoras, se prepara el medio específico como se indica en el punto 3.4.2b y se repiten los pasos desde el inciso (b).
- e) En el día 30 se cuentan los tubos positivos de cada dilución y temperatura, comparando los resultados con la Tabla B1, del Anexo B. Se obtiene un índice del NMP, el cual es multiplicado por el volumen de la muestra y dividido por la dilución que corresponde al primer tubo positivo, como resultado, obtener el número de células/ mL de muestra.

3.6 Recuento directo en placa

La cuantificación de las especies *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium wolfeii*, *Methanobacterium ivanov*, *Desulfotomaculum nigrificans* se lleva a cabo utilizando la técnica de recuento directo en placa, descrita por Arias *et al.* (2005).

- a) Preparar los medios de cultivo selectivo para las bacterias como lo indica el punto 3.4.3.
- 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
- c) Mezclar el medio selectivo y agar en proporciones de 50/50, verter la mezcla en cajas Petri estériles de 60 x 15 mm
- d) Tomar 1 mL de lodo, sembrarlo en el medio de cultivo específico para 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 selectivo seleccionado y por cada día de incubación
- e) Incubar por 15 días a la temperatura deseada. Diariamente retirar las cajas de cada medio de cultivo selectivo y observar en el estereoscopio BH2-RFC. Contabilizar las colonias más visibles en la caja (debido a razones estadísticas, las placas deben contener entre 30 y 300 colonias, para realizar un conteo confiable).

3.7 Cinética de proliferación (“crecimiento”) para el medio de cultivo selectivo

La ecuación de la cinética de proliferación, se obtiene del conteo de las colonias desarrolladas en el medio de cultivo selectivo para las 4 bacterias, mediante los siguientes pasos:

- a) Contabilizar las colonias como se indica en el punto 3.6e
- b) Anotar el número de colonias diariamente

c) Sustituir en la ecuación (1), el número de colonias

Número de bacterias (Bacterias/mL)= Número de colonias * concentración del medio específico..... (1)

d) Al obtener el número de bacterias, se resuelve la ecuación (6), que describen el tiempo de proliferación exponencial de una bacteria en el medio de cultivo selectivo (Brock y Madigan, 1993; Peral, 1993), para realiza esto se aplica primero la ecuación (5), que describe el número de generaciones, la cual es la velocidad que tarda una población en duplicarse:

$$y = 2n x \quad (2)$$

donde

x = Número de bacterias al tiempo 0

y = Número de bacterias al tiempo t

t = Tiempo de proliferación (“crecimiento”) exponencial

Al tiempo 0, $y = x$

Resolviendo la ecuación (2) para n , se tiene la ecuación (3):

$$\log y = \log x + n \log 2 \quad (3)$$

Sustituyendo la ecuación (3) se tiene que el número de generaciones es

$$n = \log y - \log x / \log 2 \quad (4)$$

Si se sustituye en la ecuación (4), el valor de $\log 2$ por 0.3010, se tiene que $1/0.3010 = 3.3$. Puede calcularse el número de generaciones, siempre que se conozca la población inicial x , y la población y después del tiempo t .

$$n = 3.3 \log y/x \quad (5)$$

El tiempo de generación G es igual a t (tiempo transcurrido en fase exponencial para llegar de x a y) dividido por el número de generaciones n , o sea:

$$G = t/n \quad (6)$$

3.8 Preparación de muestras para observar al microscopio

3.8.1 Microscopio electrónico de barrido (Patrón-Soberano, 2010)

Se utiliza la microscopía de barrido, para obtener imágenes de la morfología de la célula en alta resolución, el procedimiento para preparar la muestra y realizar estas observaciones es:

- a) Seleccionar la colonia del medio de cultivo selectivo que se ha desarrollado en la caja Petri. Dicha colonia se toma por medio de un “azada” (aza, coloquialmente), previamente esterilizada y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A este tubo se adiciona 1 mL de solución de fosfatos (0.35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.17 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua)
- b) Homogenizar la muestra anterior, dejar reposar 10 minutos y centrifugar, tirar el sobrenadante dejando el precipitado del microorganismo
- c) Agregar a dicha muestra glutaraldehído al 3 % y repetir el inciso (b)
- d) Adicionar 0.1 mL de la solución de Os_2O_5 1N, agitar vigorosamente y dejar reposar durante 2 horas y realizar el inciso (b)
- e) Agregar al precipitado una solución de alcohol al 30, 50, 70 y 100%, después de cada adición repetir el inciso (b)
- f) Adherir cuidadosamente el precipitado en un porta objetos redondo dentro del equipo (SPI # 13218-AB Modelo CPD7501), para secar hasta el punto “crítico” durante 30 minutos
- g) Montar el porta-objeto con la muestra a un disco de acero de 10 mm de diámetro y recubrirla con una capa de oro de 20 nm, el procedimiento para recubrir el portaobjetos con dicha muestra es mediante evaporación, utilizando un metalizador Balzers (SCD 004)
- h) Recubierta la muestra, realizar observaciones de la morfología en un microscopio electrónico de barrido JEOL mod. JSM-5800, con un sistema de microanálisis OXFORD mod. ISIS 486.

3.8.2 Microscopio confocal

La tinción con fluoresceína permite observar estructuras celulares sobresalientes, como cilios, flagelos, pilis, fimbrias, etc. El procedimiento para esta tinción es el siguiente:

- a) Pesar 12 mg de fluoresceína y disolver en 12 mL de solución de fosfatos, esta preparación se conserva en un vial de color ámbar en refrigeración y protegida de la luz.
- b) Recolectar de la caja Petri la colonia del medio de cultivo selectivo después de 15 días de haber sembrado, por medio de una aza previamente esterilizada y colocar en el tubo eppendorf, el proceso se realiza para cada especie y temperatura de trabajo
- c) Añadir la solución de fosfatos, homogeneizar la muestra, dejar reposar 10 minutos y centrifugar, tirar el sobrenadante dejando el precipitado del microorganismo,
- d) Agregar 1 mL de la solución de fluoresceína, agitar vigorosamente e incubar el tubo, a la temperatura de trabajo por 1 hora, centrifugar y tirar el sobrenadante
- e) Repetir el inciso (c) cinco veces, para obtener el precipitado del microorganismo
- f) Añadir 100-200 μL del precipitado en cada porta objetos y distribuir el volumen en toda la superficie, previamente limpia con etanol al 70%
- g) Dejar secar los porta objetos protegidos de la luz
- h) Adicionar una gota de solución glicerol: agua al 50% al porta objetos y montar el cubre objetos, deja secar las preparaciones protegidas de la luz, envolver en papel aluminio y mantener en refrigeración, hasta su análisis
- i) Observar en un Microscopio Confocal FluoView™1000 OLYMPUS las estructuras celulares.

3.8.3 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 “aza” 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).

3.9 Diseño experimental

3.9.1 Primer experimento: selección de la dilución de trabajo

- a) Tomar 1 mL lodo de cada RALLFA y 9 mL de medio de cultivo general, realizando 9 diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , en tubos de cultivo. Todo el procedimiento se realiza en la cámara anaerobia
- b) Incubar por 5 días a las temperaturas correspondientes
- c) Al cabo de los 5 días, tomar una muestra por medio de un “aza” estéril haciendo un frotis en el porta objetos de cada dilución del medio de cultivo líquido
- d) Realizar una tinción de Gram
- e) Observar las nueve muestras de cada temperatura al microscopio
- f) 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.

3.9.2 Segundo experimento

Para aislar las bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras 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 9, lo que permite definir un diseño factorial de $2^1 \times 3^1 \times 30^1$. 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.

Tabla 9. Segundo experimento

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

- c) Para realizar el segundo experimento, colocar 1 mL del medio de cultivo general a la dilución seleccionada y a la temperatura de trabajo correspondientes de 45, 55 y 65°C, en 30 tubos de cultivo, adicionar 9 mL del medio específico para las bacterias metanogénicas, realizar el procedimiento por triplicado en una cámara anaerobia de guante, dando un total de 90 tubos que se cierran herméticamente
- d) El mismo procedimiento se lleva a cabo para el medio de cultivo específico de las BSR
- e) Los 180 tubos se incuban por 30 días a la temperatura correspondiente de 45, 55 y 65°C. Diariamente se retira un tubo 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.

3.9.4 Tercer experimento

Para realizar la cuantificación de las BM y BSR por medio del método del NMP, se seleccionan cinco factores: Tipo de medio (A), temperatura (B), (c) tiempo, (D) dilución, (E) repetición. 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 $1^1 \times 2^1 \times 3^2 \times 15^1$. 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.

Tabla 10. Tercer experimento

<i>Nivel</i>	1	2	3	15
<i>Factores</i>				
A: Medio de cultivo específico	Medio específico BM	Medio específico BSR		
B: Temperatura	45	55	65	
C:Tiempo, días	30			
D:Dilucion	1			15
E: Repeticion	1	2	3	

- Tomar 1 mL de lodo de cada RALLFA y 9 mL de medio de cultivo específico, realizar 15 diluciones, con tres repeticiones cuyas concentraciones de dilución son: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} , en tubos de cultivo dando un total de 45 tubos por cada temperatura 45, 55 y 65°C
- Para las bacterias metanogénicas, preparar el medio de cultivo específico como se indica en el punto en el punto 3.4.2a, colocar una campana de Durham en los 135 tubos y realizar las diluciones del inciso a. Se cierran herméticamente los tubos y se incuban por 30 días a las temperaturas correspondientes
- En el caso de las bacterias sulfato-reductoras se prepara el medio específico como se indica en el punto 3.4.2b y se repiten los pasos desde el inciso b
- Al día 30 se cuentan los tubos positivos de cada dilución y temperatura, comparando los resultados con las Tablas B1 del Anexo B, se obtiene un índice del NMP, el cual es multiplicado por la dilución que corresponde al último tubo positivo, como resultado se tiene el número de células/ mL de muestra.

3.9.3 Cuarto experimento

Para la determinación de las especies de bacterias *Methanobacterium formicicum* (Mf), *Methanobacterium wolfeii* (Mw), *Methanobacterium ivanov* (Mi) y *Desulfotomaculum nigrificans* (Dn) se seleccionan dos 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 11, 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 11. Cuarto experimento 3

<i>Nivel</i>	1	2	3	4
<i>Factores</i>				
A: Medio de cultivo general	<i>Methanobacterium formicicum</i>	<i>Methanobacterium wolfeii</i>	<i>Methanobacterium ivanov</i>	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>
B: Temperatura °C	45	55	65	
C: Tiempo	0	15		

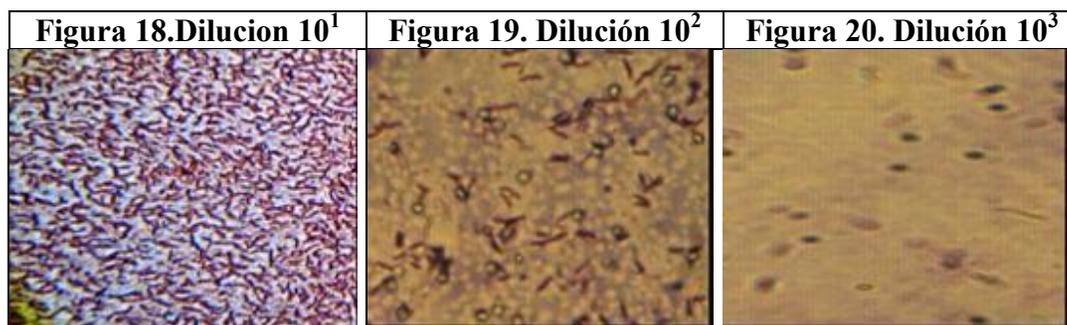
- a) La resiembra consiste en tomar 0.1 mL del medio específico para la actividad metanogénica de cada temperatura 45, 55 y 65°C y colocar este volumen por triplicado en 45 cajas Petri, las cuales se mantienen en incubación por 15 días.
- b) Diariamente se retira una caja de cada temperatura y se observa directamente en el estereoscopio BH2-RFC el desarrollo de las colonias, realizando una cuantificación durante todo el experimento
- c) En el día 15 se seleccionan dos colonias, una de ellas se aísla y se fija mediante una solución de glutahaldehído al 3%, para observar la morfología de la muestra en un microscopio electrónico de barrido JEOL mod. JSM-5800 Sistema de Microanálisis OXFORD Mod. ISIS 486el. Se debe preparar ésta como se indica en el punto 3.7.1. La otra colonia se aísla en una solución salina amortiguada de fosfatos y se prepara la muestra como se indica en el punto 3.7.2, para observar si cuenta con estructuras externas (cilios o flagelos) en un microscopio OLIMPUS FLUOVIEW ver. 17c viewer.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Primer experimento, medio de cultivo general a tres temperaturas

En el primer experimento se selecciona la dilución en la que las estructuras bacterianas presentan características distintivas. De las quince diluciones preparadas se observó que la concentración 10^1 no es la ideal para esta investigación debido a que se observan estructuras agrupadas, no definidas, lo cual se presenta en la Figura 18. Además, se debe tener en cuenta que las bacterias anaerobias no tienen una amplia proliferación, ya que en promedio son bacterias que tardan en desarrollarse en comparación con las bacterias aerobias (Atlas y Bartha, 2002). En cuanto a la dilución de 10^2 , presenta estructuras morfológicas claras definidas, su desarrollo se aprecia adecuadamente, teniendo microorganismos separados, aislados y sin aglomeración. Esto se puede apreciar en la Figura 19, mientras que para la dilución de 10^3 , se observa un desarrollo insuficiente de bacterias, por este motivo no se percibía bien sus estructuras externas, como se muestra en la Figura 20. En el resto de las diluciones no se percibió ningún microorganismo. Finalmente, se utilizó la dilución 10^2 , en el medio de cultivo general.



Dicha dilución se incubó en el medio de cultivo general propuesto por Bryant *et al.*, 1978, el cual es óptimo para el fortalecimiento y proliferación de las BM y BSR, a las tres temperaturas de trabajo seleccionadas de 45, 55 y 65°C, durante 5 días. Debido a que las propiedades morfológicas que se presentaron en el medio general son semejantes a las características descritas por el autor: bacilos alargados y cocos regulares Gram negativos y cocos irregulares Gram positivos, se presume que las BM y BSR se desarrollaron favorablemente.

A continuación se mencionan las características morfológicas, que presenta el medio de cultivo general a las tres temperaturas, encontradas en esta investigación

- 1) La morfología regular y bien definida de los cocos
- 2) Estructura interna de los cocos que se tiñe como Gram positivo
- 3) Bacilos en forma de varillas

Las características restantes se observaban en la Tabla 12, donde se muestran las diferencias entre cada temperatura al quinto día.

Tabla 12. Características del medio de cultivo general a las tres temperaturas, al quinto día

Temperatura	45°C	55°C	65°C
			
Descripción	Cocos regulares Gram negativo y bacilos alargados en forma de varillas alargadas, Gram negativo	Cocos regulares Gram positivos y Gram negativo bacilos alargados en forma de varillas Gram positivos	Cocos regulares Gram negativos y bacilos cortos en forma de varillas Gram positivo
Agrupación	Cocos aislados, sin agrupación, en poca cantidad, y bacilos agrupados en gran cantidad	Cocos agrupados en gran cantidad, al igual que los bacilos que se encuentran aislados	Cocos, aislados, muy bien definidos sin agrupación en gran cantidad, y bacilos aislados sin agrupación, en menor cantidad, no muy bien definidos

4.2 Segundo experimento, medio de cultivo específico para la actividad metanogénica y sulfato-reductora

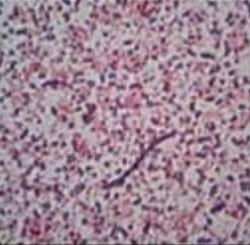
a) El medio de cultivo específico óptimo para el desarrollo y proliferación de las BM durante 30 días, fue el propuesto por Balch *et al.* (1979). Las BM que se desarrollaron en este medio, presentan las características descritas por el autor, es decir una morfología de bacilos alargados Gram positivos y bacilos en forma de varilla, esto comprueba que el desarrollo de las BM fue óptimo. Las características que presentan las BM a las tres temperaturas son las siguientes:

- 1) Tinción de color violeta, indicando Gram positivo en la estructura interna de los cocos y bacilos
- 2) Morfología de los bacilos en forma de varilla alargadas y curvas

Existen diferencias entre sus características como son la cantidad de cocos Gram positivos y negativos según la temperatura. A 45°C hay una mayor población y agrupación de cocos Gram positivos, mientras que a 55 y 65°C, la población de estos es escasa.

Las características a detalle durante los 30 días se presentan en la Tabla C1 del Anexo C, mientras que las observaciones al final del experimento (día 30), se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Características del medio de cultivo específico para las BM a las tres temperaturas; en el día 30

Temperatura	45°C	55°C	65°C
			
Descripción	Bacilos Gram positivos en formas de varillas cortas y alargadas curvadas y cocos Gram positivos	Bacilos Gram positivos en forma de varillas cortas, alargadas curvadas, Y cocos Gram positivos y negativos.	Bacilos Gram positivos en forma de varillas alargadas, rectas y algunas curvas. Cocos Gram positivos y negativos
Agrupación	Bacilos sin agrupación, bien definidos, en gran cantidad y cocos agrupados, bien definidos en gran cantidad	Bacilos agrupados, bien definidos, en gran cantidad y cocos en poca cantidad, bien definidos	Bacilos agrupados bien definidos, en gran cantidad y cocos en poca cantidad aislados bien definidos

b) El medio de cultivo específico para la BSR presenta las siguientes características

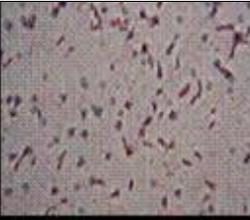
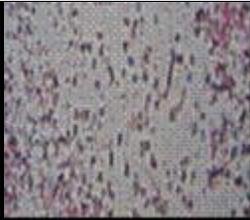
- 1) Los bacilos en su estructura interna se tiñen como Gram positivo
- 2) En la estructura interna de los cocos, se tiñen de color rojizo, presentándose como Gram negativo, en gran cantidad.

La morfología de las BSR está de acuerdo con lo reportado por Flaherty *et al.* (1998), esto indica que el medio de cultivo para el desarrollo y proliferación de las bacterias a las tres temperaturas es el ideal. Las características a detalle durante los 30 días se presentan en la Tabla C2 del Anexo C, mientras que las observaciones al final del experimento (día 30), se muestran en la Tabla 14.

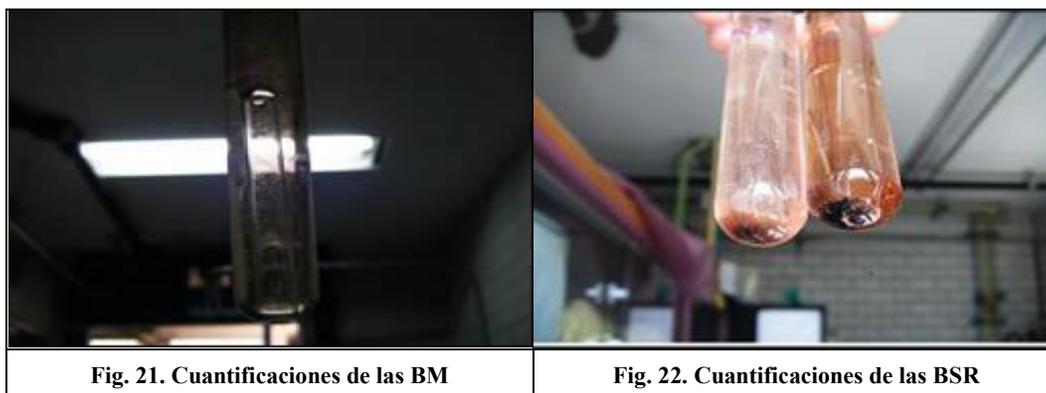
4.3 Tercer experimento, cuantificación de las BM y BSR por el método del NMP

Para cuantificar las BM en el medio específico, se prepararon 15 diluciones por triplicado las cuales fueron observadas diariamente durante los 30 días del experimento.

Tabla 14. Características del medio de cultivo específico para las BSR en el día 30

Temperatura °C	45°C	55°C	65°C
			
Descripción	Bacilos Gram positivos, en forma de barras cortas bien definidas, y cocos Gram negativos.	Bacilos Gram positivos, en forma de barras cortas y cocos Gram negativos	Bacilos Gram positivos en forma de varillas y cocos Gram negativos
Agrupación	Bacilos aislados en poca cantidad y cocos aislados en gran cantidad sin agrupación	Bacilos aislados en poca cantidad y cocos en gran cantidad aislados, bien definidos	Bacilos no muy bien definidos, y cocos en gran cantidad, con agrupación

Se identifican como tubos positivos aquellos donde se presenta un desplazamiento de la campana de Durham debido a la generación de metano y como tubos negativos cuando no existe desplazamiento de la campana. La clasificación se presenta en Tabla D1, D3 y D5 del Anexo D. En la Figura 21 se presenta un tubo positivo. En el caso de las BSR, el tiempo y las diluciones fueron los mismos que para las BM y se tomó como tubo positivo aquél que presenta un precipitado de color negro, debido a la formación de FeS, como se observa en la Figura 22. Los tubos negativos no contienen precipitado. La clasificación se presenta en las Tablas D2, D4 y D6 del Anexo D.



Los tubos positivos se comparan con la Tabla B1 del Anexo B, y se aplica la ecuación 7

$$\text{Número de células/ml de muestra} = \text{factor de dilución} * \text{NMP (tabla)} \quad (7)$$

Como resultado final se obtiene la cantidad de BM y BSR a las tres temperaturas (45,55 y 65°C), que se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados del NMP de BM y BSR a 45, 55 y 65°C, durante 30 días

Temp.°C	45°C	55°C	65°C
BM	150000bacterias/mL	1500000bacterias/mL	4600 bacterias/mL
BSR	200 bacterias/mL	12000 bacterias/mL	11000 bacterias/mL

En la temperatura de 45°C, se presenta 99.9% de BM y 0.01% de BSR por mililitro. Con estos datos se comprueba que la BSR tienen un bajo desarrollo a la temperatura mencionada, por lo cual no compiten con las BM por el sustrato. Para la temperatura de 55°C, se presenta la mayor cantidad de BM con 99.996% y sólo 0.004% de las BSR. Por último, a 65°C, se obtiene un 58% de BSR y 42% de BM. Esto permite concluir que el desarrollo de las BSR es mejor a temperaturas mayores de 55°C mientras que para las BM su desarrollo es ideal a temperaturas debajo de 55°C, como ya ha sido mencionado y estudiado por Campbell y Postgate (1965). También ha sido reportado por Bergey's (2005), que la mayoría de las especies metanogénicas no alcanzan temperaturas mayores a 70°C, es decir que la mayoría de las especies metanogénicas son mesofílicas o termofílicas.

4.4 Cuarto experimento, medios de cultivos selectivos para *Methanobacterium formicicum* (Belyaev *et al.*, 1983; Boone *et al.*, 1986; Bryant *et al.*, 1978; Bryant *et al.*, 1971; Bryant *et al.*, 1967); ***Methanobacterium ivanov*** (Jain *et al.*, 1987; Kneifel *et al.*, 1986; König, 1984; Patel *et al.*, 1990; Worakit *et al.*, 1986); ***Methanobacterium wolfeii*** (Winter y Zellner; 1987; Zellner *et al.*, 1989) y ***Desulfotomaculum nigrificans*** (Campbell y Postgate, 1965)

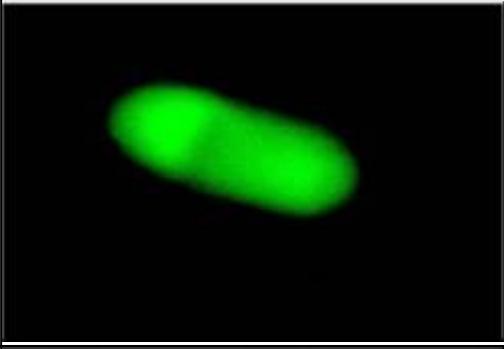
Al aislar las especies del género *Methanobacterium* y *Desulfotomaculum* se compararon las características que encontraron los autores, con las características morfológicas experimentales, de cada especie de estudio.

4.4.1 *Methanobacterium formicicum*

Según la bibliografía de Belyaev *et al.*, 1983; Boone *et al.*, 1989; Boone *et al.*, 1986; Bryant y Wolin (1975); Bryant *et al.* (1971); Bryant *et al.* (1967), indican que su temperatura óptima de proliferación se encuentra entre 35 y 45°C. La morfología que presenta son bacilos en forma de varillas alargadas con un tamaño de 0.4 a 0.8 µm de ancho y de largo 2 a 15µm. No poseen estructuras externas, lo que indica que su movimiento es nulo. La morfología observada en este estudio a 45°C y 55°C son bacilos en forma de varilla, sin agrupación, teñidas como Gram positiva. Esto significa que su pared celular posee una capa gruesa de peptidoglucano o mureína, que es la que determina la forma de la especie. Por este motivo sólo se tiñe con el primer colorante, su capa no se decolora, ni se vuelve a teñir por las demás soluciones que se utilizan en este procedimiento. Asimismo, se realiza una tinción con fluoresceína, que muestra la estructura externa, comprobando que no posee movilidad, mide aproximadamente 3µm de largo y 0.3µm de ancho, esto se observó utilizando la técnica de barrido y se presentan las características de la especie de interés a 45°C y a 55°C, respectivamente, en las Tablas 16 y 17.

Debido a las características morfológicas, obtenidas en este estudio y por los autores citados, se comprueba que la especie en estudio es la *Methanobacterium formicicum*.

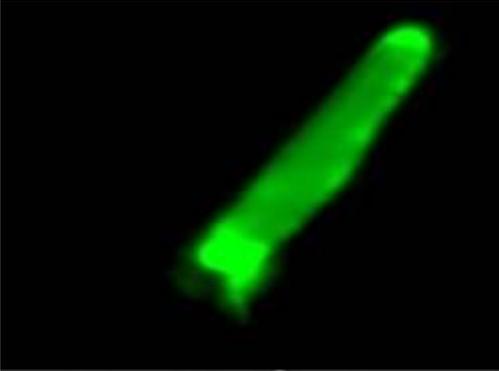
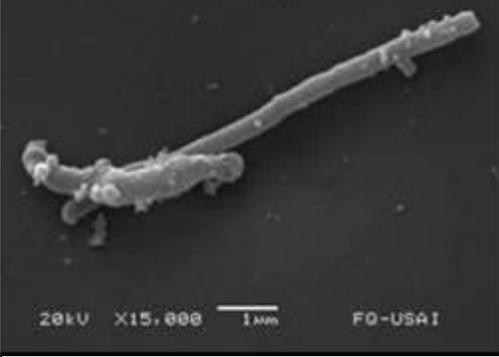
Tabla 16. Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína. *Methanobacterium formicicum* 45°C

Microscopía	<i>Methanobacterium formicicum</i>	Características
Tinción de Gram 100X		Bacilo en forma de varilla delgadas y cortas, con las puntas redondeadas, se tiñen como Gram positivos, sin agrupación, en poca cantidad
Tinción con fluoresceína 600x		Bacilo en forma de varilla corta, irregular, no se perciben estructuras externas, como cilios o flagelos
Microscopía de barrido 15,000x		Bacilos en forma de varillas delgadas, con extremos cilíndricos, e irregulares, el tamaño aproximado es de 3µm de largo y de ancho de 0.3µm

Sin embargo, se comprobó que esta bacteria tolera temperaturas hasta 55°C, teniendo una proliferación mayor que a 45°C, ya que posee un tamaño aproximado de 7µm.

Esto se observa en la Tabla 17. Dichos resultados no concuerdan con los reportados por Belyaev *et al.* (1987); Boone (1986); Boone *et al.* (1989); Bryant y Wolin (1975); Bryant *et al.*, (1971); Bryant *et al.* (1967), quienes afirman que la especie *Methanobacterium formicicum*, no prolifera a 55°C.

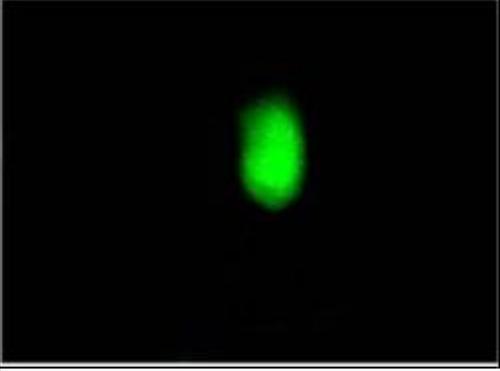
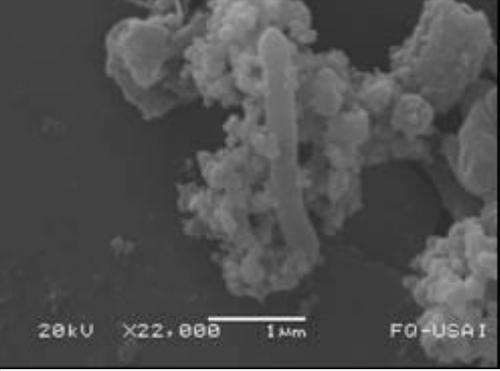
Tabla 17. Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína. *Methanobacterium formicicum* 55°C

Microscopía	<i>Methanobacterium formicicum</i>	Características
Tinción de Gram 100x		Bacilos en forma de varillas alargadas, con los extremos irregulares, se tiñen como Gram positivo, en poca cantidad sin agrupaciones
Tinción con fluoresceína 600x		Bacilo en forma de varilla alargada, con un extremo redondo y el otro extremo cuadrado
Microscopía de barrido 15,000x		Bacilos en forma de varilla larga, recta y delgada, con los extremos cuadrados, mide 7µm de largo y 0.5µm de ancho

4.4.2 *Methanobacterium ivanov*

La especie *Methanobacterium ivanov*, se describe detalladamente en la bibliografía consultada de los autores Jain *et al.* (1987); Kneifel *et al.* (1986) y König (1984), quienes mencionan que la temperatura óptima de proliferación para dicha bacteria es de 45°C. Su morfología presenta: bacilos en forma de barras cortas, Gram positivo, miden aproximadamente 0.2 µm a 0.5 µm de ancho y de largo 1 a 15 µm, sin movilidad. Con estas características que se observan, se realiza una comparación con las características experimentales de esta investigación, que son: bacilos en forma de barra, Gram positivas, no cuentan con estructuras externas, lo que significa que no poseen movilidad, mide 4 µm de largo y de ancho 0.2 µm. En este estudio se encontró que sólo se desarrolla a 45°C. A la temperatura de 55 y 65°C existe un desarrollo nulo. Esto se puede observar con mayor detalle en la Tabla 18.

Tabla 18. Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína. *Methanobacterium ivanov* a 45°C

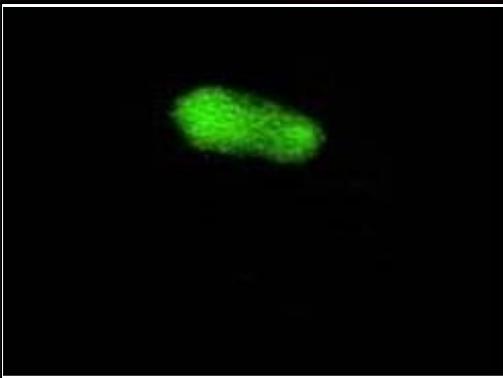
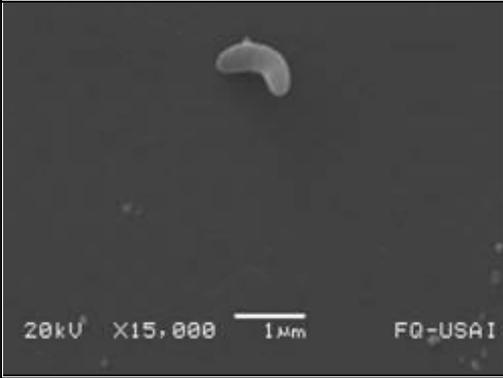
Microscopía	<i>Methanobacterium ivanov</i>	Características
Tinción de Gram 100X		Bacilos en forma de barra corta, Gram positivos, agrupados en gran cantidad
Tinción con fluoresceína 600x		Bacilo en forma de barras cortas, sin ninguna estructura interna
Microscopía de barrido 15,000x		Bacilos en forma de barras cortas, y curvas, con los extremos redondeados, agrupados entre sí, su tamaño aproximando es de 4 µm de largo y de ancho de 0.2µm

4.4.3 *Methanobacterium wolfeii*

La especie *Methanobacterium wolfeii* presenta las siguientes características morfológicas, citadas por los autores Winter *et al.* (1987); Zellner *et al.* (1989): bacilo en forma de varilla alargadas, Gram positivo, con una altura de 2.4 a 2.7 µm, de ancho de 0.4 a 1 µm, sin estructuras externas. Por este motivo no tienen movilidad, su temperatura óptima de desarrollo es de 55 y 65°C. En este estudio se comprobó que esta especie puede presentarse a temperaturas menores, como a 45°C, con las siguientes características morfológicas: bacilos en forma de varillas cortas, largas y algunas con las puntas encorvadas o redondeadas, se tiñe como Gram positivo, no presentan estructuras externas y miden aproximadamente de 0.9 µm de largo y 0.3 µm de ancho. Se debe tener en cuenta que, a 45°C, la especie se desarrolla adecuadamente.

Esto se observa en la Tabla 19, pero con un tamaño menor, en comparación con las demás temperaturas de estudio. A 55°C, la especie obtuvo un mayor desarrollo y proliferación, en sus características morfológicas que son bacilos alargados con un tamaño aproximado de 1.5 μm de largo y 0.5 μm de ancho. Esto se muestra en la Tabla 20. En el caso de 65°C, la especie *Methanobacterium wolfeii*, forma bacilos rectos cortos, con un tamaño aproximado de 7 μm de largo y 0.3 μm de ancho. Sus características morfológicas se presentan con más detalle en la Tabla 21

Tabla 19. Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína. *Methanobacterium wolfeii* a 45°C

Microscopía	<i>Methanobacterium wolfeii</i>	Características
Tinción de Gram 100x		Bacilo en forma de varilla corta encorvado, Gram positivo, agrupados, en poca cantidad.
Tinción con fluoresceína 600x		Bacilo encorvado, no cuenta con estructuras externas
Microscopía de barrido 15,000x		Bacilos encorvado en sus extremos, mide 1nm de largo y de ancho 0.1nm

Es la única especie que proliferó a las tres temperaturas. Además, por sus características morfológicas, obtenidas en este estudio y por los autores citados, se comprueba que la especie en estudio es *Methanobacterium wolfeii*.

Tabla 20. Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína. *Methanobacterium wolfeii* a 55°C

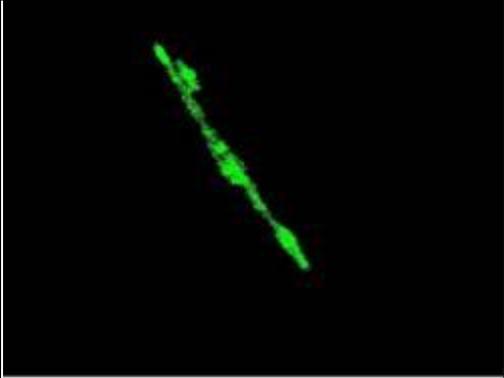
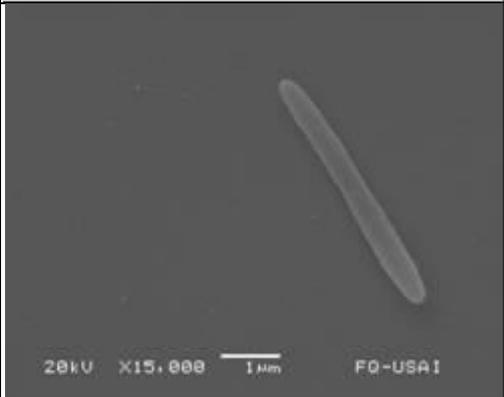
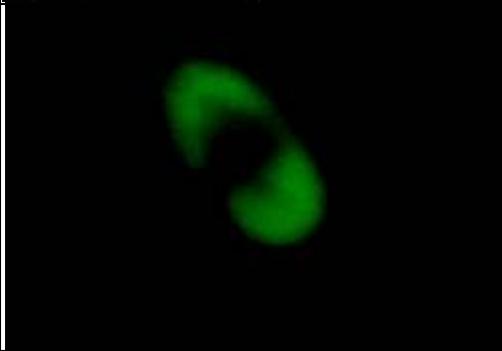
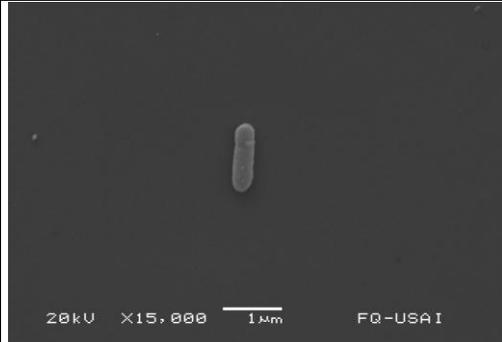
Microscopía	<i>Methanobacterium wolfeii</i>	Características
Tinción de Gram 100X		Bacilos Gram positivos en forma de varillas alargadas, sin agrupación, en poca cantidad
Tinción con fluoresceína. 600x		Bacilo alargado, sin estructuras externas, por este motivo no presenta movilidad
Microscopía de barrido 15,000x		Bacilo en forma de varilla alargada, con sus extremos redondos, mide de largo 7nm y de ancho 0.3nm

Tabla 21. Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína. *Methanobacterium wolfeii*, 65°C

Microscopía	<i>Methanobacterium wolfeii</i>	Características
Tinción de Gram a 100X		Bacilo en forma de varillas cortas Gram positivas, sin agrupación
Tinción con fluoresceína. 600x		Bacilo alargado en forma de varilla, no cuenta con estructuras externas
Microscopía de barrido 15,000x		Bacilo en forma de barra larga delgadas, rectas y redondas en sus extremidades, mide de largo 1.5µm y de ancho 0.3µm

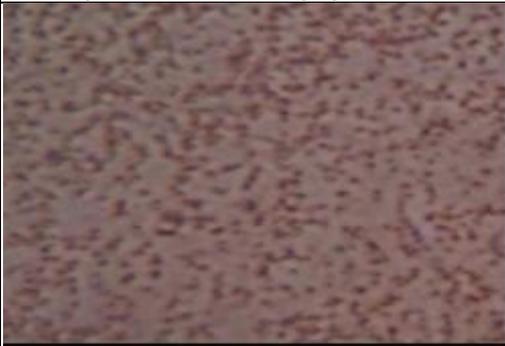
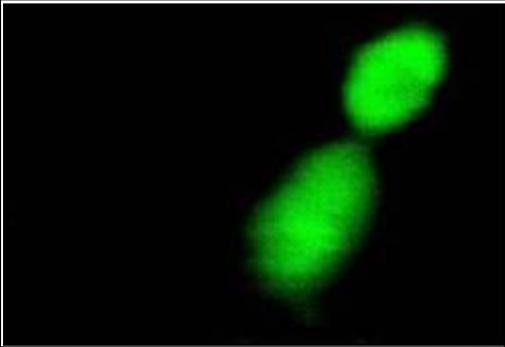
4.4.4 *Desulfotomaculum nigrificans*

La especie sulfato reductora *Desulfotomaculum nigrificans* se caracteriza por su morfología como lo muestra la bibliografía citada por Flaherty *et al.* (1998), ya que son cocos irregulares Gram negativos, se mueven, con dimensiones aproximadas son 0.3 a 0.5 μm de ancho y de largo de 3 a 6 μm . La temperatura óptima de crecimiento es a partir de 65°C.

Dichas características se comparan con este estudio y se obtiene que, a 55°C, muestra cocos Gram negativos. Esto significa que contiene una capa delgada de peptidoglucano o mureína, que puede teñirse y decolorarse fácilmente, tomando el color final de la técnica, que es la safranina, convirtiéndose en Gram negativo.

Fue posible desarrollar esta especie aunque presenta un tamaño menor a lo reportado, de 1 μm de largo y 0.4 μm de ancho. Además, poseen movilidad debido a que contiene una estructura externa, llamada flagelo peritricoso. Esta estructura se observa de manera limitada, debido a que no se logró pigmentar adecuadamente, como se muestra en la Tabla 22.

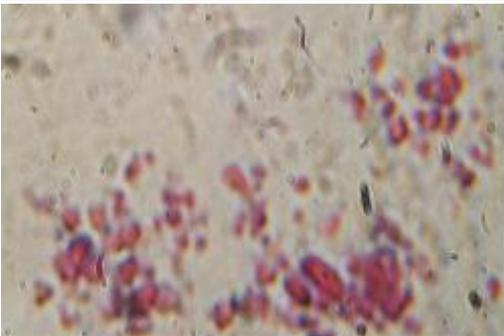
Tabla 22. Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína. *Desulfotomaculum nigrificans* a 65°C

Microscopía	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	Características
Tinción de Gram 100x		Cocos Gram negativos, en gran cantidad, agrupados.
Tinción con fluoresceína. 600x		Bacilo en cadena, sin estructura externa
Microscopía de barrido 15,000x		Bacilos cortos en cadenas. Mide 1.5 μm de largo y de ancho 0.4 μm

A 65°C también presenta las mismas características que a 55°C pero su tamaño es mayor de 3 μm de largo y 0.4 μm de ancho, como se puede observar en la Tabla 23.

Como conclusión se tiene que esta especie prolifera mejor a temperaturas mayores, como a 65°C, como es reportado por los autores, aunque puede encontrarse a una temperatura de 55°C, con un desarrollo disminuido.

Tabla 23. Microscopía de barrido y con tinción de fluoresceína. *Desulfotomaculum nigrificans* a 55°C

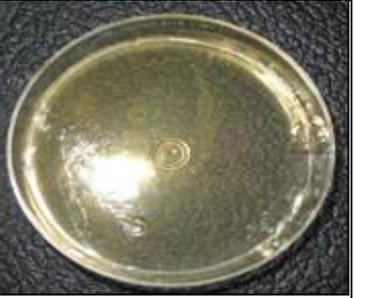
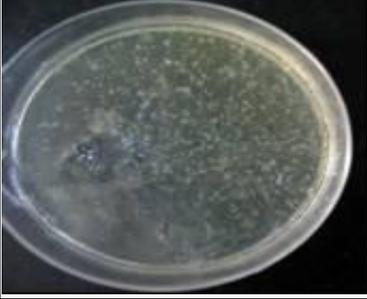
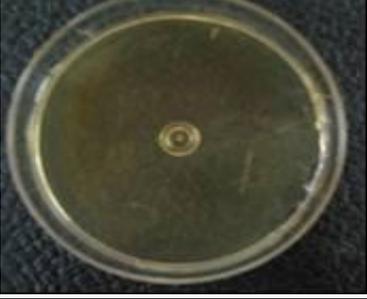
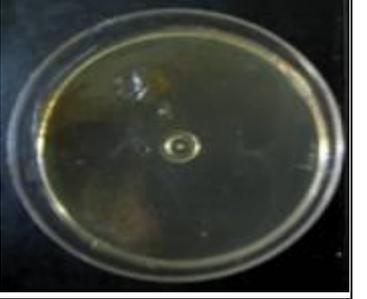
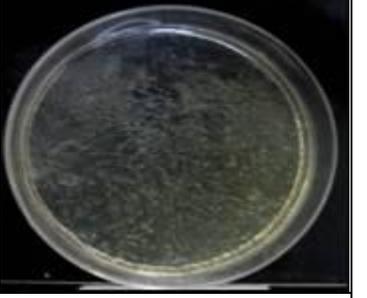
Microscopía	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	Características
Tinción de Gram 100x		Cocos Gram negativos en gran cantidad, agrupados
Tinción con fluoresceína. 600x		Bacilo en forma de barra corta, cuanta con una estructura externa en la parte delgada de la célula
Microscopía de barrido 15,000x		Bacilos en forma de gota, con una extremidad mas grande que la otra, mide aproximadamente 1μm de largo y de ancho 0.4μm

4.4.4.1 Recuento directo en placa para el medio de cultivo selectivo

El recuento en placa se contabilizó diariamente durante los 15 días. Mediante este conteo se fue observando el desarrollo de las colonias de cada especie y de cada temperatura.

Los resultados al día 15 se muestran en la Tabla 24. Mediante dicha tabla se observa el tamaño de la colonia, las estructuras externas, la forma de proliferación y con estos datos se obtiene la cinética de “crecimiento” para cada especie y temperatura.

Tabla 24. Placas del medio cultivo selectivo a las tres temperaturas, en el día 15

		
Figura 23. <i>Methanobacterium formicicum</i> 45°C	Figura 24. <i>Methanobacterium formicicum</i> 55°C	Figura 25. <i>Methanobacterium formicicum</i> 65°C
		
Figura 26. <i>Methanobacterium ivanov</i> a 45°C	Figura 27. <i>Methanobacterium ivanov</i> a 55°C	Figura 28. <i>Methanobacterium ivanov</i> a 65°C
		
Figura 29. <i>Methanobacterium wolfeii</i> 45°C	Figura 30. <i>Methanobacterium wolfeii</i> 55°C	Figura 31. <i>Methanobacterium wolfeii</i> 65°C
		
Figura 32. <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> 45°C	Figura 33. <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> 55°C	Figura 34. <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> 65°C

a) *Methanobacterium formicicum*

La especie *Methanobacterium formicicum* prolifera únicamente a dos temperaturas, 45 y 55°C. A 45°C, presenta las siguientes características físicas: colonias con un tamaño de 0.3 cm diámetro, con apariencia esférica, de color blanco, se desarrollan en la parte superior del agar, muestran pocas agrupaciones bien definidas. Esto se observa en la Figura 23. Mientras que las colonias a 55°C miden 0.5 cm de diámetro, color blanco, su desarrollo se llevó a cabo en la superficie del agar. Están en formas aisladas y dispersas, bien definidas. Lo antes mencionado se presenta en la Figura 24. Por último, no hay desarrollo de colonias a 65 °C, lo cual se observa en la Figura 25. Estos resultados indican que, a 55°C, las bacterias obtienen su máxima proliferación y desarrollo. Esto se comprueba debido a la presencia de especies con mayor diámetro.

b) *Methanobacterium ivanov*

Las colonias que forman la especie *Methanobacterium ivanov*, presentan un tamaño aproximado de 0.05 cm de diámetro, apariencia plana en forma redonda, poseen un color amarillo claro, consistencia pegajosa. Su desarrollo se lleva a cabo en la profundidad del agar. Estos significan que dicha colonia se introducen para seguir desarrollándose. La especie sólo se encuentra a 45°C, como se muestra en la Figura 26. A las temperaturas de 55 y 65°C, no se observó proliferación, debido a que dicha especie no resiste temperaturas superiores a 45°C, según lo reportado, observado y comprobado en esta investigación (Figuras 27 y 28, respectivamente).

c) *Methanobacterium wolfeii*

Las colonias de la *Methanobacterium wolfeii* se desarrollan a las tres temperaturas y comparten las siguientes características físicas: color amarillo intenso, miden 0.2 cm de diámetro, apariencia en forma de esfera, se desarrollan en la parte superior del agar. A la temperatura de trabajo de 45°C, las colonias se presentan aisladas, sin aglomeración, bien definidas, lo cual se puede observar en la Figura 29. En cuanto a las colonias a 55°C, se desarrollan en mayor cantidad, bien definidas, aisladas. Esto se muestra claramente en la Figura 30. Por último, a 65°C, las colonias se encuentran distribuidas uniformemente, sin agrupación, aisladas, bien definidas, se observan en la Figura 31. Con lo antes mencionado se concluye que, a 55°C, las colonias presentan un mayor desarrollo, pero el diámetro a las tres temperaturas es semejante infiriendo que la temperatura no interfiere este parámetro, sólo influye en la población de las bacterias.

d) *Desulfotomaculum nigrificans*

La última especie *Desulfotomaculum nigrificans*, pertenece a las sulfato-reductoras. Esta especie es la única que no prolifera a 45°C, como se muestra en la Figura 32. A las temperaturas de 55 y 65°C, la especie presenta colonias con las mismas características físicas: son de color café claro y se desarrollan en la superficie del agar. Sus características morfológicas cambian según la temperatura.

A 55°C, el tamaño de la colonia es de 0.2 cm y se desarrollan en forma aislada, mientras que, a 65°C, las colonias presentan un tamaño de 0.5 cm de diámetro, proliferan aisladas distribuidas uniformemente y sin agrupación. Esto se observa en las Figs. 33 y 34. Con los resultados anteriores se concluye que la temperatura óptima de desarrollo de dicha especie es de 65°C.

4.4.4.2 Cinética de proliferación (“crecimiento) de las especies

a) *Methanobacterium formicicum*

La especie *Methanobacterium formicicum* a 45°C, presenta una fase de latencia, que contiene 100 bacterias/mL. Dicha fase tiene una duración de 4 días. Al término de ésta, las bacterias empiezan a proliferar presentando la fase exponencial, la cual está formada por periodos. En cada uno de ellos se forma una nueva generación. En este caso se obtuvo un total de 6.08 generaciones. Cada generación se desarrolla en un tiempo de 27.6 h⁻¹. Para el día 9, aparece la fase estacionaria, con un total de 7100 bacterias/mL. Debido a que la siguiente cuantificación se realizó después de 4 días, no se observa detalladamente dicho periodo, obteniendo solamente un máximo. Al finalizar la fase estacionaria, desciende rápidamente la población bacteriana en un 59.15%, obteniendo para la fase endógena o de muerte un total de 4200 bacterias/mL, al día 15. Los valores cuantificados para cada día del experimento, así como el periodo y la generación, se presentan en las Tablas 26, 27 y 28. Estos resultados también se graficaron y se aprecian en la Gráfica 1.

La especie *Methanobacterium formicicum*, a 55°C, tiene un periodo de latencia de 2 días de duración. Dicha fase contiene 100 bacterias/mL. En el día 2 comienza la fase exponencial, que termina en el día 10. Durante esta fase, el total de organismos es de 21000 bacterias/mL, las cuales se desarrollaron durante 7.66 generaciones. Cada generación tardó en desarrollarse 34.46 h⁻¹. Esto se puede observar en la Tabla 27. Posteriormente, en el día 11 se presenta la fase estacionaria, con un total de 21100 bacterias/mL. La siguiente cuantificación se realizó en el día 14, descendiendo la población y así presentando la fase de muerte. En ésta existe una disminución de organismos del 33% con respecto a la fase estacionaria. La Gráfica 2 genera de los resultados que se presentan en la Tabla 26, mientras que las fases y generaciones se presentan en las Tablas 27 y 28.

b) *Methanobacterium ivanov*

La especie *Methanobacterium ivanov* sólo se desarrolló a 45°C, debido a que la temperatura es un factor limitante en su proliferación. Dicha especie presenta una fase de latencia con una duración de 4 días, la cual contiene 100 bacterias/mL. En el día 4 empiezan a desarrollarse formando la fase exponencial, la cual termina en el día 13, obteniendo un valor de 37700 bacterias/mL. En esta fase se reproducen un total de 8.50 generaciones. Cada generación tardó en desarrollarse 33.88 h⁻¹. Posteriormente, en el día 14 se obtuvo la fase estacionaria, que contiene 37800 bacterias/mL y, finalmente, durante el día 15 se observa una rápida disminución, presentando así la fase de muerte, en la cual existe una disminución de los organismos del 77.2%. Dichos datos se pueden consultar en las Tablas 26, 27, 28, al igual que en la Gráfica 3.

c) *Methanobacterium wolfeii*

Las colonias pertenecientes a la especie *Methanobacterium wolfeii*, a 45°C, presentan su fase de latencia durante los días 1 y 2, en los cuales existen 100 bacterias/mL. La fase exponencial comienza al segundo día y termina su desarrollo en el día 9. Durante este periodo se reproducen 6.35 generaciones, en las cuales aparecen 8400 bacterias /mL. Por lo tanto, el tiempo que tarda cada generación para reproducirse y formar una nueva es de $41.57h^{-1}$. La fase estacionaria inicia el día 10, con un total de 8500 bacterias/mL. Al siguiente día se observó una decaída del 65%, iniciando la fase de muerte. Dicha fase tiene una duración de 5 días. Esto se observa en la Gráfica 4 y en la Tabla 27. Esta especie es la única que se encuentra a las tres temperaturas, siendo la de 45°C la que contienen menor cantidad de bacterias/mL, con un 17 % con respecto a las de 55 y 65°C. Lo antes mencionado se representa en la Tabla 26.

Methanobacterium wolfeii a 55°C, presenta un periodo de latencia de 2 días, con un total de 100 bacterias/mL. La fase exponencial inicia en el día 2 y finaliza en el día 11. Durante este tiempo existen 7.65 generaciones, que se reproducen a una velocidad de $31.41h^{-1}$, dando un total de 20700 bacterias/mL. Posteriormente, en el día 10 inicia la etapa estacionaria con un total de 21800 bacterias/mL. Dicha fase no tiene un periodo largo, ya que al siguiente día desciende en un 55.2%, llegando a la última fase, la cual tiene una duración de 5 días. Los resultados presentados se pueden verificar en las Tablas 26, 27 y 28.

La última especie, perteneciente al género *Methanobacterium wolfeii* a 65°C, tiene una fase de latencia de 3 días, en la cual se presentan 100 bacterias/mL. La fase exponencial empieza en el día 2 hasta el día 5. Durante este tiempo se formaron 7.51 generaciones y cada una de éstas se reprodujo en $15.9 h^{-1}$, lo cual significa que al término de dichas generaciones se formaron 19900 bacterias/mL. En esta especie se observó que, a mayor temperatura, el tiempo de generación era más rápido, obteniendo una mayor cantidad de bacterias. Para el día 5 comienza la fase estacionaria que contiene 19100 bacterias/mililitro. El tiempo de esta fase es muy corto, obteniéndose un máximo que se puede ver en la Gráfica 6. Las bacterias empiezan a morir al siguiente día con un descenso del 15% y, al llegar al séptimo día, se había perdido un 31% de la población cuantificada en la fase estacionaria, quedando solamente con 6000 bacterias /mL, tal como se observa en la Tabla 26. Se debe tener en cuenta que la última fase sólo duró 2 días, debido a que el medio de cultivo fue afectado por dos factores limitantes, la temperatura y el sustrato, presentando una deshidratación como resultado del primero y una disminución de las bacterias por la falta de sustrato.

d) *Desulfotomaculum nigrificans*

La especie perteneciente a la sulfato reductoras *Desulfotomaculum nigrificans* a 45°C tiene una duración de la fase de latencia de solamente 1 día, ya que al segundo día comienza la fase exponencial en la que prolifera hasta el día 11. Durante ese periodo se presentan 6.76 generaciones, las cuales tiene un tiempo para reproducirse de 42.60h^{-1} , dando un total de 11200 bacterias /mL. Al término de esta fase se observa un estancamiento, al cual se le llama fase estacionaria, que empieza en el día 11 con un total de 11300 bacterias/mililitro. Dicho proceso no se percibe adecuadamente en la Gráfica 7, ya que esta fase se desarrolla en un tiempo menor que el cuantificado, haciendo notar rápidamente la fase de muerte, ya que al siguiente día se presenta un declinamiento rápido del 66.3 %. Se encuentran los datos de esta investigación en el Tabla 26. La temperatura óptima de proliferación para esta especie está entre 55 y 65°C, teniendo en cuenta que el desarrollo óptimo de la especie de interés *Desulfotomaculum nigrificans*, obtienen un mayor desarrollo en dichas temperaturas. Esto se describirá en el siguiente párrafo.

Esta bacteria *Desulfotomaculum nigrificans* presenta a 65°C un desarrollo acelerado como se observa en el Gráfica 8, debido a la temperatura en la que se encuentra. Durante 2 días se establece fase de latencia, en la cual se tienen 100 bacterias /mL. Después de esta fase se adquiere un acelerado desarrollo, en la llamada fase exponencial, en la cual se forman 7.25 generaciones. Cada una de éstas se reproducen los organismos en un tiempo de 19.86h^{-1} , dando un total de 15800 bacterias/mL, en el día 5. La fase estacionaria tiene una duración de 1 día, comienza el día 6 y el día 7 termina con 15900 bacterias/mL. Esto se observa en la Gráfica 8. Inmediatamente se produce un decaimiento de la población al siguiente día con el 70.45%. Por lo tanto, dicha especie tienen un periodo de vida corto. Dicha especie tuvo a 55 y 65°C una proliferación mayor que a 45°C pero, debido al desarrollo de las bacterias, el medio de cultivo se fue agotando más rápidamente, consumiendo el alimento y, por lo tanto, terminando con el tiempo de vida de ellas. Además, la temperatura influyó para que el agar se deshidratara, finalizando en el día 7.

Tabla 25. Desarrollo de las especies del medio de cultivo selectivo

Temperatura	45°C			55°C			65°C	
	bacterias /mL			bacterias /mL			bacterias /mL	
Día	<i>Mf</i>	<i>Mi</i>	<i>Mw</i>	<i>Mf</i>	<i>Mw</i>	<i>Dn</i>	<i>Mw</i>	<i>Dn</i>
0	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	200	100	100	400	100	100
2	100	100	1000	n.c	600	n.r	800	1300
3	100	100	2500	1000	n.r	1500	1700	3500
4	800	500	4200	5700	1500	3700	5900	9200
5	2100	2000	4500	7600	5300	4000	19100	11200
6	2700	n.r	n.r	n.r	9800	n.r	16200	15900
7	3600	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r	6000	11200
8	6000	7200	5600	10300	n.r	6100	n.c	n.c
9	7100	13100	7200	10000	13600	6300	n.c	n.c
10	n.r	14600	8500	14900	20800	7700	n.c	n.c
11	n.r	n.r	7100	21100	19400	11300	n.c	n.c
12	n.r	n.r	n.r	n.r	13600	7500	n.c	n.c
13	n.r	22700	n.r	n.r	n.r	n.c	n.c	n.c
14	5000	37800	5000	12000	n.r	n.c	n.c	n.c
15	2900	29200	2900	6900	9300	n.c	n.c	n.c

n.c.= No cuantificadas debido a que el agar fue consumido, por las bacterias y secado debido a la temperatura; n.r = No registrada; *Mf* = *Methanobacterium formicicum*; *Mi*= *Methanobacterium ivanov*; *Mw*= *Methanobacterium wolfeii*; *Dn*= *Desulfotomaculum nigrificans*

Tabla 26. Cinética de proliferación (“crecimiento”)

Temperatura	45°C			55°C			65°C	
	bacterias /mL			bacterias /mL			bacterias /mL	
Fase	<i>Mf</i>	<i>Mi</i>	<i>Mw</i>	<i>Mf</i>	<i>Mw</i>	<i>Dn</i>	<i>Mw</i>	<i>Dn</i>
latencia	100	100	100	100	100	100	100	100
Exponencial	7000	37700	8400	21000	20700	11200	19000	15800
Estacionaria	7100	37800	8500	21100	20800	11300	19100	15900
Muerte	4200	8600	5600	14200	11500	3800	13100	4700

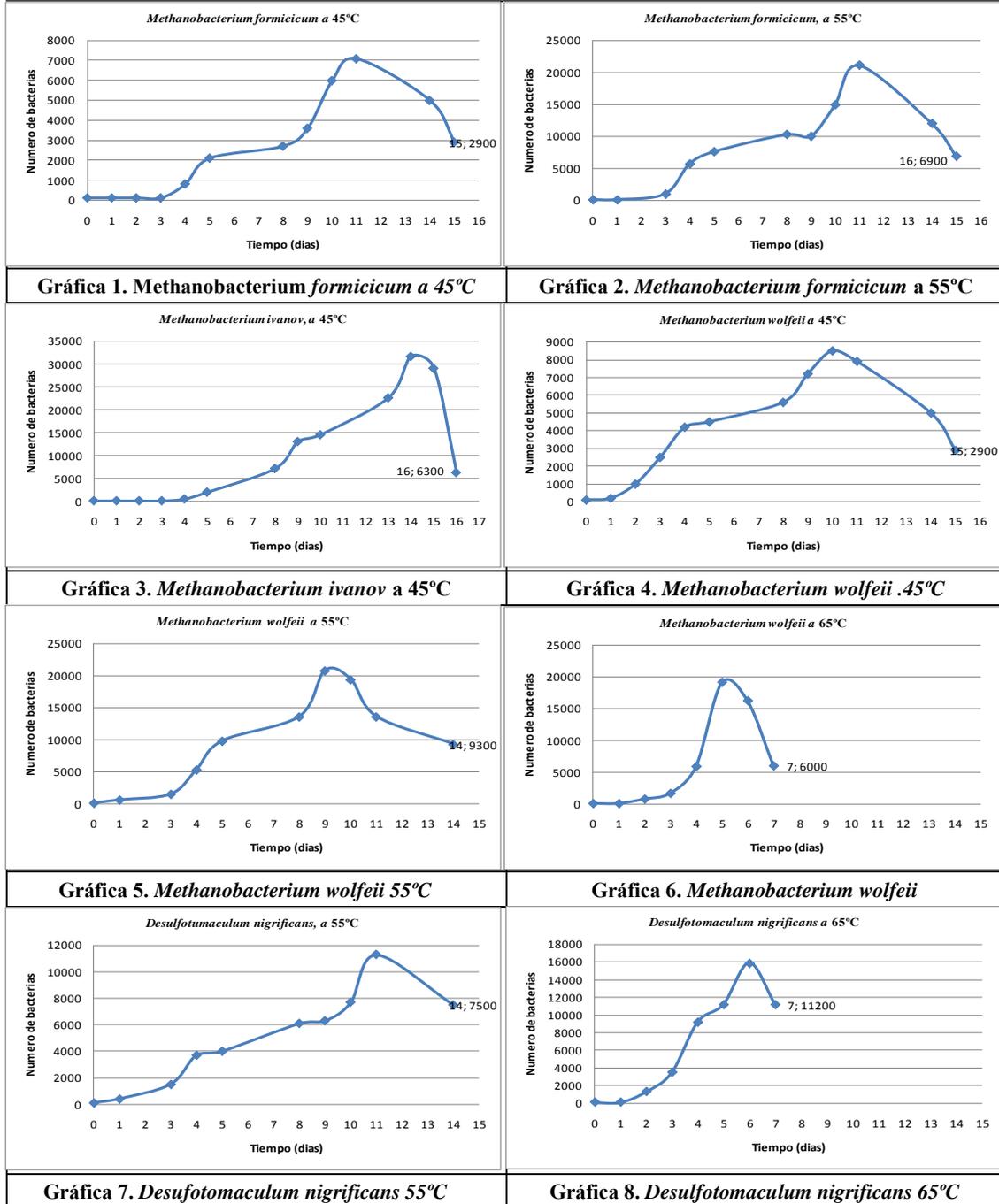
Mf = *Methanobacterium formicicum*; *Mi*= *Methanobacterium ivanov*; *Mw*= *Methanobacterium wolfeii*; *Dn*= *Desulfotomaculum nigrificans*

Tabla 27. Tiempo de generación en la fase exponencial

Temp.	45°C			55°C			65°C	
	<i>Mf</i>	<i>Mi</i>	<i>Mw</i>	<i>Mf</i>	<i>Mw</i>	<i>Dn</i>	<i>Mw</i>	<i>Dn</i>
n	6.08	8.50	6.35	7.66	7.64	6.76	7.51	7.25
G	27.6 h ⁻¹	33.88 h ⁻¹	41.57 h ⁻¹	34.46 h ⁻¹	31.41 h ⁻¹	42.60 h ⁻¹	15.9 h ⁻¹	19.86 h ⁻¹

n= Numero de generaciones durante la fase exponencial; G= Tiempo para que una generación crezca

Tabla 28 Gráficas del medio de cultivo selectivo, durante 15 a 17 días



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

De acuerdo con el objetivo planteado, de identificar y cuantificar bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras que se encuentran en reactores tipo RALLFA a 45, 55 y 65°C alimentados con vinazas de caña de azúcar, se puede concluir lo siguiente:

El medio de cultivo general citado por Bryant *et al.* (1978), es el óptimo para obtener un desarrollo de las BM y BSR, a partir de la inoculación de 1 mL de lodo proveniente de cada RALLFA a las tres temperaturas de trabajo 45, 55 y 65°C.

De las diluciones realizadas para obtener características morfológicas definidas aisladas y sin agrupaciones de lodo del RALLFA a 45°C, las características deseadas se obtuvieron en la dilución 10^{-2} .

Al obtener la dilución deseada e inocular nuevamente con el mismo fin del punto anterior, a las tres temperaturas de trabajo, para los grupos metanogénicos y sulfato-reductores propuestos por Balch *et al.* (1979) y Flaherty *et al.* (1998), respectivamente, se presentaron desarrollos adecuados para las BM y las BSR a las tres temperaturas con un periodo de incubación de 30 días, presentando características para cada uno de los grupos que corresponden a lo citado por los autores señalados anteriormente y que estudiaron a las BSR y BM.

La cuantificación de las BM y BSR, que se calculó mediante el NMP de Girard y Rougieux (1964), empleando medios de cultivo específicos a las tres temperaturas de trabajo, durante 30 días, permitieron cuantificar 150000 BM/mL a 45°C, mientras que de las BSR, solamente se cuantificaron 200 bacterias/mL. A 55°C, las BM contadas fueron 15000000 bacterias/mL, en comparación de las BSR de las que se obtuvieron 12000 bacterias/mL. Esto estableció que en ambas temperaturas, había un mayor número de BM que de BSR. En el RALLFA a 65°C había 4600 BM/mL y 11000 BSR /mL. Por lo tanto, a 65°C, las BM presentan un descenso en su población, debido a que la temperatura inhibe su crecimiento y las BSR comienzan a reproducirse ya que se desarrollan a temperaturas mayores de 55°C. Esto resulta muy interesante ya que en estudios anteriores, realizados con el mismo tipo de vinazas, pero solamente a 35, 45 y 55°C, se planteaba la idea de trabajar a temperaturas más elevadas para tener una mayor productividad de metano (Castro-González *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en esta investigación y respaldados por otros investigadores hacen patente que, si el propósito final de estos reactores es la producción de metano, no debe excederse la temperatura de proceso de 55°C.

El aislamiento de las especies en estudio: *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium ivanov*, *Methanobacterium wolfeii* *Desulfotomaculum nigrificans* se llevó a cabo mediante cultivos selectivos para cada especie en placa, usando medios de cultivo específicos para BM y BSR.

La especie *Methanobacterium formicicum*, citada por los autores Belyaev *et al.* (1983); Boone (1989); Boone *et al.* (1986); Bryant y Wolis (1975) y Bryant *et al.* (1971, 1967), presenta características similares a lo referido en esta investigación, a 45 y 55°C. Debido a las características morfológicas obtenidas en este estudio y por los autores citados se presume que la especie es justamente *Methanobacterium formicicum*. A 65°C no presentó desarrollo.

La *Methanobacterium ivanov*, mencionada por los autores Jain *et al.* (1987); Kneifel *et al.* (1986) y König (1984), solamente se desarrolló a 45°C, obteniendo con esto las características propias de la especie en estudio. Esto confirmó su identificación. A 55°C y 65°C no se observó desarrollo.

La especie *Methanobacterium wolfeii* descrita por los autores Winter *et al.* (1987) y Zellner *et al.* (1989), la cual fue la única que apareció a las tres temperaturas. Las características observadas y citadas bibliográficamente son similares y, por este motivo, se presume que es la especie en estudio.

Y, por último, la *Desulfotomaculum nigrificans* posee características distintivas como lo reafirma la referencia bibliográfica de Flaherty *et al.* (1998); siendo éstas, las formas propias de las bacterias encontradas en esta investigación, lo que confirma la presencia de *Desulfotomaculum nigrificans*.

En el caso de la caracterización por colonias, las *Methanobacterium formicicum* que aparecen únicamente a dos temperaturas, 45 y 55°C tienen características similares, y a 65°C, no hay crecimiento. Para la *Methanobacterium ivanov*, sólo se encuentra a 45°C. La especie *Methanobacterium wolfeii*, fue la única que estuvo presente a las tres temperaturas, obteniendo colonias con las mismas características. Y, por último, la *Desulfotomaculum nigrificans* solamente se desarrolló a 55 y 65°C, con características físicas similares. Lo antes mencionado permite concluir que, a 45 y 55°C, las colonias pertenecientes al género de las *Methanobacterium* presentan un mayor desarrollo y que, para las BSR, su proliferación se obtiene a partir de 65°C, lo que indica que la temperatura sí tiene un rol importante en la población específica de estas bacterias.

Los resultados de la cinética de proliferación (“crecimiento”) de cada una de las especies en estudio cuando alcanzaron la fase exponencial y tuvieron la mayor abundancia permiten concluir que la especie *Methanobacterium formicicum* tiene su valor máximo a 55°C (**21100** bacterias/mL), mientras que la especie *Methanobacterium ivanov* solamente aparece a 45°C con (**37800**) y la especie *Methanobacterium wolfeii* puede soportar las tres temperaturas en estudio, teniendo el valor más elevado a 55°C (**20800** bacterias/mL). Sin embargo, como la única especie estudiada *Desulfotomaculum nigrificans* del grupo de las sulfato reductoras encontradas, prolifera a partir de 55°C (**11300** bacterias/mL) y con mayor abundancia a 65°C (**15800** bacterias/mL), puede concluirse que, para promover la producción de metano, la temperatura máxima a la que debe operarse un reactor anaerobio debería ser 55°C.

5.2 Recomendaciones

Con objeto de identificar plenamente estas especies, se sugiere continuar los estudios, realizando identificaciones bioquímicas empleando el ADN de las bacterias.

Asimismo, será importante continuar con la identificación y cuantificación de otras especies metanogénicas y sulfato-reductoras.

Finalmente y, uno de los puntos más importantes desde el punto de vista tecnológico, es el de cuantificar la cantidad de metano que cada una de estas especies produce con objeto de ratificar fehacientemente, cuáles serían las mejores condiciones de operación de los reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente a escala industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahring B. 1994. Status on science and application of thermophilic anaerobic digestion. *Wat. Sci. Technol.* 30:241-249.
- Arias F. 2006. El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica. Quinta edición. Caracas. Edición episteme.
- Arias M.E., González-Pérez J.A., González-Vila F.J., Ball, A.S. 2005. Soil Health -A new challenge for microbiologists and chemists-. *International Microbiology.* 8:13-21.
- Aron M., Grasse P. 1969. Biologie animale. En *Précis de Biologie Animale*. Masson et Cie. París, Francia. Pp. 1413-1460.
- 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.
- Bautista-Zúñiga F., Durán-de-Bazúa C., Reyna-Trujillo T., Villers-Ruiz L. 2000a. Agroindustrial organic residues: Handling options in canesugar processing plants. *Sugar y Azúcar*, 95(9):32-45.
- Bautista-Zúñiga F., Reyna T., Villers L. y Durán C. 2000b. Mejoramiento de suelos agrícolas usando aguas residuales agroindustriales. Caso: Vinazas crudas y tratadas. Serie: Química ambiental del suelo. Vol. 1. Primera Edición. PIQAYQA, Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.
- Bello-Cabrera A., Cruz-Juárez J.A., Álvarez-Ignacio J.C., Rincón-Acelas I.R., Durán-de-Bazúa C. 2008. Estabilización de tres reactores anaerobios termofílicos que transforman residuos carbonosos en metano / *Stabilization of three anaerobic thermophilic reactors that convert organic pollutants into methane*. Presentado en Fifth International Minisymposium on Removal of Contaminants from Wastewaters, Atmosphere, and Soils. Noviembre 5-8. México D.F. México.
- Belyaev S., Kondufora V., Mikhajlov E. 1987. Methane production and consumption monitored by stable H and C isotope ratios at a crude oil spill site, Bemidji, Minnesota 77:135-151.
- Belyaev S., Wolkin R., Kenealy M., Deniro J., Epstein S., Ziekus G. 1983. Methanogenic bacteria from the Bondyuzhskoe oil field: General characterization and analysis of stable-carbon isotopic fractionation. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:691-697.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 2005. The Williams and Wilkins Co. 8a ed. 4:20-105. Baltimore, EEUU.
- Bhatnagar S., Betrán F.J. 1984. Agronomic performance, aflatoxin accumulation and protein quality of subtropical and tropical QPM hybrids in southern EEUU. *Maydica* 48:113-124.
- Boone D., Whitman W., Rouviere P. 1989. Diversity and taxonomy of methanogens. En *methanogenens: Ecology, Biochemistry and Genetics*. Ed. Ferry J, Chapman and Hall. New York, EEUU. Pag.35-81.
- Boone D., Worakit S., Mathrani I., Mah R. 1986. Alkaliphilic methanogens from high-pH lake sediments. *Syst. Appl. Microbiol.* 7:230-234.
- Brock M., Madigan 1993. *Microbiología*. Prentice Hall. Baltimore, EEUU. Pp. 40-72.
- Brown J., Doolittle W. 1995. Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU.* 92: 2441-2445.

- Bryant M., Tzeng S., Robinson I., Joyner A. 1971. Nutrient requirements of methanogenic bacteria. En *Advances in Chemistry Series*, 105:23-40. American Chemical Society. Washington, D.C. EEUU.
- Bryant M., Wolin, M. J. Wolin, and R. S. Wolfe. 1967. *Methanobacterium omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 59:20-31.
- Bryant, M. 1978. Methane-producing bacteria. In R. E. Buchanan and N. E. Gibbons (Ed.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eighth Ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore. Pp. 472
- Bryant, M., Wolin J. 1975. Rumen bacteria and their metabolic interactions. In T. Hasegawa (Ed.) *Proc of the First Intersectional Congress of the Intern. Assoc. Microbiol. Soc* Developmental Microbiology, Ecology. Science Council of Japan, Tokyo. Vol. 2, Pp. 297
- Burgess A; Wagner I; Wiegel J. 2007. Thermal Environments and Biodiversity. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles.* 2:130-290.
- Campbell L., Frank H., Hall E. 1957. Studies on thermophilic sulfate-reducing bacteria. I. Identification of *Sporovibrio desulfurcans* as *Clostridium nigrificans*. *Bacteriol. Rev.* 73:516-521.
- Campbell L.L., Postgate J.R. 1965. Classification of the sporeforming sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol. Rev.* 29:359-363.
- Campos P. 2001. Optimización de la “digestión anaerobia”⁴ de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía, Universidad de Lleida, 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. ProGramma de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas (Ingeniería Química). México D.F., México. Pp. 81-85.
- Castro-González A., Bernal-González M., Durán-de-Bazúa C. 2004. Tratamiento de vinazas de plantas destiladoras de alcohol usando consorcios microbianos anaerobios. *Bebidas Mexicanas*, 13(3):12-14, 16-20, 22-25.
- 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 Arny 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. 2001a. Adaptación de biomasa anaerobia a un nuevo substrato en un reactor anaerobio de lecho de lodos. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)*, 16(1):49-55.
- Castro-González A., Durán-de-Bazúa C. 2001b. Estabilización de un reactor anaerobio para el tratamiento de vinaza a condiciones mesofilicas. Presentado en la XLI Convención

⁴ La digestión es un proceso inherentemente anaerobio, por lo que decir “digestión anaerobia” es un pleonasma. Desafortunadamente, muchos libros de texto, eventos técnico-científico-tecnológicos y artículos en revistas lo usan en forma equivocada

- Nacional del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos. Puebla, Pue., México. P. 66. Pub. IMIQ. México D.F. México.
- Castro-González A., Durán-de-Bazúa C. 2002. Procesos de separación: Aplicaciones para la cuantificación de biogases producidos en reactores anaerobios. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)*, 17(2):84-94.
- CEPAL. 1998. *América Latina y el Caribe. Políticas para mejorar la inserción en la economía mundial*. Comisión Económica para América Latina y el Caribe. 2a edición revisada y actualizada. Fondo de Cultura Económica. Santiago de Chile, Chile.
- Chatton E. 1938. Sûr un mécanisme cinétique nouveau. La mitose syndinienne chez les Péridiniens parasites plasmodiaux. *CR Hebd Seances Acad. Sci. Ser. Nat. Paris*. 177:859-861
- Datagro. 2006. Servicios informativos para la industria del azúcar y el alcohol. Brasilia, Brasil. <http://www.datagro.com/r-home.php>
- Díaz B., Espitia S., Molina F. 2002. Digestión “anaerobia”, una aproximación a la tecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Durán C., Medellín P., Noyola A., Poggi-Varaldo H., Zedillo LE. 1988. Caracterización de vinazas y su degradación en un sistema combinado de tres reactores anaerobios y un reactor aerobio de biodiscos. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)*, 3(2):33-43.
- Durán C., Noyola A., Poggi H., Zedillo LE. 1994a. Water and energy use in sugar mills and ethyl alcohol plants. En *Efficient Water Use*. Eds. H. Garduño-Velasco, F. Arreguín-Cortés. Pub. UNESCO-ROSTLAC. ISBN 92-9089-340-0. Montevideo, Uruguay. Pp. 361-370.
- Durán C., Noyola A., Poggi H., Zedillo LE. 1994b. Uso del agua y la energía en ingenios azucareros / alcohólicos. En *Uso eficiente del agua*. Eds. H. Garduño-Velasco, F. Arreguín-Cortés. Pub. UNESCO- ROSTLAC. ISBN 92-9089-045-2. Montevideo, Uruguay. Pp. 361-370.
- Durán-de-Bazúa C. (Responsable global). 1994. Aplicaciones de la biotecnología en la agroindustria de la caña de azúcar. *Rev. IMIQ*. 35(9):18-25.
- Durán-de-Bazúa C., Noyola A., Poggi-Varaldo H., Zedillo L.E. 1994a. Biodegradation of process industry wastewater. Case problem: Sugarcane industry. En *Biological Degradation of Wastes*. Ed. A. M. Martin. Cap. 17. Elsevier Science Pub. Ltd. ISBN 1-85166-635-4. Londres, Inglaterra. Pp. 363-388.
- Durán-de-Bazúa C., Noyola-Robles A., Poggi-Varaldo H., Zedillo-Ponce-de-León L.E. 1994b. Paquete tecnológico para tratar vinazas de ingenios azucareros alcohólicos: sistema anaerobio/aerobio. *Rev. IMIQ*. 35(8):42-47.
- Espinel C. 2005. La cadena de azúcar en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia.
- Fang H., Chen T., Chui H. 1996. Degradation of phenol in wastewater in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Res.* 30(6):1353-1360.
- Ferry J. 1992. Methane from acetate. *Minireview. J. Bacteriol.* 174(17):5489-5495.
- 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.
- Forterre Y, Pouliquen O. 2002. Stability analysis of rapid granular chute flows: formation of longitudinal vortices. *J. Fluid Mech.* 467:361–387.

- García I., Bonilla J., Jiménez P., Ramos E. 1997. Biodegradation of phenol compounds in vinasses using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Wat. Res.* 31(8):2005-2011.
- Girard H., Rougieux R. 1964. Técnicas de microbiología agrícola, Acribia, Zaragoza, España. Pp 267-308.
- Griffin M., McMahon K., Mckie R., Lutgarde R. 1998. Methanogenic populations dynamics during star-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. *Biotechnol. Bioeng.* 57(3):342-355.
- Haeckel E. 1866. *Generelle Morphologie der Organismen. Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformierte Deszendenz-Theorie. Band I: Allgemeine Anatomie der Organismen.* Georg Reimer. Berlín, Alemania.
- Hilton B., Oleszkiewicz. J. 1988. Sulphide-induced inhibition of anaerobic digestion, *J. Environ. Eng.* 114:1377-1391.
- Hulshoff Pol L., Lens P., Stams A., Lettinga G. 1998. Anaerobic treatment of sulphate-rich waste waters. *Biodegradation.* 9(3-4):213-224.
- Incauca. 2006. El ingenio de Colombia. Proceso productivos a partir de la caña de azúcar. Cali, Valle del Cauca, Colombia. <http://www.incauca.com/>
- Isa Z., Grusenmeyer S., Verstraete, W. 1986. Sulfate reduction relative to methane production in high-rate anaerobic digestion: Microbiological aspects. *Appl. Environm. Microbiol.* 56(1):580-587.
- Jain M., Conway M., Thiele J., Zeikus J. 1987. Microbial composition and characterization of prevalent methanogens and acetogens isolated from syntrophic methanogenic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:210-232.
- Jiménez L. 2006. Conocimientos fundamentales de biología. Volumen 1. Pub. UNAM. México D.F. México. Pág. 34-72
- Jiménez-Ambriz 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 Mexico 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 Quim. Amb. 83 pags. Facultad de Química, UNAM. México D.F. México.
- Klemps R., Cypionka H., Widdel F. and Pfenning N. 1985. Growth with hydrogen and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. *Arch. Microbiol.*, 143:203-208.
- Klomp E., Clancy J., Durán-de-B. C. 1995. Contaminación de aguas y uso de la energía en la industria azucarera. Una comparación entre México y Holanda. *Rev. IMIQ.* 36(3):7-26.
- Kneifel H., Stetter K., Andreesen J., Wiegel J., König H., Schoberth S. 1986. Distribution of polyamines in representative species of archaebacteria. *System. Appl. Microbiol.* 7:241-245.
- König H. 1984. Isolation and characterization of *Methanobacterium uliginosum* sp. Nov. from a marshy soil. *Can. J. Microbiol.* 30:1477-1481.
- König H., Nüsser E. and Stetter K. 1985. Glycogen in *Methanlobus* and *Methanococcus*. *Microbiol. Lett.* 28: 265-269

- Lens P., Omil F., Lema J., Hulshoff Pol L. 2000. Biological treatment of organic sulfate-rich wastewaters: In Environmental technologies to treat sulfur pollution principles and engineering. Publishing. London. Pp.153-173.
- Lens P., Visser A., Janssen A., Hulshoff Pol L., Lettinga G. 1998. Biotechnological treatment of sulfate-rich wastewaters. Crit. Rev. Environm. Sci. Technol. 28(1):41-81
- Magingo F., Stumm C. 1991. Nitrogen fixation by *Methanobacterium formicicum*. FEMS Microbiol. Lett. 81(3):273-277.
- Maidak B., Olsen G., Larsen R., Woese C.1996. The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic Acid Res* 24, 82±85.
- Manual Azucarero Mexicano. 2008. Pub. Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcoholera. México D.F. México.
- Manuelita, S.A. 2006. División azúcar refinada y alcohol. Proceso productivo. Grupo Empresarial Manuelita. Cali, Colombia. <http://www.manuelita.com/html/sitio/index.php>
- Margot J., Demers W., Hardison R. 1986. Complete nucleotide sequence of the rabbit p-like globin gene cluster analysis of intergenic sequences and comparison with the human P-like globin gene cluster. J. Mol. Biol. 205:15-40.
- McCartney D., Olezkiewicz J. 1991. Sulphide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. Wat. Res., 25:203-209.
- McCarty P. 1982. Anaerobic waste treatment fundamentals. Public Works. 95:107-112.
- Minami K., Oamura K., Ogawa S. y Naritomi T. 1991. Continuous anaerobic treatment of wastewater from a kraft pulp mill. J. Ferment. Bioeng., 71:270-274.
- Muñoz-Valero J., Ortiz- Cañavate J., Vázquez-Minguela J. 1987. Técnica y aplicaciones agrícolas de las biometanización. Serie Técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España.
- Nimbalkar D. 2005. Distillery effluent treatment. Vasantdada Sugar Institute. Pune, India. <http://www.vsisugar.com/>.
- Norma mexicana. NMX-AA-42-1987. Calidad del agua determinacion del numero mas probable (nmp) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y escherichia coli presuntiva.
- Ohtsuki T., Watanabe M., Miyaji Y. 1994. Start-up of thermophilic UASB (upflow anaerobic sludge blanket) reactors using microcarrier and mesophilic granular sludge. Wat. Sci. Technol. 26(3-4):877-886.
- 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., 63:322-34.
- Olsen G., Woese C. 1993. Ribosomal RNA: A key to phylogeny. FASEB J., 7:113-123.
- Omil F., Bakker C., Hulshoff Pol L., Lettinga G. 1997. The effect of pH and low temperature shocks on the competition between sulphate reducing and methane producing bacteria in UASB reactors. Environ. Technol. 18:255-264.
- Omil F., Lens P., Hulshoff Pol L., Lettinga G. 1996. Effect of upward velocity and sulfide concentration on volatile fatty acid degradation in a sulphidogenic granular sludge reactor. Process Biochem. 31:699-710.
- Oude S., Visser B., Hulshoff Pol L., Stams A. 1994. Sulphate reduction in methanogenic bioreactors. FEMS Microbiology Reviews. 15:119-136.
- Pace N. 1997. Opening the door onto the natural microbial world: molecular microbial ecology. The Harvey Lectures Series. 91:59-78.

- Parkin G., Lynch W., Bhattacharya A. 1990. Interaction between sulphate reducers and methanogens fed acetate and propionate. Res. J. Water Pollut. Control. Fed. 62:780-788.
- Pascual A. 2005. Enfermedades de origen alimentario, prevención. Edit. Días Santos, España. Pág. 13-21
- Patel G., Nash B., Agnew A., Sprott G. 1990. Natural and electroporation-mediated transformation of *Methanococcus voltae*. Appl. Environ. Microbiol. 60:903-907.
- Patrón-Soberano, O. 2010. Comunicación personal. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. México D.F. México.
- Pavlostathis S., Giraldo E. 1991. Kinetics of anaerobic treatment. Wat. Sci. Technol. 24:35-59.
- Peral T. 1993. Introducción a la microbiología., Ed. Acribia. Mexico D. F. Mexico. Pp. 21-39.
- Postgate J., Campbell L. 1963. Identification of Coleman's sulfate-reducing bacterium as a mesophilic relative of *Clostridium nigrificans*. J. Bacteriol. 86:274-279.
- Ramírez G. 2006. Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química. Segunda edición. México D. F. Mexico. Pp. 5:20-55
- Rappé M., Giovannoni S. 2000. Phylogenetic comparisons of a coastal bacterio plankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. FEMS Microbiology Ecology. 33:219-232.
- Ravot G., Ollivier B., Magot M., Patel B., Crolet J., Fardeau M., Gracia J. 1995. Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order *Thermotogales*. Appl. Environ. Microbiol. 61:2053-2055.
- Rincón-Acelas I.R., Noyola-Robles A., Mijaylova-Nacheva P., Sánchez-Tovar S.A., Durán-Domínguez-de-Bazúa M.C. 2008. Estabilización de vinazas de caña usando reactores anaerobios y cálculo de la energía de activación del sistema / *Sugarcane vinasses stabilization using anaerobic reactors and determination of activation energy of system*. En XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS. Santiago de Chile, Chile. Octubre 12-15.
- 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.
- Rintala J., Sanz-Martin J., Lettinga G. 1991. Thermophilic anaerobic treatment of sulfate-rich pulp and paper integrated process water. Wat. Sci. Technol., 24:149-160.
- Rivera F., Rodríguez S., Warren A., Bonilla P., Ramírez E., Calderón A., Ortiz R. 1993. An investigation of the pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae from the root zone method of wastewater treatment. Water, Air & Soil Pollution, 69:93-98.
- Shi D., Forster O. 1993. An examination of the start-up of a thermophilic upflow sludge blanket reactor treating a synthetic coffee waste. Environ. Technol. 14:968-972.
- Shigeki U., Harada H. 1993. Microbial characteristics of methanogenic sludge consortia developed in thermophilic UASB reactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:654-660.
- Shin H., Jung J., Bae B and Paik B. 1995. Phase- separated anaerobic toxicity assays for sulphate and sulphide. Wat. Environ. Res., 67:802-806.
- Soto M., Mendez R and Lerma J. 1993. Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basic and experimental set up. Wat. Res., 27(8):1361-1376.

- Souillard N., Sibold L. 1986. Primary structure and expression of a gene homologous to *nifH* (nitrogenase Fe protein) from the archaeobacterium *Methanococcus voltae*. *Mol. Gen. Genet.* 203:21–28.
- Souza M., Fuzaro G., Polegato A. 1992. Thermophilic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. *Wat. Sci. Technol.* 25(7):213-222.
- Stanier R. 1970. Some aspects of the biology of cells and their possible evolutionary significance. In H. P. Charles y B. C. Knight (ed.), *Organization and control in prokaryotic cells*. Twentieth Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. Pp. 1-38.
- Stanier R., Van Niel A. 1962. The concept of a bacterium. *Arch. Mikrobiol.* 42:17-35.
- Unión Nacional de Cañeros AC-CNPR. 2006. Estadística de la agroindustria de la caña de azúcar 1997-2006. Comité Ejecutivo Nacional 2004-2007. México D.F. <http://www.caneros.org.mx/>
- Universidad Braunschweig, Alemania. 1994. Colección Alemana de Microorganismos. Departamento de Microbiología.
- Van Bruggen J, Zwartk B., Van Assema R., Stumm K., Vogels G. 1984. *Methanobacterium formicicum* and endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus* McMurrich. *Archives of Microbiology.* 139:1-7.
- Van Lier Y., Ten Brumelner E., Lettinga G. 1993. Thermo-tolerant anaerobic degradation of volatile fatty acids by digested organic fraction of municipal solid waste. *J. Ferment. Biotechnol.* 76(2):140-145.
- Visser B. 1995. The anaerobic treatment of sulfate-containing wastewater. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands (Países Bajos).
- Visser B., Beeksmá., Van der Zee A., Stams A., Lettinga G. 1993. Anaerobic degradation of volatile fatty acids at different sulfate concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:549-556.
- Visser B., Gao Y., Lettinga G. 1992. The anaerobic treatment of a synthetic sulfate containing wastewater under thermophilic (55°C) conditions. *Wat. Sci. Technol.* 25:193-202.
- Werkman C., Weaver H. 1927. Studies in the bacteriology of sulphur stinker spoilage of canned sweet corn. *Iowa State Coll. J. Sci.* 2:57-67.
- Whittaker R., Margulis L. 1978. Protist classification and the kingdoms of organisms. *Biosystems.*, 10, 3–18.
- Widdel F. 1998. Microbiology and ecology of sulphate and sulphur reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 17(4):261-271.
- Wiegant W. 1985. Thermophilic anaerobic digestion for wastewater treatment. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Países Bajos.
- Winter J., Lerp Z., Wildenauer K., Schindler K. 1985. *Methanobacterium wolfei*, sp. nov., a new tungsten-requiring, thermophilic, autotrophic methanogen. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1985, 5, 457-466.
- Winter J., Zellner G. 1987. Secondary alcohols as hydrogen donors for CO₂-reduction by methanogens. *FEMS Microbiol Lett* 44, 323±328.
- Woese C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51:221-227.
- Woese C., Kandler O., Wheelis M. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea* and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4576-4579.
- Woese C., Magrum L., Fox G. 1978. Archaeobacteria. *J. Mol. Evol.* 11(3):245–251.

- Worakit S., Boone D., Mah R., Abdel-Samie M. 1986. *Methanobacterium alcaliphilum* sp. nov., an H₂-utilizing methanogen that grows at high pH values. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36:380-382.
- Zehnder A. 1988. Biology of anaerobic microorganisms. In Ecological and applied microbiology. Wiley Series Ed. John Wiley and Sons. Agricultural University, Wageningen, Países Bajos.
- Zellner G., Alten C, Stackebrandt E., Winter J. 1989. Isolation and characterization of *Methanocorpusculum parvum* gen. nov., spec. nov., a new tungsten requiring, cocoid methanogen. *Arch. Microbiol.*, 147:13-20.

GLOSARIO

16S	Es un marcador molecular más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana
Ac	acetato
Ambiente aerobio	Que posee oxígeno disponible para las reacciones bioquímicas
Ambiente anaerobio	Que no posee oxígeno molecular para las reacciones bioquímicas
Ambiente anóxico	Que no tiene oxígeno molecular para las reacciones bioquímicas pero sí en forma de compuestos químicos (nitritos, nitratos, etc.)
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
Bd	Densidad de flotación
BM	Bacterias metanogénicas
BSR	Bacterias sulfato reductoras o sulfatorreductoras
Cys	Cisteína
<i>Dn</i>	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>
DQO_T	Demanda química de oxígeno total
DQO	Demanda química de oxígeno
DSM	Colección Alemana de Microorganismos por sus siglas en alemán
EI	extracto de levadura
for	formato

H₂	Hidrógeno molecular
iB	Isobutano
iP	Isopropano
Mf	<i>Methanobacterium formicicum</i>
Mi	<i>Methanobacterium ivanov</i>
Mw	<i>Methanobacterium wolfeii</i>
NH₃	amoníaco
OHPA	Siglas en inglés para las bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno (obligate hydrogen-producing acetogens)
PAB	Producto agrícola bruto
PIB	Producto interno bruto
RALLFA	Reactores anaerobios de lechos de lodos de flujo ascendente
Tm	Punto de fusión por sus siglas en inglés
To	Temperatura óptima
Letras griegas	
μ	Tasa de proliferación específica (dia ⁻¹)
Prefijo	
k	kilo

Anexos

Anexo A. Clasificación de las bacterias según Bergey's (2005)

Tabla A. 1 Clasificación actual del Dominio Bacteria del *Phylum Firmicutes* (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 2005)

Phylum XIII. Firmicutes
Class I. "Bacilli"
Order I. Bacillales
Family I. Bacillaceae
Genus I. <i>Bacillus</i> Genus II. <i>Alkalibacillus</i> Genus III. <i>Amphibacillus</i> Genus IV. <i>Anoxybacillus</i> Genus V. <i>Cerasibacillus</i> Genus VI. <i>Filobacillus</i> Genus VII. <i>Geobacillus</i> Genus VIII. <i>Gracilibacillus</i> Genus IX. <i>Halobacillus</i> Genus X. <i>Halolactibacillus</i> Genus XI. <i>Lentibacillus</i> Genus XII. <i>Marinococcus</i> Genus XIII. <i>Oceanobacillus</i> Genus XIV. <i>Paraliobacillus</i> Genus XV. <i>Pontibacillus</i> Genus XVI. <i>Saccharococcus</i> Genus XVII. <i>Tenuibacillus</i> Genus XVIII. <i>Thalassobacillus</i> Genus XIX. <i>Virgibacillus</i>
Family II. "Alicyclobacillaceae"
Genus I. <i>Alicyclobacillus</i>
Family III. "Listeriaceae"
Genus I. <i>Listeria</i> ^{AL} Genus II. <i>Brochothrix</i>
Family IV. "Paenibacillaceae"
Genus I. <i>Paenibacillus</i> ^{VP} Genus II. <i>Ammoniphilus</i> Genus III. <i>Aneurinibacillus</i> Genus IV. <i>Brevibacillus</i> Genus V. <i>Cohnella</i> Genus VI. <i>Oxalophagus</i> Genus VII. <i>Thermobacillus</i>
Family V. Pasteuriaceae
Genus I. <i>Pasteuria</i> ^{AL}
Family VI. Planococcaceae

Genus I. <i>Planococcus</i> ^{SAL}
Genus II. <i>Caryophanon</i>
Genus III. <i>Filibacter</i>
Genus IV. <i>Jeotgalibacillus</i>
Genus V. <i>Kurthia</i>
Genus VI. <i>Marinibacillus</i>
Genus VII. <i>Planomicrobium</i>
Genus VIII. <i>Sporosarcina</i>
Genus IX. <i>Ureibacillus</i>
Family VII. “ <i>Sporolactobacillaceae</i> ”
Genus I. <i>Sporolactobacillus</i> ^{SAL}
Family VIII. “ <i>Staphylococcaceae</i> ”
Genus I. <i>Staphylococcus</i> ^{SAL}
Genus II. <i>Jeotgalicoccus</i>
Genus III. <i>Macrococcus</i>
Genus IV. <i>Salinicoccus</i>
Family IX. “ <i>Thermoactinomycetaceae</i> ”
Genus I. <i>Thermoactinomyces</i>
Genus II. <i>Laceyella</i>
Genus III. <i>Mechercharimyces</i>
Genus IV. <i>Planifilum</i>
Genus V. <i>Seinonella</i>
Genus VI. <i>Shimazuella</i>
Genus VII. <i>Thermoflavimicrobium</i>
Family X. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Thermicanus</i>
Family XI. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Gemella</i>
Family XII. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Exiguobacterium</i>
Order II. “ <i>Lactobacillales</i> ”
Family I. <i>Lactobacillaceae</i>
Genus I. <i>Lactobacillus</i> ^{SAL}
Genus II. <i>Paralactobacillus</i>
Genus III. <i>Pediococcus</i>
Family II. “ <i>Aerococcaceae</i> ”
Genus I. <i>Aerococcus</i> ^{SAL}
Genus II. <i>Abiotrophia</i>
Genus III. <i>Dolosicoccus</i>
Genus IV. <i>Eremococcus</i>
Genus V. <i>Facklamia</i>
Genus VI. <i>Globicatella</i>
Genus VII. <i>Ignavigranum</i>
Family III. “ <i>Carnobacteriaceae</i> ”

Genus I. <i>Carnobacterium</i>
Genus II. <i>Alkalibacterium</i>
Genus III. <i>Allofustis</i>
Genus IV. <i>Alloiococcus</i>
Genus V. <i>Atopobacter</i>
Genus VI. <i>Atopococcus</i>
Genus VII. <i>Atopostipes</i>
Genus VIII. <i>Desemzia</i>
Genus IX. <i>Dolosigranulum</i>
Genus X. <i>Granulicatella</i>
Genus XI. <i>Isobaculum</i>
Genus XII. <i>Marinilactibacillus</i>
Genus XIII. <i>Trichococcus</i>
Family IV. “ <i>Enterococcaceae</i> ”
Genus I. <i>Enterococcus</i> ^{VP}
Genus II. <i>Melissococcus</i>
Genus III. <i>Tetragenococcus</i>
Genus IV. <i>Vagococcus</i>
Family V. “ <i>Leuconostocaceae</i> ”
Genus I. <i>Leuconostoc</i> ^{AL}
Genus II. <i>Oenococcus</i>
Genus III. <i>Weissella</i>
Family VI. <i>Streptococcaceae</i>
Genus I. <i>Streptococcus</i>
Genus II. <i>Lactococcus</i>
Genus III. <i>Lactovum</i>
Class II. “ <i>Clostridia</i> ”
Order I. <i>Clostridiales</i>
Family I. <i>Clostridiaceae</i>
Genus I. <i>Clostridium</i>
Genus II. <i>Alkaliphilus</i>
Genus III. <i>Anaerobacter</i>
Genus IV. <i>Anoxynatronum</i>
Genus V. <i>Caloramator</i>
Genus VI. <i>Caloranaerobacter</i>
Genus VII. <i>Camnicella</i>
Genus VIII. <i>Natronincola</i>
Genus IX. <i>Oxobacter</i>
Genus X. <i>Sarcina</i>
Genus XI. <i>Thermobrachium</i>
Genus XII. <i>Thermohalobacter</i>
Genus XIII. <i>Tindallia</i>
Family II. “ <i>Eubacteriaceae</i> ”
Genus I. <i>Eubacterium</i>

Genus II. <i>Acetobacterium</i> Genus III. <i>Alkalibacter</i> Genus IV. <i>Anaerofustis</i> Genus V. <i>Garciella</i> Genus VI. <i>Pseudoramibacter</i>
Family III. " <i>Gracilibacteraceae</i> "
Genus I. <i>Gracilibacter</i>
Family IV. " <i>Heliobacteriaceae</i> "
Genus I. <i>Heliobacterium</i> Genus II. <i>Heliobacillus</i> Genus III. <i>Heliophilum</i> Genus IV. <i>Heliorestis</i>
Family V. " <i>Lachnospiraceae</i> "
Genus I. <i>Lachnospira</i> Genus II. <i>Acetitomaculum</i> Genus III. <i>Anaerostipes</i> Genus IV. <i>Bryantella</i> Genus V. <i>Butyrivibrio</i> Genus VI. <i>Catonella</i> Genus VII. <i>Coprococcus</i> Genus VIII. <i>Dorea</i> Genus IX. <i>Hespellia</i> Genus X. <i>Johnsonella</i> Genus XI. <i>Lachnobacterium</i> Genus XII. <i>Moryella</i> Genus XIII. <i>Oribacterium</i> Genus XIV. <i>Parasporobacterium</i> Genus XV. <i>Pseudobutyrvibrio</i> Genus XVI. <i>Roseburia</i> Genus XVII. <i>Shuttleworthia</i> Genus XVIII. <i>Sporobacterium</i> Genus XIX. <i>Syntrophococcus</i>
Family VI. <i>Peptococcaceae</i>
Genus I. <i>Peptococcus</i> Genus II. <i>Cryptanaerobacter</i> Genus III. <i>Dehalobacter</i> Genus IV. <i>Desulfitobacterium</i> Genus V. <i>Desulfonispora</i> Genus VI. <i>Desulfosporosinus</i> Genus VII. <i>Desulfotomaculum</i> Genus VIII. <i>Pelotomaculum</i> Genus IX. <i>Sporotomaculum</i> Genus X. <i>Syntrophobotulus</i> Genus XI. <i>Thermincola</i>
Family VII. " <i>Peptostreptococcaceae</i> "

Genus I. <i>Peptostreptococcus</i> Genus II. <i>Filifactor</i> Genus III. <i>Tepidibacter</i>
Family VIII. " <i>Ruminococcaceae</i> "
Genus I. <i>Ruminococcus</i> Genus II. <i>Acetanaerobacterium</i> Genus III. <i>Acetivibrio</i> Genus IV. <i>Anaerofilum</i> Genus V. <i>Anaerotruncus</i> Genus VI. <i>Faecalibacterium</i> Genus VII. <i>Fastidiosipila</i> Genus VIII. <i>Oscillospir</i> Genus IX. <i>Papillibacter</i> Genus X. <i>Sporobacter</i> Genus XI. <i>Subdoligranulum</i>
Family IX. <i>Syntrophomonadaceae</i>
Genus I. <i>Syntrophomonas</i> Genus II. <i>Pelospora</i> Genus III. <i>Syntrophospora</i> Genus IV. <i>Syntrophothermus</i> Genus V. <i>Thermosyntropha</i>
Family X. <i>Veillonellaceae</i>
Genus I. <i>Veillonella</i> Genus II. <i>Acetonema</i> Genus III. <i>Acidaminococcus</i> Genus IV. <i>Allisonella</i> Genus V. <i>Anaeroarcus</i> Genus VI. <i>Anaeroglobus</i> Genus VII. <i>Anaeromusa</i> Genus VIII. <i>Anaerosinus</i> Genus IX. <i>Anaerovibrio</i> Genus X. <i>Centipeda</i> Genus XI. <i>Dendrosporobacter</i> Genus XII. <i>Dialister</i> Genus XIII. <i>Megasphaera</i> Genus XIV. <i>Mitsuokella</i> Genus XV. <i>Pectinatus</i> Genus XVI. <i>Phascolarctobacterium</i> Genus XVII. <i>Propionispira</i> Genus XVIII. <i>Propionispora</i> Genus XIX. <i>Quinella</i> Genus XX. <i>Schwartzia</i> Genus XXI. <i>Selenomonas</i> Genus XXII. <i>Sporomusa</i> Genus XXIII. <i>Succiniclasticum</i> Genus XXIV. <i>Succinispira</i>

Family XI. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Anaerococcus</i> Genus II. <i>Finegoldia</i> Genus III. <i>Gallicola</i> Genus IV. <i>Helcococcus</i> Genus V. <i>Parvimonas</i> Genus VI. <i>Peptoniphilus</i> Genus VII. <i>Sedimentibacter</i> Genus VIII. <i>Soehngenia</i> Genus IX. <i>Sporanaerobacter</i> Genus X. <i>Tissierella</i>
Family XII. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Acidaminobacter</i> Genus II. <i>Fusibacter</i> Genus III. <i>Guggenheimella</i>
Family XIII. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Anaerovorax</i> Genus II. <i>Mogibacterium</i>
Family XIV. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Anaerobranca</i>
Family XV. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Aminobacterium</i> Genus II. <i>Aminomonas</i> Genus III. <i>Anaerobaculum</i> Genus IV. <i>Dethiosulfovibrio</i> Genus V. <i>Thermanaerovibrio</i>
Family XVI. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Carboxydocella</i>
Family XVII. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Sulfobacillus</i> Genus II. <i>Thermaerobacter</i>
Family XVIII. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Symbiobacterium</i>
Family XIX. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Acetoanaerobium</i>
Order II. <i>Halanaerobiales</i>
Family I. <i>Halanaerobiaceae</i>
Genus I. <i>Halanaerobium</i> Genus II. <i>Halocella</i> Genus III. <i>Halothermothrix</i>
Family II. <i>Halobacteroidaceae</i>

Genus I. <i>Halobacteroides</i>
Genus II. <i>Acetohalobium</i>
Genus III. <i>Halanaerobacter</i>
Genus IV. <i>Halonatronum</i>
Genus V. <i>Natroniella</i>
Genus VI. <i>Orenia</i>
Genus VII. <i>Selenihalanaerobacter</i>
Genus VIII. <i>Sporohalobacter</i>
Order III. “ <i>Thermoanaerobacterales</i> ”
Family I. “ <i>Thermoanaerobacteraceae</i> ”
Genus I. <i>Thermoanaerobacter</i>
Genus II. <i>Ammonifex</i>
Genus III. <i>Caldanaerobacter</i>
Genus IV. <i>Carboxydothemus</i>
Genus V. <i>Gelria</i>
Genus VI. <i>Moorella</i>
Genus VII. <i>Thermacetogenium</i>
Genus VIII. <i>Thermanaeromonas</i>
Family II. <i>Thermodesulfobiaceae</i>
Genus I. <i>Thermodesulfobium</i>
Genus II. <i>Coprothermobacter</i>
Family III. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Caldicellulosiruptor</i>
Genus II. <i>Thermoanaerobacterium</i>
Genus III. <i>Thermosediminibacter</i>
Genus IV. <i>Thermovenabulum</i>
Family IV. <i>Incertae Sedis</i>
Genus I. <i>Mahella</i>
Class III. “ <i>Erysipelotrichi</i> ”
Order I. “ <i>Erysipelotrichales</i> ”
Family I. <i>Erysipelotrichaceae</i>
Genus I. <i>Erysipelothrix</i>
Genus II. <i>Allobaculum</i>
Genus III. <i>Bulleidia</i>
Genus IV. <i>Catenibacterium</i>
Genus V. <i>Coprobacillus</i>
Genus VI. <i>Holdmania</i>
Genus VII. <i>Solobacterium</i>
Genus VIII. <i>Turicibacter</i>

Anexo B

Tablas de números más probables de bacterias

Tabla B.1 Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos (Diluciones 10, 1 y 0.1g)

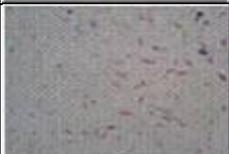
No. de tubos con reacciones positivas.			Índice del NMP Por 100 cm ³	Límite confiable de 95%	
3 tubos con 10 cm ³	3 tubos con 1 cm ³	3 tubos con 0.1 cm ³		Inferior	Superior
0	0	0	< 3		
0	0	1	3	< 0.5	9
0	1	0	3	< 0.5	13
1	0	0	4	< 0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800
3	3	3	≥ 2400		

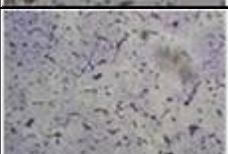
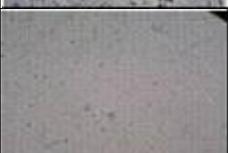
Referido de NMX-AA-42-1987

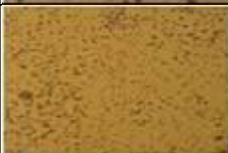
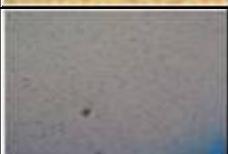
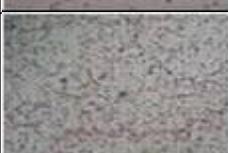
Anexo C

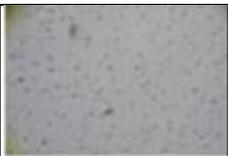
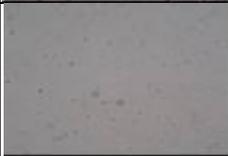
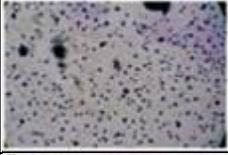
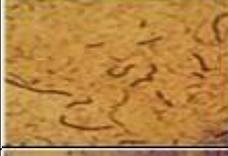
Características de los medios de cultivo a las tres temperaturas

Tabla C.1. Medio de cultivo para la actividad metanogénica y sulfato-reductora durante 30 días

Temp°C	Bacteria	Día	Descripción	Agrupación	Fotografía
45°C	BM	1	Cocos y bacilos rectos Gram negativos.	Cocos aislados, sin agrupación y bacilos aislados.	
45°C	BRS	1	Cocos Gram negativos	Poca proliferación de cocos	
45°C	BM	2	Cocos Gram negativos, y bacilos Gram positivos	Cocos en poca cantidad, y gran proliferación de bacilos aislados.	
45°C	BSR	2	Cocos Gram positivos, y bacilos alargados Gram negativos	Cocos en gran cantidad y poca proliferación de bacilos sin agrupación, aislados.	
45°C	BM	4	Cocos Gram positivos, y bacilos alargados Gram positivos	Cocos aislados sin agrupación y bacilos agrupados, bien definidos	
45°C	BSR	4	Cocos Gram positivos y bacilos cortos Gram negativos	Cocos en gran cantidad, aislados bien definidos, y poca cantidad de bacilos, aislados	
45°C	BM	5	Cocos Gram negativos y bacilos cortos Gram positivos	Poca proliferación de cocos y bacilos en mayor cantidad, agrupados.	
45°C	BSR	5	Cocos Gram negativos	Gran proliferación de cocos, aislados bien definidos.	
45°C	BM	6	Bacilos rectos, cortos y curvos Gram negativos.	Bacilos dispersos y aislados, proliferación abundante	

45°C	BSR	6	Cocos Gram negativos	Cocos aislados poco abundantes	
45°C	BM	7	Bacilos curvos Gram positivos y Cocos Gram positivos	Proliferación abundante de bacilos y poco desarrollo de cocos.	
45°C	BSR	7	Cocos Gram negativos, y bacilos Gram negativos.	Gran cantidad de cocos, agrupados, bien definidos y poca cantidad de bacilos aislados.	
45°C	BM	8	Cocos y bacilos Gram positivos	Cocos abundantes, y bacilos aislados, sin agrupaciones	
45°C	BSR	8	Cocos Gram negativos.	Cocos abundantes aislados.	
45°C	BM	11	Bacilos rectos y curvos Gram positivos y cocos Gram positivos	Bacilos aislados con gran proliferación y cocos sin agrupación en poca cantidad	
45°C	BSR	11	Cocos Gram negativos	Cocos agrupados en gran cantidad.	
45°C	BM	12	Cocos y bacilos Gram positivos	Cocos sin agrupación, Bacilos abundante crecimiento sin agrupación	
45°C	BSR	12	Cocos Gram negativos,	Cocos sin agrupación en gran cantidad	
45°C	BM	13	Cocos Gram positivos y bacilos Gram positivos en cadena,	Cocos aislados y bacilos con gran proliferación, aislados, bien definidos.	
45°C	BSR	13	Cocos Gram negativos y bacilos cortos Gram negativos	Gran proliferación de cocos, agrupados, y poca proliferación de bacilos, bien definidos	

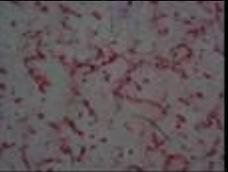
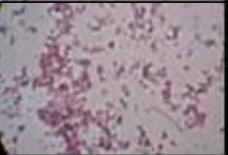
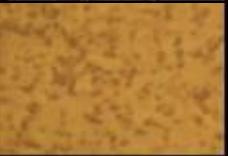
45°C	BM	14	Bacilos largos rectos, Gram positivos y cocos Gram positivos	Bacilos aislados, gran cantidad, y cocos aislados con poco desarrollo.	
45°C	BSR	14	Cocos Gram negativos	Gran cantidad de cocos, bien definidos.	
45°C	BM	15	Cocos Gram positivos y bacilos largos rectos, Gram positivos.	Gran proliferación, de bacilos, aislados, y cocos, aislados, sin agrupaciones	
45°C	BSR	15	Bacilos cortos, Gram negativos y cocos Gram negativos.	Gran cantidad de cocos, agrupados, y bacilos aislados en menor cantidad.	
45°C	BM	18	Bacilos largos rectos, Gram positivos y cocos Gram negativos	Bacilos agrupados en gran cantidad, bien definidos y cocos aislados en menor cantidad	
45 °C	BSR	18	Cocos Gram negativos.	Cocos, aislados, en gran cantidad.	
45°C	BM	19	Bacilos Gram positivos, en forma de vaina, alargada	Bacilos agrupados en Filamentos, abundantes, bien definidos, agrupados.	
45°C	BSR	19	Cocos Gram positivos y Gram negativos	Cocos aislados bien definidos, en gran cantidad	
45°C	BM	20	Cocos Gram negativos y bacilos cortos Gram negativos	Cocos aislados, poco crecimiento. Bacilos bien definidos, poco crecimiento.	
45°C	BSR	20	Bacilos largos rectos, Gram positivos. Cocos Gram positivos	Bacilos aislados, gran crecimiento. Y cocos poco crecimiento.	
45°C	BM	21	Cocos Gram negativos	Cantidades muy pequeñas casi no existen.	

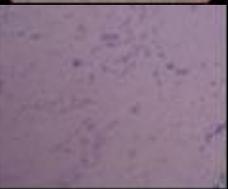
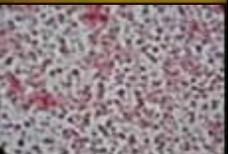
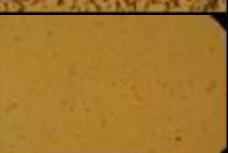
45°C	BSR	21	Cocos Gram positivos y bacilos largos rectos, Gram positivos.	Cocos, crecimiento abundante aislados estos se encuentran en mayor cantidad que los bacilos	
45°C	BM	22	Bacilos cortos Gram negativos y cocos Gram negativos.	Bacilos abundante crecimiento, aislados. Y cocos aislados en menor cantidad.	
45°C	BSR	22	Bacilos largos rectos, Gram positivos, Cocos Gram negativos	Bacilos agrupados en Filamentos, no muy abundantes, bien definidos. Cocos en abundancia en agrupación.	
45°C	BM	25	Cocos Gram negativos.	Aislados, poco crecimiento.	
45°C	BSR	25	Bacilos Gram positivos, en forma de vaina, alargada	Bacilos agrupados en Filamentos, abundantes, bien definidos, agrupados.	
45°C	BM	26	Cocos Gram positivos y Gram negativos	Cocos aislados bien definidos, en gran cantidad	
45°C	BSR	26	Cocos Gram negativos y bacilos cortos Gram negativos	Cocos aislados, poco crecimiento y bacilos bien definidos, poco crecimiento.	
45°C	BM	27	Bacilos largos rectos, Gram positivos. Cocos Gram positivos	Bacilos aislados, gran crecimiento. Y cocos poco crecimiento.	
45°C	BSR	27	Cocos Gram negativos	Cantidades muy pequeñas casi no existen.	
45°C	BM	28	Cocos Gram positivos. Bacilos largos rectos, Gram positivos.	Bacilos, crecimiento abundante aislados estos se encuentran en mayor cantidad que los cocos	
45°C	BSR	28	Bacilos cortos, Gram negativos. Cocos Gram negativos.	Bacilos abundante crecimiento, aislados. Y cocos aislados en menor cantidad.	

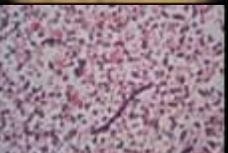
45°C	BM	29	Bacilos largos rectos, Gram positivos, y cocos Gram negativos	Bacilos agrupados en Filamentos, no muy abundantes, bien definidos. Cocos en abundancia en agrupación.	
45°C	BSR	29	Cocos Gram negativos.	Cocos aislados, poco crecimiento.	
45°C	BM	30	Bacilos Gram positivos, en forma de vaina, alargada	Bacilos agrupados en Filamentos, abundantes, bien definidos, agrupados.	
45°C		30	Cocos Gram positivos y Gram negativos	Cocos aislados bien definidos, en gran cantidad	

Tabla C.2. Medio de cultivo para la actividad metanogénica y sulfato-reductora durante 30 días

Temp° C	Bacteria	Día	Descripción	Agrupación	Fotografía
55	BM	1	Cocos y bacilos Gram negativos.	Poca cantidad cocos, y bacilos aislados.	
55	BSR	1	Cocos Gram negativos y bacilos Gram positivos y Gram negativos	Poca cantidad de bacilos y cocos, aislados	
55	BM	2	Bacilos Gram positivos	Bacilos cortos, en forma de varillas, en gran cantidad agrupadas	
55	BSR	2	Cocos Gram positivos y Gram negativos, bacilos Gram positivos	Gran cantidad de cocos, aislados, y bacilos en menor cantidad aislados.	
55	BM	4	Bacilos Gram positivos	Bacilos en forma de varillas cortas y largas en gran cantidad. agrupadas	

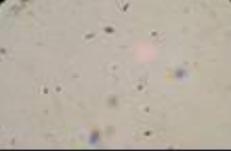
55	BSR	4	Cocos Gram negativos	Cocos aislados, bien definidos	
55	BM	5	Bacilos Gram positivos	Bacilos aislados bien definidos en forma de varillas	
55	BSR	5	Cocos Gram negativos.	Cocos en gran cantidad, agrupados, bien definidos	
55	BM	6	Cocos Gram negativos y bacilos Gram positivos	Cocos agrupados aislados y Bacilos en forma de varillas alargadas, aislados, bien definidos, en gran cantidad	
55	BSR	7	Cocos gram negativos	Cocos en gran cantidad aislados	
55	BM	7	Cocos Gram positivos, y bacilos alargados Gram positivos	Poca cantidad de cocos Gram positivos, y bacilos en gran cantidad alargados, bien definidos	
55	BSR	10	Cocos Gram negativos	Cocos en gran cantidad agrupados	
55	BM	10	Cocos y bacilos Gram positivos	Cocos aislados y en poca cantidad. Bacilos en forma de varillas alargadas, bien definidos, en gran cantidad.	
55	BSR	11	Cocos Gram negativos	Gran cantidad de cocos, agrupados.	
55	BM	11	Bacilos Gram positivos	Bacilos en forma de filamentos alargados, bien definidos. En gran cantidad.	
55	BSR	12	Cocos Gram positivos y Gram negativos	Cocos Gram negativos en gran cantidad, agrupados y Gram positivos aislados en menor cantidad	

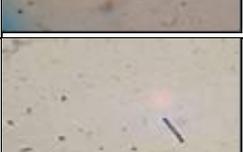
55	BM	12	Bacilos y cocos Gram positivos	Cocos bien definidos, aislados. Bacilos en forma de varillas largas y en agrupaciones, en gran cantidad..	
55	BSR	13	Bacilos y cocos Gram positivos	Cocos Gram negativos en gran cantidad, agrupados y cocos Gram positivos aislados en menor cantidad. Bacilos cortos, aislados en poca cantidad	
55	BM	13	Cocos y bacilos Gram positivos	Cocos aislados y bien definidos. Bacilos en forma de varillas alargadas, en agrupaciones en gran cantidad	
55	BSR	14	Cocos Gram positivos y negativos	Cocos Gram negativos en gran cantidad agrupados y cocos Gram positivos aislados en menor cantidad	
55	BM	14	Cocos y bacilos Gram positivos	Cocos agrupados. Bacilos en forma de varillas alargadas muy bien definidas aisladas.	
55	BSR	15	Cocos Gram positivos y negativos	Cocos Gram negativos en gran cantidad agrupados y cocos Gram positivos aislados en menor cantidad	
55	BM	15	Cocos y bacilos Gram positivos	Cocos aislados bien definidos. Bacilos en gran cantidad en forma de varillas alargadas, en agrupaciones.	
55	BSR	18	Cocos Gram positivos y Gram negativos	Cocos Gram positivos en forma de gota, en poca cantidad aislados	
55	BM	18	Cocos y bacilos Gram positivos	Cocos agrupados. Bacilos en forma de varillas aisladas, bien definidas	
55	BSR	19	Cocos Gram negativo	aislados bien definidos	

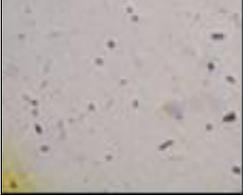
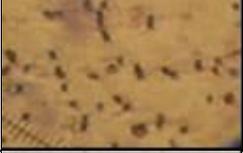
55	BM	19	Bacilos Gram positivos	Bacilos en forma de varillas alargadas, en gran cantidad	
55	BSR	20	Cocos Gram positivos y Gram negativos	Cocos Gram positivos en forma de gota, en poca cantidad aislados	
55	BM	20	Bacilos Gram positivos	Bacilos en gran cantidad en forma de varillas cortas y alargadas, bien definidas	
55	BSR	21	Cocos y Bacilos Gram positivos.	Cocos aislado, en poca cantidad, Bacilos en forma de varillas alargadas y cortas aisladas bien definidas	
55	BM	21	Bacilos Gram positivos	Bacilos en gran cantidad en forma de varillas alargadas, bien definidas	
55	BSR	22	Cocos Gram positivos	Aislados, bien definidos, en gran cantidad	
55	BM	22	Bacilos Gram positivos	Bacilos en gran cantidad en forma de varillas alargadas en gran cantidad	
55	BSR	25	Cocos Gram negativos	Cocos agrupados, bien definidos, en gran cantidad.	
55	BM	25	Bacilos Gram positivos y negativos	Bacilos en forma de varillas alargadas en grandes cantidades aisladas, bien definidas.	
55	BSR	26	Cocos Gram negativos	Cocos sin agrupación, en gran cantidad.	
55	BM	26	Bacilos y cocos Gram positivos,	Bacilos en forma de varillas alargadas, muy bien definidas	

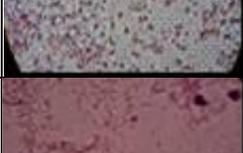
55	BSR	27	Cocos Gram positivos y negativos.	Cocos agrupados, en gran cantidad,	
55	BM	27	Bacilos y cocos Gram positivos,	Bacilos en forma de varillas alargadas, muy bien definidas	
55	BSR	28	Cocos Gram positivos y negativos	Cocos con agrupaciones bien definidos.	
55	BM	28	Bacilos Gram positivos y negativos	Bacilos en gran cantidad en forma de varillas largas y cortas bien definidas	
55	BSR	30	Cocos Gram negativos	Cocos aislados, muy bien definidos, en gran cantidad.	
55	BM	30	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos agrupados, bien definidos en forma de varillas largas y cortas.	

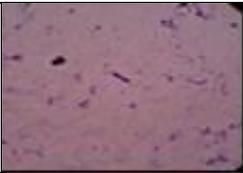
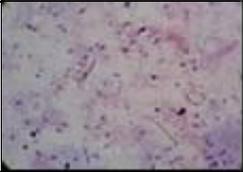
Tabla C3. Medio específico para la actividad metanogénica y sulfato-reductora a 65°C, durante 30 días

Temp° C.	Bacteria	Día	Descripción	Agrupación	Fotografía
65	BM	1	Cocos Gram negativo	Poca cantidad de cocos, aislados	
65	BSR	1	Cocos Gram positivos	Poca cantidad de cocos, aislados	
65	BM	2	Cocos Gram negativos	Poca cantidad de cocos, aislados	

65	BSR	2	Cocos Gram positivos	Poca cantidad de cocos, aislados	
65	BM	4	Cocos, Gram positivos	Cocos en gran cantidad	
65	BSR	4	Cocos Gram negativos	Gran cantidad de cocos, aislados	
65	BM	5	Cocos Gram positivos	Poca cantidad de cocos, aislados	
65	BSR	5	Cocos Gram negativos, y bacilos Gram positivos	Poca cantidad de bacilos y gran cantidad de cocos	
65	BM	6	Bacilos Gram positivos	Bacilos cortos aislados, en pequeñas cantidades, bien definidos	
65	BSR	7	Cocos Gram negativos	Gran cantidad de cocos, aislados	
65	BM	7	Bacilos Gram positivos	Bacilos cortos aislados, en pequeñas cantidades, bien definidos	
65	BSR	10	Cocos Gram negativos	Gran cantidad de cocos, aislados	
65	BM	10	Bacilos Gram positivos y bacilos cortos Gram negativo	Bacilos cortos en gran cantidad, agrupados y Bacilos largos en forma de varillas, cortas, sin agrupación	
65	BSR	11	Cocos y bacilos Gram negativo	Cocos en gran cantidad, agrupados, bacilos en forma de varillas cortas, aislada	

65	BM	11	Bacilos Gram positivos y bacilos cortos Gram negativo	Bacilos cortos en gran cantidad , agrupados y Bacilos largos en forma de varillas, cortas, sin agrupación	
65	BSR	12	Cocos y bacilos Gram negativo	Cocos en gran cantidad, agrupados, bacilos en forma de varillas cortas, aislada	
65	BM	12	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas	
65	BSR	13	Cocos y bacilos Gram negativos	Cocos en gran cantidad, agrupados, bacilos en forma de varillas cortas, aislada	
65	BM	13	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, y bacilos en forma de varillas cortas en pequeñas cantidades	
65	BSR	14	Cocos y bacilos Gram negativos	Cocos en gran cantidad, agrupados, bacilos en forma de varillas cortas, aislada	
65	BM	14	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, y bacilos en forma de varillas cortas en pequeñas cantidades	
65	BSR	15	Cocos y bacilos Gram negativos	Cocos en gran cantidad, agrupados, bacilos en forma de varillas cortas, aislada	
65	BM	15	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, con agrupaciones	
65	BSR	18	Cocos Gram negativos	Cocos en gran cantidad, aislados	

65	BM	18	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, con agrupaciones	
65	BSR	19	Cocos Gram negativos	Cocos en gran cantidad, agrupados	
65	BM	19	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, con agrupaciones	
65	BSR	20	Cocos Gram negativos y positivos	Cocos Gram en gran cantidad, asilados y cocos Gram positivos en menor cantidad aislados, bien definidos	
65	BM	20	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas y cortas con agrupaciones.	
65	BSR	21	Cocos Gram negativos.	Cocos en gran cantidad, asilados	
65	BM	21	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas y cortas con agrupaciones.	
65	BSR	22	Cocos Gram negativos.	Cocos en gran cantidad, asilados	
65	BM	22	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas.	
65	BSR	25	Cocos Gram negativos.	Cocos en gran cantidad, agrupados, bien definidos	

65	BM	25	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, en agrupación, bien definidas	
65	BSR	26	Cocos Gram negativos.	Cocos en gran cantidad, agrupados, bien definidos	
65	BM	26	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, en agrupación, bien definidas	
65	BSR	27	Cocos Gram negativos	Gran cantidad de cocos, agrupados, bien definidos	
65	BM	27	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, en agrupación, bien definidas	
65	BSR	28	Cocos Gram negativos	Gran cantidad de cocos, agrupados, bien definidos	
65	BM	28	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, en agrupación, bien definidas	
65	BSR	30	Cocos Gram negativos	Gran cantidad de cocos, agrupados, bien definidos	
65	BM	30	Bacilos Gram positivos	Gran cantidad de bacilos en forma de varillas alargadas, en agrupación, bien definidas	

Anexo D

Cuantificación de las bacterias en estudio usando NMP

Tabla D1 Resultados del NMP durante 30 días del medio general para la actividad metanogénica a 45°C

Tubo	10 ⁽⁻¹⁾	10 ⁽⁻²⁾	10 ⁽⁻³⁾	10 ⁽⁻⁴⁾	10 ⁽⁻⁵⁾	10 ⁽⁻⁶⁾	10 ⁽⁻⁷⁾	10 ⁽⁻⁸⁾	10 ⁽⁻⁹⁾	10 ⁽⁻¹⁰⁾	10 ⁽⁻¹¹⁾	10 ⁽⁻¹²⁾
1	18/08/2009	22/08/2009	24/08/2009	24/08/2009	30/08/2009	30/08/2009	30/08/2009	—	—	—	—	—
2	18/08/2009	22/08/2009	24/08/2009	30/08/2009	30/08/2009	30/08/2009	—	—	—	—	—	—
3	18/08/2009	22/08/2009	24/08/2009	30/08/2009	30/08/2009	—	—	—	—	—	—	—
Positivo					3	2	1					

Tabla D2 Resultados del NMP durante 30 días del medio general para la actividad sulfato-reductora a 45°C

Tubo	10 ⁽⁻¹⁾	10 ⁽⁻²⁾	10 ⁽⁻³⁾	10 ⁽⁻⁴⁾	10 ⁽⁻⁵⁾	10 ⁽⁻⁶⁾	10 ⁽⁻⁷⁾	10 ⁽⁻⁸⁾	10 ⁽⁻⁹⁾	10 ⁽⁻¹⁰⁾	10 ⁽⁻¹¹⁾	10 ⁽⁻¹²⁾
1	14/08/2009	17/08/2009	—	30/08/2009	—	—	—	—	—	—	—	—
2	14/08/2009	17/08/2009	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	14/08/2009	—	30/08/2009	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Positivo		2	1	1								

Tabla D3. Resultados del NMP durante 30 días del medio general para la actividad metanogénica a 55°C

Tubo	10 ⁽⁻¹⁾	10 ⁽⁻²⁾	10 ⁽⁻³⁾	10 ⁽⁻⁴⁾	10 ⁽⁻⁵⁾	10 ⁽⁻⁶⁾	10 ⁽⁻⁷⁾	10 ⁽⁻⁸⁾	10 ⁽⁻⁹⁾	10 ⁽⁻¹⁰⁾	10 ⁽⁻¹¹⁾	10 ⁽⁻¹²⁾
1	10/08/2009	17/08/2009	17/08/2009	17/08/2009	17/08/2009	17/08/2009	22/08/2009	—	—	—	—	—
2	10/08/2009	17/08/2009	17/08/2009	17/08/2009	17/08/2009	17/08/2009	22/08/2009	27/08/2009	—	—	—	—
3	17/08/2009	17/08/2009	17/08/2009	18/08/2009	22/08/2009	22/08/2009	27/08/2009	22/08/2009	22/08/2009	—	—	—
Positivo							3	2	1	—	—	—

Tabla D4 Resultados del NMP durante 30 días del medio general para la actividad sulfato-reductora a 55°C

Tubo	10 ⁽⁻¹⁾	10 ⁽⁻²⁾	10 ⁽⁻³⁾	10 ⁽⁻⁴⁾	10 ⁽⁻⁵⁾	10 ⁽⁻⁶⁾	10 ⁽⁻⁷⁾	10 ⁽⁻⁸⁾	10 ⁽⁻⁹⁾	10 ⁽⁻¹⁰⁾	10 ⁽⁻¹¹⁾
1	10/08/2009	10/08/2009	12/08/2009	12/08/2009			—	—	—	—	—
2	10/08/2009	12/08/2009	12/08/2009	12/08/2009	12/08/2009	24/08/2009	—	—	—	—	—
3	10/08/2009	12/08/2009	12/08/2009	12/08/2009	12/08/2009		—	—	—	—	—
Positivo				3	2	1					

Tabla D5. Resultados del NMP durante 30 días del medio general para la actividad metanogénica a 65°C

Tubo	10 ⁽⁻¹⁾	10 ⁽⁻²⁾	10 ⁽⁻³⁾	10 ⁽⁻⁴⁾	10 ⁽⁻⁵⁾	10 ⁽⁻⁶⁾	10 ⁽⁻⁷⁾	10 ⁽⁻⁸⁾	10 ⁽⁻⁹⁾	10 ⁽⁻¹⁰⁾	10 ⁽⁻¹¹⁾
1	11/09/2009	18/09/2009	18/09/2009	18/09/2009	18/09/2009	—	—	—	—	—	—
2	11/09/2009	11/09/2009	18/09/2009	18/09/2009	—	—	—	—	—	—	—
3	11/09/2009	18/09/2009	18/09/2009	18/09/2009	—	—	—	—	—	—	—
Positivo			3	3	1						

Tabla D6. Resultados del NMP durante 30 días del medio general para la actividad sulfato-reductora a 65°C

Tubo	10 ⁽⁻¹⁾	10 ⁽⁻²⁾	10 ⁽⁻³⁾	10 ⁽⁻⁴⁾	10 ⁽⁻⁵⁾	10 ⁽⁻⁶⁾	10 ⁽⁻⁷⁾	10 ⁽⁻⁸⁾	10 ⁽⁻⁹⁾	10 ⁽⁻¹⁰⁾	10 ⁽⁻¹¹⁾
1	14/09/2009	14/09/2009	11/09/2009	18/09/2009	—	—	—	—	—	—	—
2	14/09/2009	11/09/2009	11/09/2009	21/09/2009	21/09/2009	—	—	—	—	—	—
3	14/09/2009	14/09/2009	11/09/2009	18/09/2009	21/09/2009	—	—	—	—	—	—
Positivo			3	3	2						