

82  
2 E



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

DOCUMENTOS Y FOTOCOPIAS DE  
FAC. DE QUIMICA

**Investigación sobre Metanogénesis en Sedimentos  
de un Ambiente Costero Asociado a la Laguna de  
Términos, Campeche.**

**TESIS MANCOMUNADA**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A N :**

**MARIA LUISA DE LOURDES PEREZ GONZALEZ**

**FELIPE DE JESUS MORALES MANILLA**



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 está 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.

## INDICE

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
I.1. Importancia del Metano en la Naturaleza.....	1
I.2. Su Distribución en la Naturaleza.....	2
I.3. Estudios Sobre Metanogénesis en Aguas y Sedimentos.....	4
I.4. Finalidad del Presente Estudio.....	5
II. ANTECEDENTES.....	6
II.1. La Ecología de la Metanogénesis.....	6
II.2. Factores que Afectan Metanogénesis en la Naturaleza.....	9
II.3. Bacterias Recutoras de Sulfato.....	9
II.4. Sustratos Metanogénicos.....	18
II.5. Distribución de Metano y de las Bacterias Metanogénicos en Sedimentos de Agua Dulce.....	20
II.5.1. Sedimentos Marinos y Estuarinos.....	22
II.5.2. Suelos Inundados.....	25
II.5.3. Sistemas Digestivos Animales.....	26
II.6. Degradación de Proteínas.....	29
II.7. Degradación de Lípidos.....	30
II.8. Degradación de Carbohidratos.....	30
II.8.1. Concentración de Sulfatos en los Sedimentos..	32
II.8.2. Inhibición de la Metanogénesis por el Aumento de la Concentración de iones Sulfuro.....	33
II.8.3. Oxidación Aerobia del Metano.....	33
II.8.4. Aporte de la Materia Orgánica al Sedimento...	35
II.8.5. Oxidación Anaerobia del Metano.....	35
II.9. Principios Generales de Aislamiento.....	37
II.9.1. Técnicas para el Cultivo de Bacterias Metanogénicas.....	40
II.9.2. Método de la Cámara de Anaerobiosis.....	42
II.9.3. Cultivo de Enriquecimiento.....	43

	Página
II.10. Métodos de Identificación de las Bacterias Metanogénicas.....	50
II.10.1. Microscopía de Contraste de Fases.....	50
II.10.2. Morfología y Reacción a la Tinción de Gram.....	51
II.10.3. Observación de la Fluorescencia en las Colonias de Metanógenos a la Luz UV.....	52
II.10.4. Microscopía de Fluorescencia.....	54
II.10.5. Detección de Metano por Cromatografía de Gases.....	55
II.11. Descripción de las Especies de Bacterias Metanogénicas.....	56
II.11.1. Propiedades Morfológicas.....	56
III. MATERIALES Y METODOS.....	73
III.1. Muestreo.....	73
III.1.1. Ubicación Geográfica de los Sitios de Muestreo.....	73
III.1.2. Características Climatológicas.....	74
III.1.2.1. Batimetría.....	75
III.1.2.2. Temperatura.....	75
III.1.2.3. Salinidad.....	75
III.1.2.4. Tipos de Sedimentos de Fondo.....	75
III.1.2.5. Transparencia del Agua.....	76
III.1.2.6. Fauna Acompañante.....	76
III.1.2.7. Vegetación Circundante y de Fondo.....	76
III.2. Medio de Cultivo.....	77
III.2.1. Preparación del Medio de Cultivo.....	81
III.2.2. Descripción del Sistema Anaeróbico Empleado.....	83
III.3. Técnicas de Muestreo.....	86
III.4. Aislamiento Primario a Partir de las Muestras de Sedimentos.....	88
III.4.1. Estudio Cualitativo para la Determinación de Metano en la Fase Gaseosa en el Frasco con el Medio Líquido.....	88

	Página
III.4.2. Cultivo en Medio Sólido.....	89
III.4.3. Identificación de Colonias de Bacterias Metanogénicas por Exposición a la Luz UV de Onda Larga.....	90
III.4.4. Microfotografías Obtenidas Usando Objetivo de Inmersión y de Contraste de Fases.....	91
III.5. Pruebas Bioquímicas.....	91
III.5.1. Detección de Metano en Fase Gaseosa en Cultivos Mixtos.....	91
III.5.2. Prueba de Producción de Metano a Partir de Fuentes de Carbono Utilizables por las Metanobacterias.....	92
IV. RESULTADOS.....	93
IV.1. Resultados Morfológicos y Microscópicos.....	93
IV.2. Microfotografías	
IV.3. Datos Cromatográficos.....	94
V. DISCUSION DE RESULTADOS.....	103
CONCLUSIONES.....	108
BIBLIOGRAFIA.....	110

## I. INTRODUCCION

### I.1. Importancia del Metano en la Naturaleza

La generación de metano (metanogénesis) es un proceso que llevan a cabo en la naturaleza microorganismos anaeróbicos estrictos pertenecientes a los géneros: Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanomicrobium, Methanogenium, - - Methanospirillum, Methanosarcina y Methanococcus.

Estas bacterias obtienen energía mediante la reducción - del  $\text{CO}_2$  disuelto en el agua o utilizando fuentes de carbono orgánicas, como acetato, metanol y formiato, así como otros sustratos producidos por otras bacterias asociadas al ciclo del carbono, como propionato, produciendo metano a partir de ellos (Bergey, 1974; Boone y Bryant, 1980).

La importancia ecológica del metano se pone de manifiesto durante la eutroficación en el ciclo del carbono, ya que el  $\text{CO}_2$  producido por la respiración de animales y vegetales, es reducido durante la fotosíntesis a compuestos orgánicos, los cuales son utilizados en diversas cadenas de alimentación presentes en las bacterias.

Durante la metanogénesis en los sedimentos anaeróbicos, - se utilizan  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ , y además, como dichos sedimentos - absorben materia orgánica sometida a descomposición anaeróbica, se produce metano a partir de ácidos grasos e hidró

géo; el proceso inverso, presente asimismo en los sedimentos anaeróbicos, mediante el cuál el metano es oxidado a ácido carbónico por las bacterias metano-oxidantes, proceso éste que está relacionado con el incremento del porcentaje de  $O_2$  y la biomasa, mantiene bajos los niveles de metano presentes en los sedimentos que no son totalmente anóxicos, verificándose de esta manera el equilibrio entre la producción y el consumo de metano en estos ambientes.

En los sedimentos marinos y estuarinos, donde existe una concentración baja de metano, el equilibrio está mediado por las bacterias reductoras de sulfato, del género - - Desulfovibrio, las cuales han mostrado tener capacidad de metabolizar el  $CH_4$  producido por las metanogénicas, lo cual implica una interdependencia ecológica entre estos dos grupos bacterianos (Barnes y Goldberg, 1976).

## I.2. Su Distribución en la Naturaleza

Las bacterias metanogénicas se hallan ampliamente distribuidas en diferentes medios ambientes, naturales o artificiales.

En sedimentos marinos, existen en grandes cantidades en el Mar Negro (Atkinson y Richards, 1967). En los sedimentos de agua dulce, se han detectado concentraciones -

de metano a profundidades variables (Winfrey y Zeikus, - 1979). Las bacterias metanogénicas proliferan en ambientes sedimentarios en los que existe una elevada deposición de materia orgánica sometida a intensa fermentación anaeróbica.

Las bacterias productoras de metano también se hallan en estuarios, pantanos y desembocaduras de ríos, debido a que en estos lugares, existe poco flujo de corrientes de agua, favoreciendo la sedimentación.

Por esta razón, muchos estudios se han enfocado a sedimentos de lagos, generalmente de baja profundidad.

Otra fuente natural es el rumen de bovinos, el cual por sus condiciones de extrema anaerobiosis permite el desarrollo de bacterias metanogénicas (McNeill, 1957), - - habiéndose obtenido cultivos anaeróbicos metanogénicos a partir de extractos de rumen (Dawson et al., 1980).

Con respecto a los ambientes artificiales, se han aislado y caracterizado bacterias metanogénicas a partir de - digestores anaeróbicos y aguas de albañal.

En general, es posible intentar el aislamiento de bacterias metanogénicas a partir de las fuentes ya señaladas, debido a que presentan condiciones de temperatura, pH y bajas concentraciones de oxígeno, favoreciendo con ello el desarrollo de los metanógenos.



### I.3. Estudios sobre Metanogénesis en Agua y Sedimentos

Tales estudios se han enfocado principalmente sobre estos dos aspectos:

- a) Análisis físico y químico de las aguas de donde se han aislado bacterias metanogénicas.
- b) Estudios microbiológicos de los sedimentos.

Los análisis físicos y químicos se han orientado fundamentalmente a la medición de parámetros que permiten correlacionar las concentraciones de metano con la presencia de metanobacterias en los sedimentos.

Dichos parámetros son generalmente: concentraciones de  $\text{CH}_4$ ,  $\text{O}_2$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ ; temperatura, pH y conductividad, tomando como referencia una columna de agua (Strayer y Tiejde, 1978; Winfrey y Zeikus, 1979; Zinder y Mah, 1979; Zehnder y Brock, 1979; Boone y Bryant, 1980).

Los microbiológicos, en sedimentos, se han enfocado al aislamiento y caracterización de los diferentes microorganismos metanogénicos presentes en ellos, aislándose tales bacterias en diversos medios de cultivo, mediante el empleo de diferentes sustratos orgánicos y diversos recursos técnicos para su identificación, como la microscopía de fluorescencia (Doddema y Vogels, 1979; Zinder y Mah, 1979; Zehnder y Brock, 1979; Boone y Bryant, 1980; Karube y Cols, 1980).

En relación al aislamiento, cabe mencionar que algunas especies de bacterias metanogénicas son de difícil aislamiento en cultivo puro, ya que lo más común es aislarlas en coexistencia con otros géneros bacterianos, sugiriendo esto la posibilidad de que las bacterias metanogénicas sean simbióticas en sus medios ambientes naturales (Patel y Roth, 1978; Boone y Bryant, 1980).

#### I.4. Finalidad del Presente Estudio

Los objetivos que se plantea del presente trabajo son:

1. Demostrar la existencia de actividad metanogénica en sedimentos de esteros adyacentes de la Laguna de Términos, Camp. así como su distribución.
2. Obtener, en un medio apropiado para el crecimiento de las bacterias metanogénicas cultivos mixtos de éstas.
3. Demostrar la presencia de bacterias metanogénicas en dichos cultivos mixtos, empleando diversas pruebas existentes para identificarlas.
4. Los resultados del presente trabajo podrán correlacionarse con otros estudios que actualmente está realizando el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. La Ecología de la Metanogénesis

Los metanógenos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Su distribución y su actividad están restringidas a medios ambientes anóxicos, en donde las bacterias asociadas mantienen un bajo Eh (potencial red-ox) y producen substratos aptos para la metanogénesis, así como otros factores de nutrición (Mah et al., 1977).

Los hábitats de los metanógenos son muy variados, como consecuencia de su distribución natural.

En los medios ambientes acuáticos, una liberación súbita de burbujas provenientes de los sedimentos subyacentes generalmente señala la presencia de actividad metanogénica. Las bacterias metanogénicas, son comunes en medios ambientes anóxicos donde la materia orgánica sufre descomposición anaeróbica (Mah y Smith, 1981).

Además de los sedimentos acuáticos (estanques, pantanos, esteros, lagos y océanos), otros hábitats metanogénicos incluyen: los tractos intestinales del hombre y los animales (especialmente el rumen de bovinos y otros herbívoros), digestores de aguas de desecho y ciénagas.

Se han hallado bacterias metanogénicas aún en el interior de la corteza de árboles vivos y en los manantiales de aguas termales, donde puede haber crecimiento a partir del  $H_2$  geoquímico sobre acúmulos de algas en proceso de descomposición (Mah y Smith, 1981).

El metano también se ha detectado en las regiones profundas de los océanos, incluyendo las fosas y las cuencas oceánicas, lo que demuestra que la metanogénesis es un proceso biogeoquímico que ocupa una parte importante en el ciclo del carbono en la naturaleza.

Las bacterias metanogénicas ocupan el nicho terminal en la transferencia de los elementos generados por la descomposición anaeróbica de la materia orgánica (Mah y Smith, 1981).

En los hábitats naturales, la fermentación de la materia orgánica es iniciada por las bacterias heterotróficas no metanogénicas y resulta en la producción de  $H_2$  y  $CO_2$  y principalmente ácidos grasos volátiles (ácidos acético y propiónico). Algunos de los productos finales más simples formados pueden servir directamente como sustratos para la formación de metano.

El hidrógeno es raramente detectable en la Naturaleza y bajo condiciones estrictamente anaeróbicas y en ausencia de  $SO_4^{2-}$ , es oxidado con la reducción del  $CO_2$  a  $CH_4$  y  $H_2O$ .

Mediante la extracción de electrones del sistema vía las reacciones de transferencia de hidrógeno interespecies - para formar  $\text{CH}_4$  mediante la reducción del  $\text{CO}_2$ , las bacterias metanogénicas influencian el metabolismo anaeróbico total de los compuestos orgánicos hacia el completo catabolismo a metano y dióxido de carbono. (Mah y Smith, 1981).

La extracción de electrones del hidrógeno, por otra parte, permite que ocurran reacciones termodinámicamente - desfavorables. Como consecuencia, la degradación anaeróbica de los sustratos tiende a ir desde la formación de  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  y productos orgánicos finales mezclados hacia la formación de acetato, metano y dióxido de carbono. El acetato formado puede entonces ser ulteriormente convertido por los metanógenos utilizadores de acetato para - producir más  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ .

En general, las bacterias metanogénicas se hallan en - grandes números donde los valores del Eh son de -200 mV o menos. (Mah y Smith, 1981).

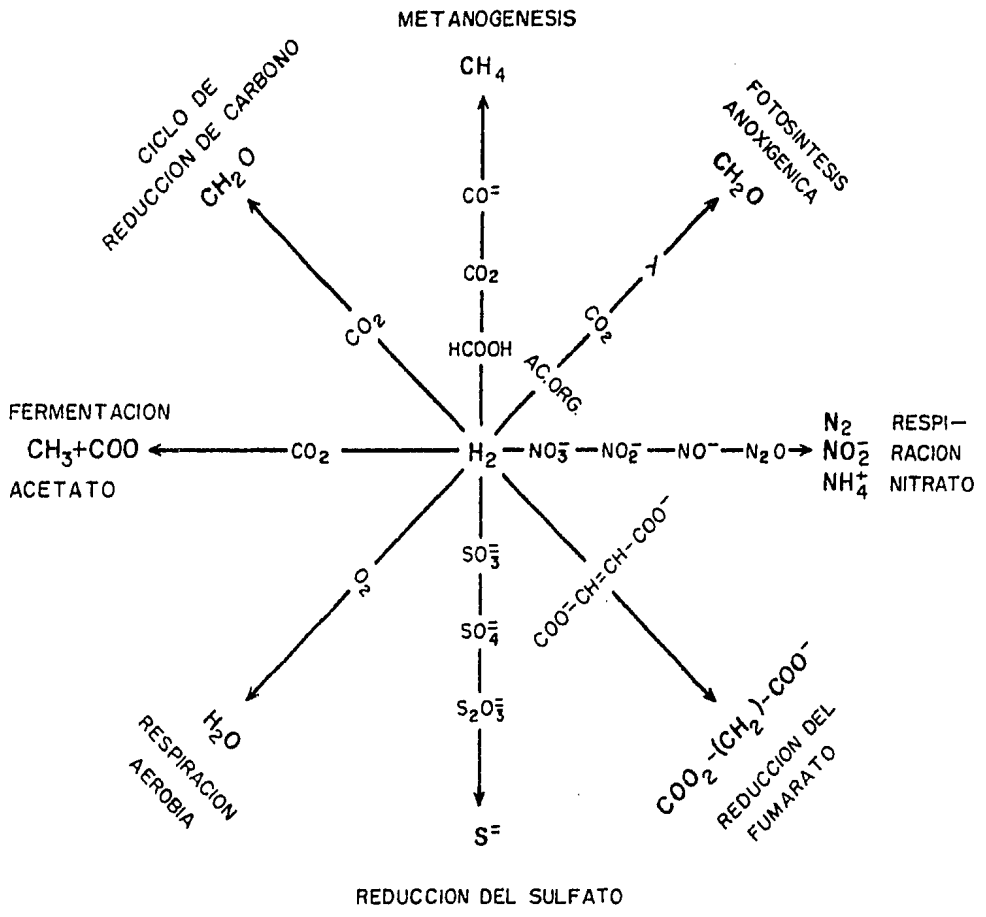


FIG.II, UTILIZACION DE HIDROGENO EN LA NATURALEZA

## II.2. Factores que Afectan la Metanogénesis en la Naturaleza

Potencial de Oxidorreducción, (Eh): Basados en las características de los cultivos puros de bacterias metanogénicas, no es sorprendente que los números más altos de organismos metanogénicos se hallen a valores de Eh de -200 a -250 mV o menos. (Mah, 1977). Los cambios estacionales en el Eh también corresponden a los cambios estacionales en la distribución del metano y números máximos de bacterias metanogénicas, como ha podido observarse en los sedimentos.

La inhibición de la metanogénesis en los sedimentos lacustres por el  $\text{NO}_3^-$  resulta en un aumento en el Eh del sedimento.

## II.3. Bacterias Reductoras de Sulfato

La distribución de la metanogénesis en los sedimentos puede ser afectada por la interacción de las bacterias metanogénicas y las bacterias reductoras de  $\text{SO}_4^{2-}$ . (Mah, 1977). La presencia de aceptores inorgánicos de electrones puede prevenir la metanogénesis por desarrollo desmedido de los reductores de  $\text{SO}_4^{2-}$  que compiten por el substrato metanogénico o producen concentraciones inhibitorias de  $\text{S}^{2-}$ , aunque no se observe inhibición en todos los medios ambientes metanogénicos.

A partir de las observaciones siguientes, se puede plantear la hipótesis de la exclusión mutua de estos dos tipos metabólicos: el  $\text{SO}_4^{2-}$  inhibe la metanogénesis cuando se agrega a sedimentos de agua dulce; los máximos niveles de metano se hallan a profundidades de sedimento donde el  $\text{SO}_4^{2-}$  está agotado, y el máximo de la población de bacterias reductoras de sulfato se halla cercano a la interfase agua-sedimento, mientras que el máximo de población de las bacterias productoras de metano está más alejado de la interfase sedimento agua, hacia adentro del sedimento.

Esta separación está mejor definida en los sedimentos marinos donde los niveles de sulfato son muy altos. El  $\text{S}^{2-}$  producido por las bacterias reductoras de  $\text{SO}_4^{2-}$  puede inhibir las bacterias metanogénicas. (Mah, 1977).

Las opiniones de otros autores corrientes están en favor del punto de vista de que ambos fenómenos son mutuamente exclusivos, esto es, que la reducción del sulfato precede la formación del metano en la diagénesis de la materia orgánica. Este punto de vista ha sido sostenido por perfiles de metano y sulfato en columnas de sedimento (Barnes y Goldberg, 1976; Martens y Berner, 1974, 1977; Winfrey y Zeikus, 1977) y estudios en cultivo combinado de bacterias respiradoras de sulfato y metanogénicas. (Ormeland y Taylor, 1978).



En el último estudio se demostró que la metanogénesis no compete con la reducción del sulfato cuando los iones  $\text{SO}_4^{2-}$  son abundantes en el medio. Cuando el sulfato está ausente o es limitado, el metano se produce por transferencia de  $\text{H}_2$  interespecies, desde el reductor de sulfato al metanógeno.

Además, el modelo termodinámico está de acuerdo con esto, dado que la reducción de sulfato a sulfuro por el hidrógeno da más energía que la correspondiente reducción del dióxido de carbono a metano.

Por lo tanto, se cree que en el medio ambiente existe una sucesión ecológica en la cual las bacterias reductoras de sulfato se hallarían arriba de las bacterias metanogénicas en columnas de sedimentos, según Claypool y Kaplan (1974) citados por Oremland y Taylor.

El hidrógeno parece estimular la metanogénesis en los se dimentos marinos tropicales, puesto que se ha visto que la incubación de muestras de sedimentos marinos en agua de mar desoxigenada y bajo atmósfera de  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  (70:30, v/v) ha resultado en el consumo de grandes cantidades de la mezcla de gases relativa a la cantidad de metano formado.

Los inhibidores de las bacterias metanogénicas, aunque efectivos en el bloqueo de la formación del metano, no evitan la captación de la mezcla gaseosa, indicando por lo tanto que otros anaerobios, aparte de los metanogénicos, son responsables en mucho de dicha captación. Esto implica que existe una competencia de sustrato por el  $H_2$  entre las poblaciones de estos sedimentos.

(Oremland y Taylor, 1978).

Oremland y Taylor llegan a la conclusión de que la producción endógena de metano debe ocurrir como un proceso simultáneo, y no, como sostienen otros autores (Martens y Berner, entre otros) que la metanogénesis es un proceso biogeoquímico que requiere de la reducción previa del sulfato.

Asimismo proponen que el siguiente mecanismo para explicar la ocurrencia simultánea de la metanogénesis y la reducción del sulfato es posible gracias a la interacción probable entre las bacterias metanogénicas y otras bacterias anaerobias, aparte de las sulforreductoras:

El hidrógeno es recibido por las metanobacterias a partir de la degradación de la materia orgánica por las bacterias fermentadoras. Las bacterias respiradoras de  $SO_4^{2-}$  pueden competir por el hidrógeno cuando el sulfato

y el  $H_2$  son abundantes y los sustratos orgánicos limitados. En ausencia de  $SO_4^{2-}$ , las respiradoras de sulfato generan  $H_2$  a partir de oxidación de la materia orgánica.

Los clostridos son capaces de proveer sustratos ( $H_2$ ) para las bacterias metanogénicas y además, poblaciones bacterianas no frecuentes en estos sedimentos, tales como las espiroquetas anaeróbicas, producen sustratos metanogénicos. La interacción de estos organismos con los metanogénos pueden resultar en la formación de metano en las capas superiores de los sedimentos marinos ricos en sulfato. El metano se mantendría a bajas concentraciones por difusión hacia el exterior y quizás por oxidación anaeróbica. (Oremland y Taylor, 1978).

El modelo explica que los sedimentos marinos son ricos en sustratos orgánicos y que presentan niveles bajos en sulfato disuelto, así como en las aguas pobres (últimos estadios de la diagénesis); el  $H_2$  para la reducción del  $CO_2$  por las bacterias metanogénicas se originaría de bacterias sulforreductoras.

Sin embargo, en opinión de Martens y Berner (1974), quienes hicieron un estudio en aguas intersticiales de una región marina en condiciones anóxicas en el cual se demostró lo contrario, que los sedimentos no alcanzan --

concentraciones detectables de metano hasta un rango de 90% del  $\text{SO}_4^{2-}$  del agua marina que ha sido removida por las bacterias.

Ellos postulan que las metanobacterias son el extremo terminal de una cadena de alimentación microbiana y que su papel en la formación de metano no se hace evidente, sino hasta que el sulfato disuelto ha sido metabolizado por las bacterias reductoras de sulfato.

Pudieron comprobar por estudios de laboratorio sobre sedimentos marinos anóxicos, que la reducción de sulfato y la producción de metano, son procesos metabólicos alterna a término.

Asimismo, proponen varias hipótesis para explicar sus resultados y observaciones:

- 1.- La concentración del metano en las aguas intersticiales es el resultado de su producción, en parte, por las bacterias metanogénicas y su consumo, por otra, por las bacterias reductoras de sulfato, según el siguiente proceso:



Esta reacción es termodinámicamente posible, aunque la reducción directa en ausencia de las bacterias no ocurre abajo de  $500^\circ\text{C}$ . Por lo tanto, las sulfo-

reductoras y las metanogénicas pueden catalizar la reacción. Algunos estudios indican que Desulfovibrio desulfuricans puede llevarla a cabo. (Davis y - - Yarbrough, 1966).

- 2.- También puede ser que el metano sea producido únicamente, en un área donde no existe sulfato disuelto, abajo de la zona de reducción de sulfato, y que la coexistencia de los dos se deba a una interdifusión. Esta tesis la apoya un estudio hecho por Claypool y Kaplan, quienes calcularon la energía del proceso termodinámico que rige la reacción y la hallaron alterna a término.
- 3.- El metano es producido solamente en ausencia de  $SO_4^{2-}$  disuelto; dicho gas, es consumido por las sulforreductoras debido a su desprendimiento hacia las capas superiores.
- 4.- Finalmente, el metano puede producirse en forma limitada en presencia de bacterias reductoras de sulfato, aunque no es utilizado por éstas.

Por su parte, Barnes y Goldberg (1976), señalan que la producción de metano en medios ambientes anóxicos puede producir acumulaciones significativas de este gas en sedimentos marinos apropiados, pero su distribución y -

concentración entre el agua y los sedimentos marinos anóxicos sometidos a reducción de sulfato, representa un equilibrio entre la producción de las metanobacterias y el consumo de las sulforreductoras:

"La producción de metano por diagénesis a bajas temperaturas en los sustratos orgánicos de los medios ambientes anóxicos puede producir acumulaciones de este gas en sedimentos apropiados. Sin embargo, en los sedimentos marinos y el agua de mar, la concentración de metano se mantiene a bajos niveles relativamente (2 ml STP/kg  $H_2O$ ) hasta que el sulfato disuelto es removido por las bacterias reductoras de sulfato, Desulfovibrio".

Ellos también sostienen el punto de vista de que ambos procesos metabólicos (la metanogénesis y la producción de sulfato) no son simultáneos. Esta evidencia, aunada a las consideraciones termodinámicas, bioquímicas y experimentales, ha llevado a varios autores a sugerir que la generación de metano y la reducción de sulfato son procesos metabólicos alternos a término.

Así, por lo que el análisis termodinámico y bioquímico se sugiere que el metabolismo de los dos concuerda con el hecho de que el metabolismo de ambos sistemas bacterianos son complementarios y no competitivos.

En medios ambientes donde hay presencia de metano y en ausencia de inhibidores, efectos tóxicos o competencia metabólica, la producción de metano en los ambientes marinos debe iniciarse en el límite de la interfase aeróbica-anaeróbica con la reducción de sulfato; en presencia de ambos tipos de bacterias el  $H_2S$  es uno de los principales inhibidores de la producción de metano (Barnes y Goldberg, 1976).

Las conclusiones de dicho trabajo son interesantes, en el sentido del enfoque ecológico que encierran,

"Si el metano es consumido en la zona de reducción de sulfato en los sedimentos marinos, la cuestión de la producción simultánea de metano, no puede mostrarse concluyentemente a partir de un solo análisis químico de agua filtrada. Sin embargo, se ha demostrado, para una variedad de microambientes una relación comensal entre Desulfovibrio y metanogénicas".

Un poco más adelante, señalan que:

"Las bacterias reductoras de sulfato liberan acetato como un producto final del metabolismo para obtener energía. Las bacterias metanogénicas utilizan este acetato como sustrato, fermentándolo a metano y dióxido de carbono. El metano producido es a su vez oxidado, en gran proporción, a  $CO_2$  por la población bacteria

na de la zona de reducción de sulfato. Las concentraciones de metano observadas en la zona representan un equilibrio entre la producción y el consumo junto con supuestos procesos de transporte físico que desempeñan un limitado pero significativo papel en ciertos ambientes sedimentarios".

Y además, refutan la teoría que sostienen Oremland y - - otros, diciendo que el hecho primario que se puede esgrimir para la utilización del metano generado anaeróbicamente en los sedimentos marinos en la zona de reducción del sulfato, y no en la de oxidación aeróbica.

#### II.4. Sustratos metanogénicos.

El metano es probablemente producido en la Naturaleza a partir de un rango limitado de sustratos, acetato, formiato,  $H_2-CO_2$  y posiblemente metanol o algún intermedio relacionado. El  $CO_2$ , y otros sustratos metabolizados por cultivos puros de bacterias del metano no son de significancia ecológica probablemente. Puesto que la materia orgánica que entra a los sedimentos es principalmente proteína, carbohidrato y polímeros o heteropolímeros lipídicos (ligninas p. ej.), las bacterias metanogénicas están obligatoriamente asociadas con otras bacterias que fermentan estos compuestos a acetato, formiato e  $H_2-CO_2$  (el metanol puede no ser un pro -



ducto de fermentación natural). En los medios ambientes sedimentarios la disponibilidad de los sustratos es afectada por muchos parámetros complejos e indefinidos, incluyendo la extensa descomposición bacteriana en capas de sedimento por encima de la zona de producción de metano, la velocidad de "entierro", debido a la sedimentación, y/o a la difusión de los sustratos metanogénicos dentro de la zona de producción de metano. La disponibilidad de los sustratos metanogénicos en la zona de producción de  $\text{CH}_4$  puede estar limitada, por una parte, por la extensa descomposición en las capas superficiales y la difusión dentro de la capa metanogénica o, por otra parte, por la velocidad de descomposición de los compuestos inorgánicos a sustratos metanogénicos dentro de la zona metanogénica. El segundo caso supone que algunos de los sustratos poliméricos sujetos a descomposición anaeróbica son enterrados más rápidamente que los que son degradados en las capas superiores a la zona de producción de metano. En los sedimentos de agua dulce la zona del máximo de producción de  $\text{CH}_4$  se ubica cercanamente a la interfase agua sedimento, y la difusión de sustratos puede ocurrir sobre distancias mucho más pequeñas (Mah, 1977).

Abajo de la zona de producción máxima, la actividad metanogénica disminuye en los sedimentos de agua dulce. Aunque esta disminución puede estar relacionada a la

disponibilidad de los sustratos, sin duda, también pueden estar involucrados otros factores. En contraste, - la zona del máximo de producción de  $\text{CH}_4$  en los sedimentos marinos puede ser desde uno hasta varios metros abajo de la interfase agua-sedimento, haciendo improbable que la difusión tenga que tomarse en cuenta por la - - transferencia de los sustratos metanogénicos producidos en una capa de intensa descomposición cercana a la - - superficie. La velocidad de descomposición en los sedimentos marinos es probablemente lenta en comparación al "entierro" del carbono orgánico. La descomposición subsecuente lleva entonces a la producción de metano en estas capas profundas, siempre y cuando no haya ningún - otro factor limitante. (Mah 1977).

#### II.5. Distribución de Metano y de las Bacterias Metanogénicas en Sedimentos de Agua Dulce

Mucho se ha estudiado la distribución vertical del metano en sedimentos de lagos y la mayoría de estos estudios han demostrado que la concentración del gas aumenta con la profundidad, alcanzando un máximo entre los 2 y 17 cm y, en algunos casos, disminuye de nuevo a profundidades abajo del máximo de concentración de metano.

A partir del estudio de la distribución vertical de la actividad metanogénica en sedimentos de lagos se ha generado un modelo básico que relaciona la producción del metano, su distribución y los NMP de distribución vertical de bacterias metanogénicas; dicho modelo establece que las concentraciones máximas del gas aumentan con la profundidad en el sedimento, en donde los NMP para las bacterias metanogénicas son máximos.

#### Comportamiento del Metano en Sedimentos de Agua Dulce.

El metano es el gas más abundante generado en y procedente de sedimentos de marismas y lagos. Aunque la difusión del  $\text{CH}_4$  debe explicarse en parte al transporte a lo largo de la columna de agua que se halla por encima del sedimento, la difusión del metano en los sedimentos puede ser muy lenta y este es un factor que debe tomarse en cuenta para el flujo del metano observado. La ebullición de burbujas de gas quizá sea el principal mecanismo de transporte del metano fuera de los sedimentos.

En algunos lugares, extremadamente anóxicos, la liberación de gas conteniendo altas tasas de  $\text{CH}_4$  (95% o más) puede ser de varios mililitros por minuto por metro cuadrado.

En columnas de agua anóxica de lagos meromícticos permanentemente estratificados y en dimícticos estacionalmente estratificados, las concentraciones de metano disminuyen desde la interfase sedimento-agua hacia las capas oxigenadas, donde son más activas las bacterias oxidantes de metano.

#### II.5.1. Sedimentos Marinos y Estuarinos

Distribución del Metano. Se estudió la concentración de metano en sedimentos marinos y estuarinos, correlacionándose con la profundidad y se obtuvieron perfiles de distribución muy similares, encontrándose que las concentraciones de metano aumentan linealmente con la profundidad abajo de la interfase sedimento-agua. A diferencia de lo que ocurre en los sedimentos de agua dulce, en los sedimentos marinos el gradiente de metano no intersecta la interfase agua-sedimento, sino que se desvía hacia valores muy altos a profundidades que varían desde los 10 hasta los 150 cm abajo de la superficie del sedimento. La escasez de  $\text{CH}_4$  en las aguas superficiales está relacionada a una zona de reducción de sulfato (la disminución de los niveles de sulfato ocurre por encima de este intervalo de profundidad).

En estos sedimentos, la distribución de la actividad metanogénica muestra, generalmente, una velocidad o tasa máxima de metanogénesis en una profundidad de sedimento desde 5-7 cm y es similar a los sedimentos de agua dulce.

Las cuentas viables de bacterias metanogénicas tienden a mostrar valores en un rango de  $10^2$  -  $10^7$  células/gr de sedimento seco.

Altos números se hallan presentes entre los 0-7 cm, disminuyendo a profundidades debajo de los 36 cm.

La exclusión mutua del metano y sulfato está bien definida en los sedimentos marinos. (Mah et al., 1977).

#### Comportamiento del Metano en los Sedimentos Marinos

Existe un gradiente de concentración de metano en las columnas de agua de muchos sistemas marinos. Dicho gradiente disminuye desde la interfase sedimento-agua hacia arriba en dirección del límite óxico-anóxico. Esta observación sostiene que ocurre un transporte neto de metano desde el sedimento hasta la capa de agua que lo cubre. En contraste con los sedimentos de agua dulce, los niveles máximos de  $CH_4$  ocurren a profundidades desde uno hasta varios metros abajo de la interfase sedimento-agua. Reeburgh calculó que las concentracio-

nes de metano en sedimentos marinos someros (esto es, de poca profundidad) podrían exceder la concentración crítica debido a la formación de burbujas. Martens observó la ebullición de gas en sedimentos marinos someros - (donde la metanogénesis presumiblemente ocurre abajo de una zona de reducción de  $\text{SO}_4^{2-}$ ), mientras que en sedimentos oceánicos, la presión hidrostática del agua que las cubre probablemente previene la ebullición del gas. En ausencia de liberación de burbujas, puede esperarse que la difusión controle el transporte del metano desde los sedimentos.

En este sentido, se estableció un modelo de difusión - con el objeto de calcular la rapidez de la metanogénesis, hallándose que ésta era de 2.92 y 8.45 micromoles/Lt/año para sedimentos del oeste y del este de la Fosa de Cariaco (frente a las costas de Venezuela) y de 10 - micromoles/Lt/año para sedimentos de la Bahía de Sta. - Bárbara, frente a las costas del estado de California, ambos sitios de particular importancia por sus características especiales de zonas anóxicas y sobre las cuales se han efectuado una variedad de estudios de la - - metanogénesis. (Mah et al., 1977).

## II.5.2. Suelos Inundados

Otro hábitat donde la descomposición rápida de la materia orgánica lleva al establecimiento de un medio ambiente anóxico adecuado para la metanogénesis son los suelos inundados. Estudios de las actividades microbianas han probado cambios temporales en suelos incubados bajo condiciones en las que se desarrolló la anaerobiosis, tal como debe ocurrir en la naturaleza. Los aceptores de electrones que disminuyen el potencial redox son metabolizados secuencialmente en correspondencia a la distribución con la profundidad de las mismas actividades en los ambientes sedimentarios. Por tanto, el  $O_2$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $NO_3^-$  y  $SO_4^{2-}$  deben ser usados progresivamente antes de que se produzca  $CH_4$ . Antes de que se llegue a verificar la metanogénesis, el Eh debe disminuir a menos de -200 mV. (Mah et al., 1977).

Se halló que después del establecimiento de las condiciones reductoras en los suelos inundados se acumularon  $CO_2$ , ácido acético y cantidades menores de ácido fórmico, pero los ácidos acético y fórmico desaparecieron casi completamente y los niveles de  $CO_2$  disminuyeron ligeramente en la medida en que se produjo metano.

En las ciénagas, la metanogénesis ocurre más rápidamente. Los ácidos acético, fórmico y el  $CO_2$  se incrementan de nuevo inicialmente y los ácidos orgánicos dismi-

nuyen a bajos niveles cuando se produce metano. La glucosa, sacarosa, almidón, ácido péctico, celulosa, peptona, gelatina, lactato, acetato, butirato y propionato, aumentan la acumulación de ácidos grasos volátiles, el  $H_2$  y el  $CO_2$  y la consecuente formación de  $CH_4$ .

El metano es producido por la reducción del  $CO_2$  y a partir de la reducción del grupo metilo del acetato en los suelos inundados.

En cambio, en los suelos arcillosos, la producción de metano puede depender de otras variables ambientales - aparte de aquellas que definen el nicho de las bacterias metanogénicas. Existen limitaciones en la temperatura y la velocidad máxima de la metanogénesis a partir de suelos inundados; se ha reportado tan alta como  $40^\circ C$  la primera.

### II.5.3. Sistemas Digestivos Animales

El sistema digestivo animal metanogénico mejor conocido es el rumen de los herbívoros. Sin embargo los tractos digestivos de los no rumiantes, incluidos los humanos, también son capaces de producir pequeñas cantidades de metano. Los avances más recientes e importantes en la metanogénesis del rumen han sido estudios de transferencias de  $H_2$  interespecies entre bacterias metanogénicas y no metanogénicas y la mayoría concuerdan en seña



lar que es el rumen donde el hidrógeno es aparentemente el principal sustrato para la metanogénesis; las bacterias metanogénicas juegan un papel en el establecimiento del equilibrio de fermentación por su influencia en el flujo del poder reductor hacia la producción del metano. (Mah et al., 1977).

Desde luego, la metanogénesis también puede inducirse con fines económicos en los llamados digestores anaeróbicos (Toerien y Hattingh, 1969), pero como queda fuera de los propósitos de este trabajo, se remite al lector a la referencia bibliográfica que se da al efecto.

La ecología de las bacterias metanogénicas presenta rasgos de una interrelación más compleja de lo que a simple vista parece.

Reeburg y Heggie, en 1977 reunieron la información que hasta la fecha se disponía sobre la metanogénesis en ambientes de agua dulce y marina en una revisión, y elaboraron unos perfiles de distribución señalando que existen diferencias en las distribuciones de metano en los sedimentos y el agua adyacente que los cubre entre los ambientes marinos y de agua dulce, asentando que dichas diferencias pueden explicarse por las actividades de las bacterias reductoras de sulfato y parecen ser el resultado de cambios en la concentración de  $SO_4^{2-}$  entre los ambientes dulces y marinos.

La hipótesis planteada es que, siendo similares los procesos físicos de mezclado en los sedimentos lacustres y marinos, es posible comparar las distribuciones de  $\text{CH}_4$  y obtener información sobre las similitudes y/o diferencias en las reacciones químicas que ocurren en estos ambientes.

Por lo tanto, las diferencias observadas deben corresponder a algún proceso general responsable de ellas.

Y dicho proceso parece ser la actividad bioquímica de las bacterias reductoras de  $\text{SO}_4^{2-}$ .

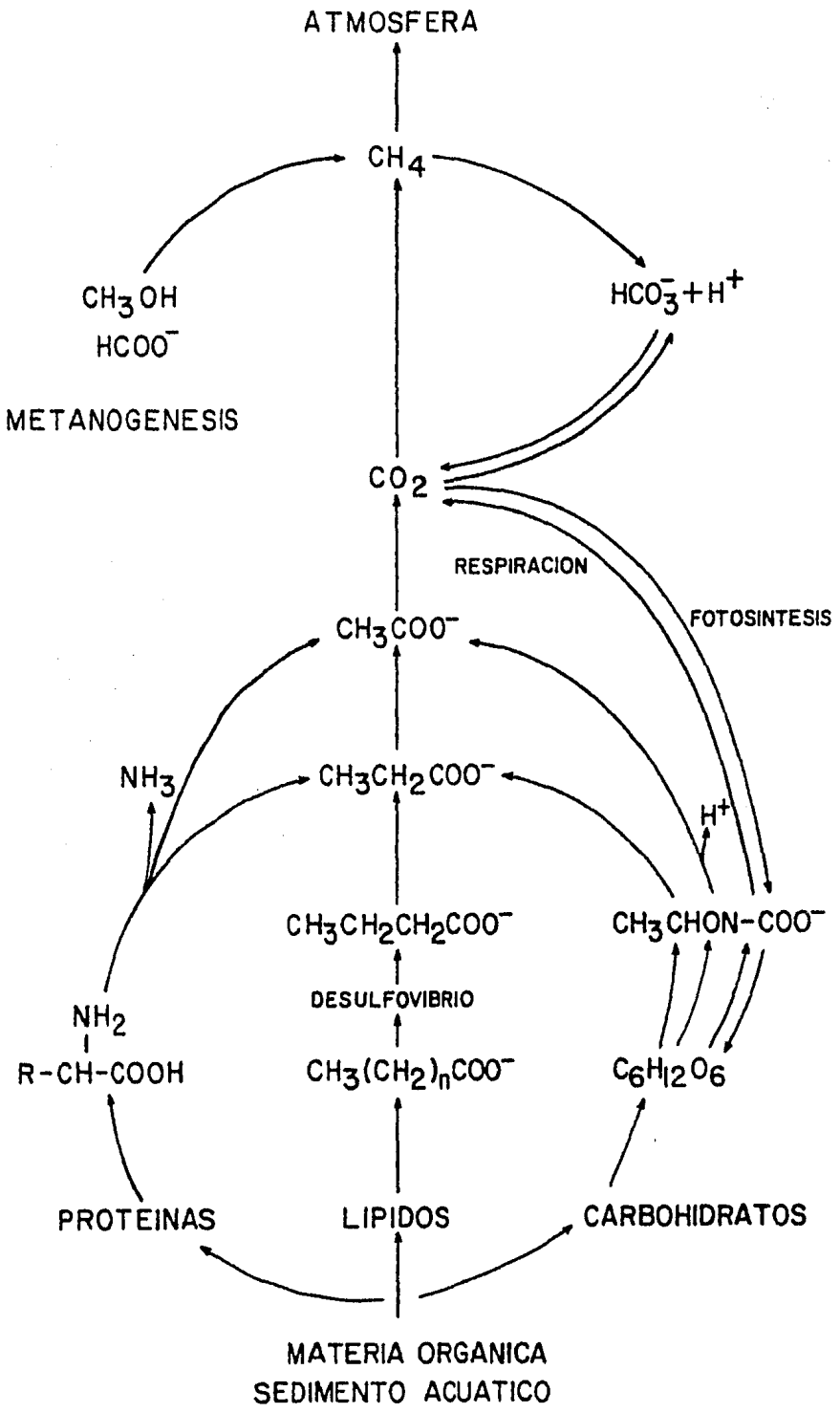
El papel en que intervienen las bacterias metanogénicas en la naturaleza es muy importante ya que en los sedimentos donde abunda la materia orgánica, como estuarios, lagunas costeras y sedimentos marinos del piso oceánico existe una biodegradación hecha por microorganismos que contribuyen con diferentes productos metabólicos, los cuales a su vez son sustratos utilizables para otros microorganismos en sus vías anabólicas, formando así un complejo esquema metabólico donde forman parte importante las metanobacterias, siendo complementaria su colaboración en el ciclo del carbono así como del azufre.

En los sedimentos con abundante materia orgánica existe microflora y microfauna que habitan y degradan las complejas macromoléculas o compuestos menos difíciles de -

ser metabolizados siendo los lípidos, carbohidratos y proteínas dichas macromoléculas, las cuales son catabolizadas a ácidos grasos, azúcares como la glucosa y aminoácidos que serán biodegradados por diferentes grupos bacterianos a productos finales como son  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , como podrá observarse en el esquema 1.

#### II.6. Degradación de Proteínas

Las proteínas que son grandes cadenas de aminoácidos son rotas a sus unidades estructurales por medio de enzimas que tienen la microfauna del sedimento así como los microorganismos que dan como producto dichos aminoácidos, que por procesos de desaminación dan ácidos orgánicos, los cuales son utilizados por otros microorganismos para sus procesos dando metano y  $\text{CO}_2$  como productos finales, los cuales se disuelven en parte y otra cantidad escapa a la atmósfera, y así el  $\text{CO}_2$  disuelto se recicla para procesos de metanogénesis o para posteriores utilizaciones como en la fotosíntesis. (Lynn, 1979).



### II.7. Degradación de Lípidos

Así como existen organismos que utilizan proteínas, hay otros que metabolizan a ácidos grasos libres que por una reacción de oxidación producen ácidos orgánicos que son utilizados para la producción de metano y  $\text{CO}_2$ .

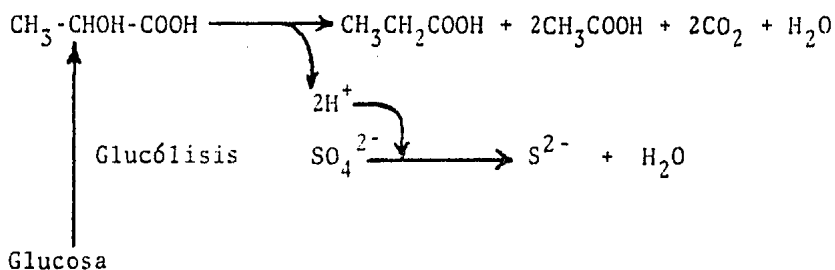
### II.8. Degradación de Carbohidratos

En los sedimentos acuáticos ricos en materia orgánica - la cual está constituida por restos de la vegetación - circundante y de la acuática que contribuyen a un gran aporte de celulosa, almidón y otros polisacáridos, que por el metabolismo bacteriano pueden ser transformados a hexosas, como glucosa, la cual es utilizada como la - fuente de carbono más accesible por la mayoría de los - microorganismos produciendo  $\text{CO}_2$  y agua en el proceso - conocido como respiración.

Existe un ciclo importante que tiene una interacción - directa con la metanogénesis, y es el del azufre.

Es llevado a cabo por las bacterias sulfo-oxidadoras y las sulforreductoras, las que respectivamente oxidan o - reducen las sales de azufre que se encuentran en el - - sedimento.

Dicho proceso está involucrado en forma directa con el proceso metanogénico, ya que las bacterias sulforreductoras que se encuentran en el sedimento, reducen a las sales en forma de sulfato, mediante la oxidación del ácido láctico que resulta como producto de la glucólisis de microorganismos actuando como donador de protones y dando como productos ácido propiónico, ácido acético y CO<sub>2</sub>, según se muestra en el siguiente esquema. (Nikaido, 1977).



Dichos ácidos son utilizados por las bacterias metanogénicas; para ello es necesario que concluya el proceso de sulforreducción en un 90% y entonces sucede la metanogénesis, ya que se ha encontrado que existe una inhibición en presencia de sulfatos; en aguas marinas con sulfatos sucede el mismo fenómeno.

Se ha visto que la interrelación ecológica entre las bacterias metanogénicas y las sulforreductoras, en relación con la concentración de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, es más compleja por

que además hay una serie de factores que están involucrados como mecanismos de control de la producción y consumo del metano (Reeburgh y Heggie, 1977).

Tales mecanismos de control son:

- 1.- Concentración de sulfato en los sedimentos
- 2.- Inhibición de la metanogénesis por el aumento en la concentración de sulfuro.
- 3.- Aporte de materia orgánica al sedimento
- 4.- Oxidación anaerobia del metano
- 5.- Oxidación aerobia del metano
- 6.- Difusión del metano a lo largo de la columna de agua

#### II.8.1. Concentración de Sulfato en los Sedimentos

La mayoría de los estudios han demostrado que existe una estrecha relación, entre la concentración de sulfato y la biosíntesis del metano en los sedimentos señalando presencia de una zona de reducción de  $SO_4^{=}$ , en el límite de la interfase sedimento-agua, en la cual la población de bacterias sulforreductoras es máxima en contraposición con la escasa población de bacterias metanogénicas.

Dicha zona de reducción de sulfato es dependiente del aporte de sulfatos al sedimento. En el caso de los lagos que sufren cambios estacionales de distribución de sus aguas a diferentes profundidades, se ha demostrado que, los niveles de sulfato son variables, en tanto que en los lagos estratificados (con poco o ningún recambio de aguas), se favorece la depositación de sulfato y por lo tanto el establecimiento de zonas anóxicas, debidas al intenso metabolismo de  $\text{SO}_4^{=}$  a  $\text{S}^{=}$  mediado por las bacterias reductoras del sulfato.

#### II.8.2. Inhibición de la Metanogénesis por el Aumento de la Concentración de iones Sulfuro ( $\text{S}^{=}$ )

El sulfuro producido en la reducción del sulfato actúa como un potente inhibidor de la síntesis de metano a  $\text{pS}^{2-}$  menores o iguales a 10.5 (Reeburgh y Heggie, 1977). Otros resultados muestran también que la producción de metano no es inhibida en presencia de 160 mg de sulfuro por 100 g de peso de sedimento (Nikaido, 1977).

#### II.8.3. Oxidación Aerobia del Metano

La distribución del metano en agua dulce y marina difieren en relación a los requerimientos del sustrato, y las velocidades de reacción de bacterias que utilizan dicho gas oxidándolo para producir  $\text{CO}_2$  y carbonatos, dando



con ello que las reacciones de consumo, más que las de producción, sean los procesos más importantes que controlan dicha distribución

La reacción principal de consumo de metano en los medios ambientes de agua dulce es: la oxidación aeróbica, que se localiza en la columna de agua en el límite metano-oxígeno durante la estratificación en el verano de tal manera que las distribuciones de metano abajo de este límite están gobernadas por su producción y transporte.

Las concentraciones de sulfato en aguas dulces son menores que en sistemas marinos, que son  $10^3$  veces mayores, dando con esto una inhibición de la producción de metano por  $S^{2-}$  hasta que la concentración de sulfato se agote.

Por lo que, en lagos los perfiles de metano en columnas de agua son más variables que en las distribuciones marinas y la concentración de metano es mucho más alta que la encontrada en ambientes marinos ya que se acumula en grandes concentraciones en los lagos estratificados más que en océano abierto, en cuencas marinas anóxicas.

#### II.8.4. Aporte de la Materia Orgánica al Sedimento

Como ya se mencionó el aporte de la materia orgánica al sedimento es determinante para la producción de metano en el mismo, ya que al aumentar la depositación de materia orgánica se favorece el metabolismo aneróbico, dando como uno de sus productos finales el metano.

#### II.8.5. Oxidación Anaerobia del Metano

El metano producido por las metanobacterias difunde en la columna de agua, siendo una parte de dicho gas oxidado anaeróticamente por reductoras de sulfato dando proporciones bajas de lactato en el medio; esto es posible termodinámicamente, lo cual fue demostrado en experimentos de laboratorio hechos por Feely y Kulp (1957).

Pero se conoce poco de la oxidación anaeróbica del metano para determinar si un grupo distinto de organismos es el responsable o si el proceso representa otra relación comensal o posiblemente un eslabón simbiótico entre las reductoras de  $\text{SO}_4^{2-}$  y los productores de  $\text{CH}_4$ .

La oxidación anaeróbica produce una zona superficial de baja concentración sirviendo como barrera efectiva para la transferencia del metano a través de la interfase sedimento agua.

La distribución de metano en los sedimentos marinos muestra una zona superficial de concentración baja por encima de una zona donde la concentración aumenta con la profundidad. Esta característica no existe en los sedimentos de agua dulce.

El rango de concentración de metano observado en los ambientes de agua dulce, existe por las diferencias en las condiciones redox en los medios ambientes individuales, así como en la naturaleza y cantidad de las fuentes de carbono orgánico. El metano de la columna de agua debe ser originado previamente por difusión desde los sedimentos.

La oxidación aeróbica del metano se lleva a cabo en una zona de la columna de agua, situada en el límite superior de la interfase sedimento-agua (zona anóxica), donde existen concentraciones bajas de oxígeno que favorece la población de bacterias oxidantes del metano. Estas bacterias captan el metano procedente de los sedimentos y lo oxidan a carbonatos y  $\text{CO}_2$  siendo esto demostrado en los estudios sobre la captación y diagénesis de los sedimentos marinos.

El sulfato nunca es un factor limitante en las columnas de aguas marinas, solo en los sedimentos cuando su consumo por los sulforreductores excede la rapidez de suministros de aguas inmediatas superiores.

## II.9. Principios Generales de Aislamiento

Las bacterias metanogénicas son organismos quimiolitótrofos debido a su capacidad para oxidar el hidrógeno y reducir el  $\text{CO}_2$  como una fuente de energía. Algunos miembros son autótrofos y usan  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$  como únicas fuentes de energía y de carbono.

La especie Methanobrevibacter ruminantium requiere acetato como su principal fuente de carbono y se comporta más como un heterótrofo que como autótrofo.

Muchas especies obtienen energía mediante el metabolismo del formiato y una especie metaboliza metanol o acetato.

En general, los requerimientos nutricionales pueden ser simples o complejos. Sin embargo, debido a que las bacterias metanogénicas dependen de otras bacterias para obtener sus nutrientes esenciales en sus hábitats, los medios de aislamiento usualmente incluyen un amplio rango de nutrimentos para aumentar las probabilidades de

que puedan crecer en ellos. Todos los metanógenos aislados parecen requerir  $\text{NH}_4^+$  como fuente de nitrógeno. También necesitan factores de crecimiento específicos y el acetato es un estimulante del crecimiento

Aunque algunos metanógenos crecen autotróficamente en medios minerales; la mayoría requieren de factores de crecimiento adicionales, como metales traza, vitaminas, acetato, aminoácidos y otros. Casi todos los metanógenos parecen ser estimulados por la adición al medio de nutrimentos complejos, tales como el extracto de levadura. Para el aislamiento y los cultivos de mantenimiento, se prefieren los medios complejos a los medios minerales. Esto facilita la detección de contaminantes que de otra forma serían suprimidos en el medio mineral.

Para el aislamiento de nuevas cepas de la naturaleza es mejor agregar nutrimentos extraídos del hábitat del inóculo, que provee de factores de crecimiento que puedan estar presentes. Por ejemplo, el líquido sobrenadante de un digestor anaeróbico de tratamiento de desechos, pueden ser adicionando a una concentración final de 33% que provee factores de crecimiento para los metanógenos en los digestores de lodos anaeróbicos.

La mayoría de los metanógenos utilizan sulfuros como fuente de azufre a bajas concentraciones, ya que un aumento de la concentración de estos en el medio actúa como inhibidor de la metanogénesis, pero algunos requieren fuentes orgánicas de azufre.

Es muy importante controlar el pH de los medios de aislamiento o cultivo de las bacterias metanogénicas, ya que la mayoría crecen a pH cercano a la neutralidad, entre 6.5 - 7.5. El crecimiento no ocurre abajo de un pH 6.0 o arriba de pH 8.0, siendo las excepciones Methanococcus vaniellii (8.0 - 8.5) y Methanobrevibacter arboriphilus (7.5 - 8.0)

El rango de temperatura para el crecimiento de las metanogénicas, es de 30° - 40°C, siendo por esto mesófilas, con una producción máxima de gas metano a una temperatura más cercana a los 40°C.

Methanobacterium thermoautotrophicum es el único termófilo extremo que hasta ahora ha sido aislado; su temperatura óptima está entre 65 y 70°C. Se ha reportado una cepa moderadamente termofílica de Methanosarcina que crece con una temperatura óptima de 50°C. No se han aislado cepas psicrófilas, aunque su ocurrencia es esperada basándose en la distribución del metano biogénico en los sedimentos anaeróbicos marinos y de agua dulce.

No hay medios selectivos disponibles para el aislamiento directo de una especie determinada de metanógenos.

Sin embargo, la cicloserina y la penicilina se utilizan como agentes selectivos para el aislamiento de la cepa termofílica de Methanosarcina. Esto se debe a que estos organismos no poseen peptidoglicanas en su pared celular, y por ello son resistentes a los antibióticos que interfieren con la síntesis de peptidoglicanas.

Los requerimientos nutricionales de los metanógenos varían. M. ruminantium parece ser uno de los más difíciles de obtener en cultivo puro, y M. thermoautotrophicum el más fácil. Methanobacterium y Methanobrevibacter pueden ser fácilmente aislados usando acetato o metanol como sustratos.

#### II.9.1. Técnicas para el Cultivo de Bacterias Metanogénicas

Los procedimientos para la preparación de los medios de cultivo y para los cultivos de transferencia, se hacen bajo una atmósfera libre de oxígeno. Para esto se utiliza nitrógeno, hidrógeno, dióxido de carbono, argón, helio o mezclas de ellos.

En la elaboración del medio de cultivo, la solución se calienta para expulsar cualquier cantidad de oxígeno disuelto.

La resazurina se adiciona al medio como un indicador redox. Sin embargo actúa inicialmente como un indicador de pH, virando de color azul, que indica pH alcalino, a rojo si está a pH ácido. Una vez que está reducida a su forma incolora de resorufina actúa solo como indicador redox, tornándose rosa cuando esta oxidada e incolora al reducirse.

Después del calentamiento durante unos minutos, se deja enfriar el medio y se adiciona un agente reductor como el clorhidrato de cisteína. El pH se ajusta entre 6.8 - 7.0 el cual se obtiene después del esterilizado y de la mezcla de todos los componentes del medio. Los compuestos volátiles o los que se desnaturalizan con el calor, se agregan después usando una jeringa hipodérmica estéril. La adición de bicarbonato de sodio antes de la esterilización puede resultar una pérdida de  $\text{CO}_2$  durante la gasificación con otros gases aparte de  $\text{CO}_2$  y puede cambiar el medio a un pH alcalino.

Para bajar el Eh hasta un valor suficiente que permita el crecimiento de los metanogénicos, se utiliza sulfuro de sodio como agente reductor final, después de la esterilización del medio. El sulfuro de sodio se prepara en una solución concentrada estéril y anaeróbica.



Generalmente es posible obtener un buen crecimiento de bacterias metanogénicas cuando el valor de Eh de medio es menor de -300 mV.

### II.9.2. Método de la Cámara de Anaerobiosis

Los cultivos puros de bacterias metanogénicas también se pueden obtener mediante el uso de placas Petri, sembrando en la forma convencional dentro de una cámara de anaerobiosis modificada de tal manera que contenga una cámara de reducción ultra-baja de oxígeno y una vez preparados los medios son incubados e inoculados previamente durante 48 hrs, como mínimo (pero aún son adecuados después de 1 mes) en la cámara.

Durante la incubación, la cámara es periódicamente gasificada con  $H_2 + CO_2$  (80:20). Las colonias metanogénicas pueden ser identificadas mediante el examen de la caja Petri bajo luz UV de onda larga, la cual provoca una fluorescencia típica de las colonias metanogénicas debido a la presencia del factor  $F_{420}$ , que es un mononucleótido de 5-diazoriboflavina, único para las bacterias metanogénicas. Posteriormente a esta prueba, las colonias que muestran dicha fluorescencia son de nuevo sembradas para su aislamiento.

### II.9.3. Cultivos de Enriquecimiento

El presente estado del conocimiento de los metanógenos - claramente describe su papel como una asociación ecológica obligada en la conversión anaeróbica de compuestos orgánicos a  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Este papel está mejor ilustrado en la asociación de los metanógenos con otras bacterias heterotróficas vía reacciones de transferencia de  $\text{H}_2$  interespecies, como se demostró primero en Methanobacterium "omelianskii" (M. bryantii).

Esta asociación comprende un organismo no metanogénico (organismo "S") sensible al  $\text{H}_2$  y oxidante de etanol que crece con el M. bryantii, el cual oxida al  $\text{H}_2$  y no utiliza etanol. La interrelación obligada entre estas especies, cuando se recen en un medio que contiene etanol, se pone en evidencia mediante la formación de hidrógeno por el oxidante de etanol (Organismo "S") y la utilización del  $\text{H}_2$  por el metanógeno (M. bryantii).

Este tipo de asociación sirvió como ejemplo del tipo de reacciones de transferencia de hidrógeno que ocurre en la Naturaleza y junto con las complejas relaciones nutricionales entre los miembros de la población bacteriana mezclada, ha contribuido a las dificultades de cultivo asociadas con las metanógenas.

Un modelo de la interrelación de los diversos metabolismos utilizadores de  $H_2$  en la naturaleza, se ofrece en la figura 2.3.

El modelo da una idea de la competencia existente entre muchas especies por la captación de la energía derivada de la oxidación del hidrógeno.

Por otra parte, todos los medios de enriquecimiento diseñados para el desarrollo de metanobacterias deben tomar en cuenta estas complejas necesidades y relaciones nutricionales para asegurar su crecimiento.

La metodología que se sigue para fabricar un medio de enriquecimiento destinado al cultivo de metanógenas es muy variado de acuerdo con la bibliografía disponible.

Entre los medios de enriquecimiento propuestos como los más efectivos están el de Baker, el de Baresi y el utilizado en el presente trabajo.

Como inóculo pueden usarse:

- a) sedimentos acuáticos (marinos y de agua dulce)
- b) lodos de aguas negras
- c) cienos
- d) contenidos de rumen
- e) desechos animales

El medio de enriquecimiento de Bakcer contiene:

NaCl	0.1%
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.04%
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.01%
Sustrato orgánico	1.2%
pH	7.0
Agua corriente	q.s

Posteriormente, se agrega al medio 0.15% de  $Na_2CO_3$  y 0.03% de  $Na_2S \cdot 9H_2O$  para preservar las condiciones anaeróbicas.

La función del  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (ó  $\text{NaHCO}_3$ ) es para amortiguar cerca de la neutralidad. P. ej., se agrega de 0.2-0.25% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  considerando que se halla 5% de  $\text{CO}_2$  en fase gaseosa.

El  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  es el agente reductor tradicional. Se puede incorporar resazurina como indicador de óxido-reducción a una concentración de 0.0001%.

El medio de Baresi (1978) tiene la composición siguiente, para bacterias metanogénicas utilizadoras de acetato:

$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.1 g/100 ml
$\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.4 "
$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 "
Acetato de calcio (anh.)	2.0 "
Carbonato de calcio	10.0 "
Atmósfera	100.0% $\text{N}_2$

Todas estas sustancias se disuelven en agua corriente y el pH se ajusta a la neutralidad. Después de agregar soluciones estériles de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (3 ml de una solución al 1%) y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 ml de una solución al 5% y se lleva a 100 ml de medio estéril).

Este tipo de medio, con acetato de calcio como sustrato, resulta adecuado para el crecimiento de Methanosarcina.

Estos medios se incuban en un rango de temperatura de 30-37°C durante 30 días.

Para los medios descritos se han propuesto las siguientes modificaciones, para facilitar el desarrollo de la mayoría de las especies metanogénicas.

1. Se pueden usar mezclas de  $H_2 + CO_2$  (80:20) como atmósfera enriquecedora para los metanógenos autotróficos. También se pueden agregar soluciones de sales conteniendo minerales traza o cantidades pequeñas de factores de crecimiento o de nutrimentos orgánicos complejos tales como mezclas de vitaminas.

Como sales inorgánicas se usan, a diferentes combinaciones y cantidades:

$KH_2PO_4$	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$
NaCl	$ZnCl_2$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	$H_3BO_3$
$MgCl_2 \cdot 4H_2O$	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	Acido nitrilotriacético
$NH_4Cl$	

Los factores de crecimiento son soluciones de vitaminas que contienen regularmente.

Clorhidrato de tiamina	Acido fólico
D-Pantotenato de calcio	Vitamina B <sub>12</sub>
Nicotinamida	Acido nicotínico
Riboflavina	Acido 2-lipoico
Clorhidrato de piridoxina	PABA
Biotina	

2. El  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  se recomienda utilizarlo a una concentración no mayor de 0.3 g/lt.
3. Si se usa formiato como fuente de C en vez de  $\text{CO}_2$  y se reemplaza con  $\text{N}_2$  ó  $\text{N}_2 + \text{CO}_2$  (80:20), entonces el formiato, el metanol o el acetato pueden servir como el principal sustrato metanogénico.
4. Otros sustratos que bajo determinadas condiciones pueden ser metanogénicos (generalmente en cultivos mezclados) son:

Acido benzoico	Isopropanol
Acido butírico	Pentanol
Acido propiónico	Butanol
Acetona	Isobutanol
Propanol	Valerato
	Caproato

Una alternativa que se ha mostrado eficaz en el intento de obtener cultivos puros de bacterias metanogénicas, la constituye el uso de cultivos axénicos con formulaciones de medios que delimitan los requerimientos para crecer de un metanógeno particular bajo cultivo.

Algunos metanógenos tienen requerimientos de factores de crecimiento específicos y muchos de tales factores no se han podido identificar. Por esta razón, los medios em - pleados para el aislamiento y mantenimiento de rutina de los cultivos metanogénicos a menudo incluyen nutrimentos complejos. Los medios estimulantes, que simulan las con - diciones del hábitat natural, pueden diseñarse mediante la adición de fluidos sobrenadantes o extracto acuoso - proveniente del hábitat natural de los metanógenos.

Concentraciones finales del 33% de fluido de rumen, - - extracto de cieno (sedimento) o de líquido sobrenadante de lodos de aguas de desecho (o digestores anaeróbicos) pueden proporcionar los factores de crecimiento desconocidos existentes en el hábitat natural.



## II.10. Métodos de Identificación de las Bacterias Metanogénicas.

Las técnicas que se han usado para la identificación tentativa de las bacterias metanogénicas son:

1. Microscopía de contraste de fases
2. Microscopía de fluorescencia
3. Observación de fluorescencia de colonias de metanógenos frente a la luz UV.
4. Detección de metano en medios de cultivo líquidos mediante cromatografía de gases.
5. Morfología típica y reacción al Gram.

De todas ellas, la microscopía de fluorescencia y la detección de  $\text{CH}_4$  por cromatografía de gases son las más confiables.

### II.10.1. Microscopía de Contraste de Fases.

La observación de la morfología típica de las bacterias metanogénicas mediante la técnica microscópica del contraste de fases es un método útil para evidenciar, en forma tentativa, la presencia de estas bacterias en cultivos axénicos.

Debido a las limitaciones que impone una simple observación

microscópica, esta técnica se usa en forma rutinaria sólo para la observación y verificación del tipo de desarrollo; generalmente se combina con otra técnica de identificación.

En la sección correspondiente a MATERIALES Y METODOS podrá encontrarse la referencia al desarrollo de esta técnica.

#### II.10.2. Morfología y Reacción a la Tinción de Gram.

La reacción a la tinción de Gram es una prueba de identificación morfológica para bacterias en general y en el caso de las bacterias metanogénicas, algunas son Gram variables, por lo que constituye una prueba útil que forma parte en un cuadro general de las pruebas de identificación para estos microorganismos.

La técnica de la tinción de Gram se describe en la sección de MATERIALES Y METODOS y las características a la tinción de Gram de las bacterias metanogénicas, en la discusión correspondiente a las CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y FISIOLÓGICAS.

### II.10.3. Observación de Fluorescencia en Colonias de Metanógenos a la luz UV.

Las bacterias metanogénicas tienen dos coenzimas, llamadas factor 420 ( $F_{420}$ ) y factor 350 ( $F_{350}$ ), las cuales presentan la propiedad de emitir fluorescencia a las longitudes de onda de 450 y 350 nm, respectivamente, cuando son excitadas por la radiación UV de amplio espectro.

Debido a esta propiedad, única de los metanógenos, se ha desarrollado una técnica para la identificación preliminar, de colonias de bacterias metanogénicas por observación de esta fluorescencia bajo la luz emitida por una lámpara UV.

Mink y Dugan (1977) afirman que se puede hacer una identificación preliminar de bacterias metanogénicas, diferenciándolas de otras que no lo son en cultivo puro o mezclado, en base de esta autofluorescencia bajo iluminación ultravioleta, existiendo la posibilidad de que otras bacterias no metanogénicas presenten fluorescencia similar (Edwards y McBride, 1975).

El aspecto de las colonias de bacterias metanogénicas, cuando se hace incidir luz UV de onda larga sobre el crecimiento en una caja de petri, es similar a manchas blancas brillantes, siendo discernible la fluorescencia debida al  $F_{420}$  (amarillo-verdoso) de la del  $F_{350}$  (azul-blanco),

aunque la primera puede ser observada en colonias no metanogénicas (Edwards y McBride, 1975).

Zeikus (1979) encontró que en la fase de crecimiento activo de las metanobacterias el factor ( $F_{420}$ ) existe en un estado parcialmente oxidado, el cual es excitado al hacerle incidir luz UV de onda larga, produciendo así una oxidación completa y la emisión de la fluorescencia.

No obstante, esta prueba no siempre resulta confiable debida a que los cultivos viejos pierden la capacidad de emitir fluorescencia. (Edwards y McBride, 1975).

#### II.10.4. Microscopía de Fluorescencia.

Esta técnica se propone como la más útil y confiable para la identificación de metanógenos, pues presenta la ventaja de que para realizar las observaciones no es necesario tomar las precauciones que son necesarias para el cultivo en anaerobiosis, dado que los pigmentos  $F_{420}$  y  $F_{350}$  fluorescen en su estado oxidado (Mink y Dugan, 1977).

Aunque es posible hacer observaciones hasta las 24 h después de la exposición de las células al oxígeno, la limitación de este procedimiento está en que no elimina la posibilidad de que células no viables puedan presentar fluorescencia (Mink y Dugan, 1977).

El desarrollo de ésta técnica microscópica para bacterias metanogénicas, fué logrado por Doddema y Vogels (1978) basados en los trabajos de Gunsalus y Wolfe sobre la presencia y función de las coenzimas  $F_{420}$  y  $F_{350}$  descritas como compuestos únicos de las bacterias metanogénicas (Doddema y Vogels, 1978).

La descripción detallada de la bioquímica de estas coenzimas como acarreadores  $C_1$  en la reducción de  $CO_2$  a  $CH_4$  es mencionado en la revisión hecha por Zeikus sobre la biología de estos microorganismos (Zeikus, 1979).

Doddema y Vogels (1978) usaron la microscopía de fluorescencia en contraste de fases, empleando un sistema de filtros especiales para haces generados por una lámpara de luz UV, y obtuvieron micrografías en fases, con fluorescencia, de varias bacterias metanógenas.

Como se había mencionado la limitación del método es que hay otras bacterias que presentan fluorescencia a la longitud de onda de 420 nm, en particular, E. coli y P. aeruginosa; sin embargo, ninguna bacteria estudiada hasta el momento presenta fluorescencia a 350 nm salvo las metanogénicas, y debido a esto, resulta la posibilidad de descartar la presencia de las dos anteriores, cuando se hacen observaciones para la fluorescencia emitida a dicha longitud de onda de 350 nm.

Doddema y Vogels (1978), encontraron que la fluorescencia en la excitación a 420 nm presenta un color amarillo verdoso, no así a 350 nm, siendo ésta última de un color blanco azulado. Además notaron que la fluorescencia debida a la excitación en 420 nm es más intensa que en la de 350 nm.

#### II.10.5. Detección de Metano por Cromatografía de Gases.

El uso de la cromatografía de gases para el análisis del contenido de  $\text{CH}_4$  en fase gaseosa en cultivos líquidos en anaerobiosis ha demostrado ser un recurso muy útil como prueba inequívoca de la presencia de bacterias metanogénicas en los cultivos. Y combinada con las técnicas de microscopía descritas forman la mejor alternativa para la identificación de estos microorganismos.

Bajo condiciones de anaerobiosis controladas, los cultivos líquidos en los que es detectada la presencia de  $\text{CH}_4$ , en la fase gaseosa constituyen una prueba definitiva de que este fue producido por bacterias metanogénicas presentes en la fase líquida, ya que es usado el nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) ó mezclas de  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  (80:20) por lo que el metano detectado es producto del metabolismo de las bacterias metanogénicas desarrolladas en el medio de cultivo. En este sentido constituye una prueba de identificación evidente.

De este modo, el análisis de metano en la fase gaseosa de cultivos crecidos bajo condiciones apropiadas de anaerobiosis que permiten el desarrollo de las bacterias metanogénicas constituye una prueba de identificación muy evidente.

II.11. Descripción de las Especies de Bacterias Metanogénicas  
(Mah y Smith 1981).

II.11.1. Propiedades Morfológicas.

La diversidad morfológica de los metanógenos comprende formas:

- a. Bacilo
- b. Coco
- c. Espirilo

Las bacterias en forma de un bacilo largo a filamentoso se asignan al género Methanobacterium.

Los bacilos cortos y los cocobacilos son colocados en los géneros Methanobrevibacter y Methanomicrobium.

Los cocos pequeños están en los géneros, Methanogenium y Methanococcus.

Las grandes pseudosarcinas cocoides están en el género Methanosarcina.

El único espirilo conocido está asignado al género Methanospirillum.

Se han reportado metanógenos formadores de esporas, pero esto no ha podido verificarse en cultivo puro.

También se han reportado vacuolas de gas presentes en un género, Methanosarcina.

#### Methanobacterium formicicum

Morfología. Bastones largos, con anchura desde 0.4-0.8 micrómetros. La longitud varía desde unos pocos um hasta filamentos grandes o cadenas. Los cultivos en medio líquido pueden tener una tendencia a formar pequeños cúmulos de filamentos intermezclados, grandes y enroscados. Esto es especialmente cierto en cultivos muy viejos. También exhiben crecimiento uniforme disperso, particularmente en los cultivos jóvenes. Descrito como Gram negativo (-) por Mylorie y Hungate en 1954 y como Gram positivo (+) por Bryant en 1974.

Colonias. En tubos rotados aparecen pálidas y esféricas con bordes filamentosos. Pueden aparecer también arborescentes. Las colonias tardan en aparecer aproximadamente 3 días a una semana en  $H_2+CO_2$  a 37°C.



Propiedades fisiológicas. Usan como fuente de energía  $H_2+CO_2$  o formiato. No se han reportado requerimientos de factores de crecimiento y pueden crecer autotrófica mente en medio mineral. Son inmóviles.

Propiedades distintivas. La habilidad para usar el formiato y para crecer a temperaturas mesofílicas coloca estas especies aparte de las otras en el género.

Methanobacterium bryantii

(Methanobacterium cepa M.O.H.)

Morfología. Bacilos largos de 0.5-1.0 micrómetro de ancho - creciendo solos o como cadenas o filamentos. Gram positivo (+) o Gram variable.

Colonias. Las colonias profundas son descritas como redondeadas y filamentosas. Las colonias superficiales son grises y llanas con bordes difusos o filamentosos y pueden tener de 1-5 mm de diámetro. Las colonias - usualmente aparecen dentro de una semana.

Propiedades fisiológicas. El crecimiento ocurre a temperaturas mesofílicas con  $H_2+CO_2$  como fuente de energía. No usan el formiato pero requieren  $NH_4^+$  como fuente de nitrógeno. El acetato no es requerido pero es estimuladorio. Las vitaminas B y la cisteína - -

pueden requerirse y son altamente estimulantes para el crecimiento. El crecimiento es pobre cuando se omiten las vitaminas.

Propiedades distintivas. Bacilos grandes, largos, inmóviles, Gram positivos (+) o Gram variables que usan  $H_2+CO_2$  pero no formiato crecen a temperaturas mesofílicas. Esta especie es el socio metanogénico aislado de - "Methanobacillus omelianskii".

#### Methanobacterium thermoautotrophicum

Morfología. Bacilos largos o filamentos. Los bacilos tienen de 3-7 micrómetros de longitud y de 0.4-0.6 micrómetros de ancho. Pueden hallarse filamentos largos que exceden los 100 micrómetros de longitud. Son Gram positivos (+) e inmóviles. La morfología está influenciada por las condiciones de crecimiento, especialmente la temperatura. Los filamentos tienden a ondularse a temperaturas abajo de los 40°C o arriba de los 75°C.

Colonias. Pálidas, tostadas y redondas; difusas y en algunas ocasiones filamentosas.

Propiedades fisiológicas. M. thermoautotrophicum, es el único metanógeno termofílico extremo descrito. Crece óptimamente a 65-70°C pero no abajo de los 40°C.

El  $H_2+CO_2$  es la única fuente de carbono. No requiere de factores orgánicos de crecimiento. Este organismo crece muy rápidamente y tiene un tiempo de generación de 2-5 h. Los cultivos líquidos pueden terminar su crecimiento en 24 h. Recientemente se ha reportado un requerimiento por los metales traza Ni, Co, Mo y Fe. Crece autotróficamente en medio mineral.

Propiedades distintivas. El crecimiento autotrófico a 65-70°C sirve para separar esta especie de todos los otros metanógenos descritos. La morfología característica y su incapacidad para usar otros substratos aparte de  $H_2+CO_2$  para crecer y la metanogénesis facilitan su identificación.

Methanobrevibacter ruminantium

(Methanobacterium ruminantium M1)

Morfología. Bacilos cortos o cocos de forma de lanceta. A menudo crecen en pares o cadenas y se asemejan a los estreptococos. Son Gram positivos (+) con dimensiones (los bacilos) de 0.7 por 0.8-1.8 micrómetros.

Colonias. Las colonias son ligeramente amarillas, translúcidas, convexas y circulares con los márgenes enteros.

Generalmente aparecen dentro de los 3 días a 37°C y pueden alcanzar un diámetro de 3-4 mm en 3 semanas.

Propiedades fisiológicas. Esta especie crecerá bien en  $H_2+CO_2$  o formiato como fuentes de energía. El crecimiento puede ser lento en formiato. Methanobrevibacter ruminantium es uno de los muchos metanógenos nutricionalmente exigentes. Requiere acetato y  $NH_4^+$  como las principales fuentes de carbono y nitrógeno. Además, M. ruminantium requiere aminoácidos, 2-metilbutirato y 2-mercaptoetansulfato (coenzima M) para crecer.

La coenzima M puede ser suministrada mediante la adición de fluido de rumen al medio de crecimiento. Smith y Hungate indicaron que M. ruminantium puede ser inmóvil. Más recientemente, se le describió como inmóvil o pobremente móvil.

Propiedades distintivas. Bacilos cortos, inmóviles, Gram positivos (+) que crecen en  $H_2+CO_2$  o formiato y poseen requerimientos nutricionales típicos.

Methanobrevibacter smithii

(Methanobacterium ruminantium Cepa PS)

Morfología. Idéntico a Methanobrevibacter ruminantium

Colonias. Las colonias superficiales son translúcidas amarillo pálido, convexas y circulares con los márgenes enteros.

Propiedades fisiológicas. Crecen en  $H_2+CO_2$  o formiato. Requiere acetato como fuente primaria de carbono y  $NH_4^+$  como fuente secundaria. Los cultivos son inmóviles. No requiere 2-metilbutirato, coenzima M. o aminoácidos como factores de crecimiento.

Propiedades distintivas. M. smithii fué reportado originalmente como M. ruminantium, cepa PS, aislado de lodo de aguas negras. La diferencia primaria con M. ruminantium es la ausencia de requerimiento por la coenzima M, los aminoácidos y el 2-metilbutirato.

Methanobrevibacter arboriphilus

Morfología. Bacilos cortos, finos, de 0.5-7.5 micrómetros por 1.8-3.5 micrómetros. Gram positivo (+). Inmóvil. Puede hallarse sólo, en pares y en cadenas.

Colonias. Pequeñas (menores de 0.5 mm de diámetro), coloreadas en crema, redondas, difusas y algunas veces filamentosas.

Propiedades fisiológicas. Crece y produce metano a 37° a partir de  $H_2+CO_2$  pero no de formiato. La cepa original crecerá en un medio mineral adicionado únicamente de vitaminas. Se reportó requerimiento de cisteína en una cepa (AZ). Este requerimiento podría sufragarse mediante la substitución de la coenzima M por la cisteína.

Propiedades distintivas. M. arboriphilus se diferencia de M. ruminantium y M. smithii por su morfología mas parecida a bacilo, su incapacidad para crecer o producir metano a partir de formiato y su relativa escases de requerimientos nutricionales.

Es fácilmente distinguible de Methanomicrobium mobile por reacción de Gram, pérdida de movilidad e incapacidad de usar el formiato.

Methanomicrobium mobile

(Methanobacterium mobilis)

Morfología. Methanomicrobium mobile es bacilo corto, grueso, activamente móvil, de 0.7 por 1.5-2.0 micrómetros. - Tiene un único flagelo polar. Se le halla solo; no forma cadenas. Gram negativo (-).

Colonias. Las colonias son incoloras a amarillo pálido, lisas, circulares, convexas y translúcidas con bordes enteros. Después de la incubación por 15 días, las colonias superficiales pueden alcanzar 1.0 mm de diámetro. Las colonias son visibles después de 4 días de incubación.

Propiedades fisiológicas. Crece en  $H_2+CO_2$  o formiato como fuentes de energía. Requiere la adición de fluido de rumen al medio de cultivo para suministrar factores de crecimiento no identificados. Esta especie es algunas veces difícil de cultivar; puede ocurrir la lisis después de la depleción de sustrato.

Propiedades distintivas. La características morfológicas en forma de bacilo y la movilidad activa, la reacción negativa al Gram, la utilización solamente de  $H_2+CO_2$  o formiato y el requerimiento por fluido de rumen.

Methanogenium cariaci

Morfología. Cocos Gram negativos (-); irregulares, de 2.6 micrómetros de diámetro, flagelos peritricos.

Colonias. Circulares, umbonadas con los bordes enteros. En color amarillo-verdoso con superficie brillante. Las colonias son menores de 0.5 mm en diámetro después de incubación por 2 semanas.

Propiedades fisiológicas. Crecen y producen metano a partir de  $H_2+CO_2$  o formiato. Requieren extracto de levadura y acetato para crecer. Esta bacteria es marina, crece óptimamente a 20-25°C y requiere NaCl (1.5%) para su desarrollo óptimo.

Propiedades distintivas. Morfología cocoide, movilidad, temperatura óptima baja, utilización de  $H_2+CO_2$  o formiato y el requerimiento de NaCl. El requerimiento por extracto de levadura y acetato para crecer, su gran tamaño y un 51.6 mol % de G+C lo distinguen de M. marisnigri. Ambas especies son sensibles a lisis por dodecilsulfato de sodio al 1%. Aunque M. cariaci posee flagelos peritricos, no se observó movilidad. Sin embargo, la descripción formal lo describe y M. marisnigri es poco móvil!

#### Methanogenium marisnigri

Morfología Cocos irregulares, de 1.3 um de diámetro. Las células poseen flagelos peritricos. Gram negativo (-).

Colonias Las colonias son amarillas, convexas, circulares con bordes enteros y tienen superficies brillantes.

Propiedades fisiológicas. Crece y produce metano a partir de  $H_2+CO_2$  o formiato. Requiere tripticasa pero no extracto de levadura o acetato para crecer. Este



requerimiento no es posible sustituirlo con amino-ácidos, casitona, triptona, peptona, triptosa o neopeptona en lugar de tripticasa. La temperatura óptima es de 20-25°C y crece mejor a un pH de 6.2-6.6. Al igual que M. cariaci, esta especie requiere de NaCl (0.19 M) para crecer y es un aislamiento marino. Ambas especies tienen una estructura periódica de la pared celular, tal como es posible verse al microscopio electrónico. La mol % de G+C es 61. Es lisado mediante dodecilsulfato de sodio al 13.

Propiedades distintivas. La morfología cocoide característica, la temperatura óptima baja de crecimiento y el requerimiento por NaCl identifica esta especie como un miembro del género Methanogenium. Difiere de M. cariaci por su necesidad nutricional por tripticasa para crecer pero no por el acetato o el extracto de levadura y su composición de bases del DNA. Es también más pequeño que M. cariaci.

Methanospirillum hungatei

(Methanospirillum hungatii)

Morfología. Bacilos curvados o largos, filamentos ondulantes de 0.4 micrómetros de ancho, formando cadenas de varios cientos de micrómetros de longitud. La longitud está influenciada aparentemente por las - -

condiciones nutricionales. Son Gram negativos (-): Ligeramente móviles por medio de flagelos polares. Presentan una ultraestructura característica.

Colonias. Las colonias superficiales del aislamiento original exhibían apariencia amarilla, circular y convexa con los márgenes lobulados y estriaciones características, produciendo una apariencia "plumada" en los bordes. Las colonias son menores de 3 mm de diámetro. Las colonias superficiales descritas por Patel y Cols, en 1976 eran de un azul ligero y difuso con bordes aserrados. Después de 1-2 semanas de incubación a 35°C, las colonias fueron de 1-2 mm de diámetro.

Propiedades fisiológicas.  $H_2+CO_2$  y formiato sirven como sustratos metanogénicos. El crecimiento es mejor en un medio complejo. Los aminoácidos y las vitaminas B son estimulatorios del crecimiento. Sin embargo, no necesariamente requiere factores de crecimiento; el buen desarrollo se reportó sobre medios conteniendo cisteína como la única adición orgánica. Grandes densidades de células se han reportado en medios complejos.

Propiedades distintivas. La morfología característica y la movilidad hacen de esta especie fácilmente reconocible.

Es el único espirilo metanogénico descrito. Las colonias son fácilmente reconocidas por la apariencia lobulada y estriada. Las micrograffías electrónicas de secciones finas muestran regiones "espaciadas" entre las células y una topografía poco usual de la pared celular que no se ha visto en otras bacterias.

#### Methanosarcina barkeri

Morfología. Pseudosarcinas grandes. Consisten de racimos de unidades rugosas esféricas o asimétricas de 2-3 micrómetros de diámetro agregadas en masas de unos pocos cientos de unidades. La microscopía electrónica revela que cada unidad está ulteriormente compartimentalizada en pequeñas unidades o segmentos de aproximadamente 0.5 micrómetros de diámetro. Los planos de división son al azar. Los aislados varían en detalles morfológicos incluyendo el tamaño, forma de agrupamiento, refractilidad, textura y en la claridad con la cual las unidades individuales en masa pueden ser distinguidas bajo microscopía de contraste de fases. Zhilina (1976) reportó tres variantes estables, difiriendo una de cada otra por su grado de agregación. Inmóviles. Gram positivos (+). Muchos poseen vacuolas de gas.

Colonias Las colonias aparecen en  $H_2+CO_2$  o metanol en 3 - días a una semana o en 1-4 semanas en acetato. Tienen generalmente alrededor de 1-2 mm de diámetro y pueden ser irregulares, de forma angular cuando se hayan embebidas en agar pero circulares las superficies. El color es generalmente de blanco o amarillo o tostadas a la luz.

Propiedades fisiológicas. Methanosarcina es el más versátil metabólicamente de cualquier de los metanógenos. El crecimiento y la metanogénesis generalmente ocurre en  $H_2+CO_2$ , metanol, acetato, metilamina, dimetilamina, trimetilamina o dietil metilamina. El crecimiento es más rápido en  $H_2+CO_2$ , metanol y las metilaminas. No se requieren factores de crecimiento y este puede ocurrir en un medio mineral conteniendo cualquiera de los sustratos citados arriba. Al igual que muchos otros metanógenos, el crecimiento es grandemente estimulado mediante la adición de nutrimentos complejos tal como el extracto de levadura. La mayoría de las cepas son mesofílicas, mostrando máximo crecimiento y producción de metano cerca de los  $40^\circ C$ . Un termófilo moderado fue reportado (crecimiento óptimo a  $50^\circ C$ ). Pero no creció ni produjo metano a partir de  $H_2+CO_2$ . El hidrógeno puede ser inhibitorio para el desarrollo y la - -

metanogénesis en ambas cepas termofílicas y mesofílicas bajo algunas condiciones. El mejor crecimiento se registra cerca del pH neutro.

Propiedades distintivas. La característica morfológica de pseudosarcina permite fácilmente identificar a Methanosarcina al nivel del género. Es el único metanógeno que aparece refráctil bajo microscopía de contraste de fase. Al igual que otros metanógenos, fluoresce a 420 nm y puede ser identificada en poblaciones mezcladas de muestras provenientes de digestores mediante microscopía de epifluorescencia. El uso del metanol, acetato y las metilaminas para el crecimiento y la metanogénesis es único.

#### Methanococcus vannielii

Morfología. Coco irregular de 0.5-4 micrómetros de diámetro en los cultivos jóvenes y de arriba de los 10 micrómetros de diámetro en los cultivos más viejos. Activamente móvil por medio de un penacho polar de flagelos. Las células son extremadamente frágiles. Gram negativos (-).

Colonias. Las colonias profundas son café ligero y lenticulares y de 0.5-1 mm de diámetro.

Propiedades fisiológicas. Crece en  $H_2+CO_2$  o formiato. El desarrollo óptimo sobre formiato ocurre a pH de 8.0-8.5.

La reducción de  $\text{CO}_2$  por el hidrógeno molecular ocurre a un pH de 6.5-7 pero no a pH alcalino. Requiere de selenio o tungsteno para crecer. El extracto de levadura es altamente estimulador pero puede crecer en un medio mineral que contenga formiato y cisteína como los únicos orgánicos presentes. Aunque las células son frágiles a perturbaciones mecánicas, no son, en apariencia, frágiles osmóticamente.

Propiedades distintivas. Morfológicamente Methanococcus - - vanielii se asemeja a dos especies de Methanogenium descritas arriba y a Methanococcus voltae. Puede ser diferenciado de Methanogenium por su crecimiento óptimo arriba de  $36^\circ\text{C}$ , su composición de bases del DNA (31.1 mol % de G+C) su activa movilidad y escasez de requerimiento de NaCl para crecer. Es rápidamente separable de Methanococcus voltae por su incapacidad para crecer en NaCl al 5% y por su escasa necesidad por el NaCl.

#### Methanococcus voltae

Morfología. Cocos ligeramente irregulares, de 0.5-3 micrómetros de diámetro. Su morfología está influenciada por las condiciones de cultivo. Es activamente móvil y Gram negativo (-).

Colonias. Las colonias superficiales son claras y convexas con los bordes lisos y alcanzan de 1-3 mm de diámetro.

Propiedades fisiológicas. Crece en  $H_2+CO_2$  o formiato. El crecimiento óptimo ocurre a pH de 6.7-7.4. Las células requieren de 1.2-4.8% de NaCl para crecimiento óptimo pero no crecerán si la concentración de NaCl es inferior de 0.5%. El crecimiento óptimo ocurre entre 32-40°C. El extracto de levadura es estimulador para crecer.

Propiedades distintivas. M. voltae difiere de Methanogenium por su temperatura óptima de crecimiento de 32-40°C, por su capacidad para crecer en NaCl al 0.5% y por su composición de bases del DNA (31% mol de G+C). Difere de Methanococcus vanielli primeramente por su requerimiento de sal y su más bajo pH óptimo. También tiene, aparentemente, una tasa de crecimiento en  $H_2+CO_2$  más rápida que M. vanielli.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### III.1. Muestreo

##### III.1.1. Ubicación Geográfica de los Sitios de Muestreo.

El estudio se realizó en la Laguna de Términos, que está separada del Golfo de México por la Isla del Carmen que se encuentra al Norte; ésta laguna mide 80 kilómetros de Este a Oeste y 40 kilómetros de Norte a Sur. Se inicia en la Punta de Xicalango y se dirige al Sureste hasta las bocas de las Lagunas del Pon, Atasta, Puerto Rico y Boca Chica donde vierte el Río Palizada a través de la Laguna de las Cruces, sigue al Este hasta las bocas de Balchacah (donde desemboca el río Cimpán) y de los Pargos (que expulsa las aguas de los ríos Candelaria y Mamantel) y culmina en Punta Molón, en el estero de Sabancuy, en cuyas riberas se halla la población de este nombre (S.M., Dir. Gral. de Océan., 1979).

La Isla del Carmen cuya longitud es de 40 kilómetros es baja y boscosa situada entre las barras de Puerto Real y Principal.

En la parte Oeste de la Isla del Carmen, se encuentra el lugar donde se realizaron las tomas de muestra, el cual es conocido como Estero Pargo localizado entre -



los paralelos 18°39' y 18°42' de latitud Norte y los meridianos 91°44' y 91°47' de longitud Oeste. Se encuentra en la barra sedimentaria al Norte de la Laguna de Términos; el estero presenta la forma de una cuña con dirección SE; en la parte Oeste de la Isla comprende un área aproximadamente de 500 m<sup>2</sup> y una longitud de 5,500 m.

### III.1.2. Características Climatológicas

Se trata de una zona tropical lluviosa con precipitaciones mayores en verano; los vientos dominantes del NE y SE tienen una velocidad media de 5 a 8 km/h. La estación meteorológica del Centro de Investigaciones Marinas El Carmen, registró durante 1972 los datos siguientes: temperatura media mensual del aire: máxima 23.4°C en los meses de marzo, abril y mayo; mínima 23.4°C en febrero. La mayor evaporación media mensual de 70.0 mm en el mes de julio y la mínima de 25.2 mm en abril.

Los parámetros abióticos y bióticos de interés para nuestro trabajo, son: batimetría, temperatura superficial del agua, transparencia del agua, pH, fauna acompañante, vegetación circundante y del fondo.

III.1.2.1. Batimetría. Los rangos de profundidad en el área de estudio fluctúan de 1.10 m a 2.90 m, siendo la profundidad media de 2.0 m. Según los datos, puede observarse que la profundidad es somera, sin grandes variaciones.

III.1.2.2. Temperatura. Los rangos de temperatura en los lugares de estudio fueron de 30.14°C a 31.14°C. Puede considerarse que la temperatura es sumamente uniforme sin que constituya un factor determinante en la distribución de las especies en el área, con sus respectivas variaciones de acuerdo a las diferentes estaciones del año, como en el curso del día, dependiendo de la intensidad o dirección de las corrientes, vientos, así como de la radiación solar.

III.1.2.3. Salinidad. Este factor al igual que la temperatura puede fluctuar, debido a que existe evaporación o descargas de agua de ríos y del mar, por lo que el rango de salinidad es de 35.55 a 36.14‰, lo que indica que son aguas ultrahalinas, es decir, con bastante influencia marina.

III.1.2.4. Tipos de Sedimentos de Fondo. En la mayor parte del Estero se encuentra generalmente un tipo de sedimentos: limo-arcilloso y sólo a la entrada del mismo arena fina, y conchas de moluscos y moluscos vivos; -

siendo el primero en mayor o menor predominio de uno y otro componente.

III.1.2.5. Transparencia del Agua. Se considera que se tratan de aguas relativamente transparentes. Se encontró que el pH oscila entre 7.6 a 8.15 con un promedio de 7.6 dando un pH ligeramente alcalino cercano a los valores encontrados para las zonas con influencia marina.

III.1.2.6. Fauna Acompañante. A lo largo del Estero se encontraron en los sedimentos nematóforos de Rhizophora mangle flotando en el agua, algunas medusas introducidas al Estero por las corrientes.

III.1.2.7. Vegetación Circundante y del Fondo. En la parte final del Estero predominan palmeras y a lo largo Rhizophora mangle, además de palmeras. En el fondo fué observada Thalassia testudinum, teniendo esta especie importancia geológica en algunas estaciones a la entrada del Estero, por su papel como acumuladora de sedimentos (Segura y Wong, 1980).

Este último factor tiene importancia en nuestro trabajo, ya que el aporte de materia orgánica al sedimento favorece el crecimiento microbiano dado que existe una relación directa entre estos dos factores.

### III.2. El Medio de Cultivo

Existen diversos medios para el aislamiento de metanógenos reportados en la bibliografía siendo la mayoría de ellos medios enriquecidos y ajustados a condiciones de Eh (potencial redox) muy bajos para permitir una alta seguridad en el desarrollo de bacterias metanogénicas.

El usado aquí es un medio complejo, enriquecido con soluciones de vitaminas y sales minerales, que según se ha visto favorecen el crecimiento de estos organismos.

El medio, es llamado MS debido a que se usó para el aislamiento tentativo de Methanospirillum<sup>1</sup>.

- MEDIO CÓMPLETO -

---

Contenido	Para 1000 ml de medio, adicionar:
H <sub>2</sub> O destilada	850 ml
Sol. Mineral I	37.5 ml
Sol. Mineral II	37.5 ml
Extracto de levadura	2.0 g
Triptosa	2.0 g
Formiato de Sodio	3.0 g
Acetato de Sodio	1.5 g
Resazurina al 0.1%	1.0 ml
Sol. de vitaminas	10.0 ml
Elíxir mineral de Wolfe	10.0 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 8%	25.0 ml
HCl, 1N	14.0 ml
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) al 0.2%	2.5 ml
Sulfuro de cisteína al 1.25%	40.0 ml
Agar	20.0 gr

---

<sup>1</sup> Según J.G. Ferry, Universidad de Harvard (Comunicación personal P.A.C. del M. en C. Jorge Romero J.)

Sol. Mineral I

$K_2HPO_4$	6.0 g
H <sub>2</sub> O destilada	c.b.p. 1 lt.

Sol. Mineral II

$KH_2PO_4$	6.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	6.0 g
NaCl	12.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2.4 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.6 g
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 1 lt.

Sol. de Vitaminas de Wolfe

Para 1 lt de medio

Biotina	2.0 mg
Acido fólico	2.0 mg
Clorhidrato de piridoxina (B <sub>6</sub> )	10.0 mg
Clorhidrato de tiamina (B <sub>1</sub> )	5.0 mg
Riboflavina (B <sub>2</sub> )	5.0 mg
Acido nicotínico	5.0 mg
Acido pantoténico	5.0 mg
Vit. B <sub>12</sub> cristalizada	1.0 mg
PABA	5.0 mg
Acido lipoico	5.0 mg

Elíxir Mineral de Wolfe

Acido nitrilotriácetico	1.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
NaCl	1.0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CoSO}_4$ (ó $\text{CoCl}_2$ )	0.1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{ZnSO}_4$	0.1
$\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{AlK} (\text{SO}_4)_2$	0.01
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.01
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	A 1 lt

### III.2.1. Preparación del Medio de Cultivo

#### Preparación de las Soluciones

Medio mineral I.- Se disuelven 6.0gr de  $K_2HPO_4$  y se afora a un litro de agua destilada, agitando hasta su completa disolución. Para su conservación, se almacena en un frasco ámbar, cerrado.

Mineral II.- Se disuelven cada uno de los reactivos mencionados en la composición de ésta solución, antes de agregar el siguiente, y seguir el orden en que aparecen. Conservar en frasco ámbar.

Solución de resazurina al 0.1%.- Se disuelven 0.1 g de resazurina en 100 ml de agua destilada. Conservar en frasco ámbar.

Solución de carbonato de sodio al 8%.- Se pesan 8.0 g de  $Na_2CO_3$  y se disuelven, con agitación, a 100 ml de agua destilada.

Solución de sulfato férrico amónico al 0.2%.- Se pesan 0.2 g de  $Fe(SO_4)_2 (NH_4)$  y se disuelven con  $H_2O$  destilada. Aforar a 100 ml.



Solución de sulfuro de cisteína al 1.25%.- Se calientan 185 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se le adicionan 13.4 ml de NaOH 3 N. Se deja enfriar a temperatura ambiente y agregar 2.5 g de clorhidrato de cisteína y 2.5 g de Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O. Se conserva en un frasco ámbar en refrigeración.

Elíxir mineral de Wolfe.- En 500 ml de agua destilada se disuelven, una a una las sales, en el orden descrito anteriormente, de tal forma que no se agrega la siguiente hasta que se ha solubilizado la anterior, para abatir el efecto del ión común, utilizando agitación magnética constante. Finalmente, se completa a 1 lt de solución, con el volumen restante.

Solución de vitaminas de Wolfe.- Se pesan las cantidades necesarias de cada una de las vitaminas y se disuelven, y finalmente se afora a 1 lt con agua destilada.

Para preparar el medio completo MS se adicionan los componentes en el orden y proporciones indicados anteriormente, mezclados en un volumen pequeño de agua, salvo la solución de vitaminas, la cual se esteriliza por separado mediante filtración millipore.

Incorporados todos los componentes se lleva a un volumen final de 1000 ml, y se calienta para disolver el agar (en el caso de que el medio sea sólido), y posteriormente se adiciona la solución de sulfuro de cisteína al 1.25% como agente reductor.

Se esteriliza el medio en autoclave, a 120°C, 15/lb de presión, 20 minutos, y se deja enfriar el medio a una temperatura baja para evitar la desnaturalización de las vitaminas y la solidificación del medio, si es sólido.

El factor más importante que se debe controlar, para el llenado de las cajas de petri y/o los frascos viales, es la temperatura a la que debe estar el medio. Este debe vaciarse caliente para evitar la solidificación del medio y la entrada de oxígeno, que aumenta el Eh del medio, observable por el vire de la rezasurina a rosa pálido, dando como consecuencia que se pierdan las condiciones reductoras necesarias para el desarrollo de las bacterias metanogénicas.

### III.2.2. Descripción del Sistema Anaeróbico Empleado

El sistema anaeróbico utilizado para el cultivo de las bacterias metanogénicas consistió en un frasco vial, de un volumen de 60 ml con tapón de hule y sello de aluminio que presentó las mejores características para el muestreo, transporte, aislamiento, almacenamiento y pruebas bioquímicas.

Las ventajas son las siguientes:

1. Volumen de líquidos proporcional en relación con la fase gaseosa anaeróbica. Se eligieron frascos viales con 60 ml de capacidad, este tamaño presenta una relación adecuada con respecto a la cantidad de medio líquido que se debe emplear (un tercio de su capacidad) y el volumen de la fase gaseosa anaeróbica inyectada para fines de preservación de las condiciones de cultivo para estos microorganismos.
2. Facilidad de manipulación durante el muestreo. Debido a las condiciones de trabajo durante los muestreos, este sistema representa un medio seguro, tanto como por su resistencia a accidentes como por su facilidad de transporte y manipulación.
3. Eficiencia para la preservación de las condiciones anaeróbicas. Este sistema permite asegurar el mantenimiento de las condiciones de anaerobiosis que debe haber para que puedan desarrollarse las metanobacterias, gracias al sistema de engargolado metálico con el cual se sellan los frascos.

El proceso de montaje del sistema anaeróbico es el si -  
guiente:

1. Los frascos viales, junto con sus respectivos tapones de caucho, se esterilizan en autoclave.
2. Posteriormente, se depositan en cada uno, aproximadamente de 20-25 ml del medio MS estéril y se sellan con los tapones y las cintillas de aluminio, procediendo a engargolarlos.
3. Se procede entonces a hacerles el vacío para extraer todo el aire posible, esto produce una presión negativa que facilita luego la entrada de gas nitrógeno usado como preservador de la anaerobiosis.
4. Finalmente se gasifican las viales con  $N_2$  a presión durante 1-2 segundos aproximadamente, usando una jeringa acoplada a la manguera de salida del gas procedente del tanque.
5. Para someter a prueba la seguridad del sistema, se recubre con cinta selladora Parafilm, que sirve como un indicador de posibles fugas, el cual permite tener un control eficiente de los frascos/viales y desechar aquellos que no reúnan las condiciones requeridas.

### III.3. Técnicas de Muestreo

Para obtener las muestras de sedimentos fueron usados - nucleadores, los cuales pueden ser de varios tamaños y diámetros, simples o provistos de dispositivos especiales, o bien puede usarse una draga manual para sedimentos localizados en aguas someras.

El siguiente cuadro resume las diferentes técnicas de muestreo según la profundidad y el sitio en donde se realiza.

TECNICA DE MUESTREO EMPLEADA	TIPO DE SEDIMENTO	RANGO DE PROFUNDIDADES
Nucleadores oceánicos	Oceánico (de mar profundo)	Mayores de 50 metros
Draga	Oceánico (plataforma continental)	40-50 m
	De aguas dulces y mares someros	1-40 m

Dadas las características del sitio elegido para realizar los muestreos, no fue necesario emplear nucleadores o draga, ya que los sedimentos se tomaron a una profundidad de 10 a 40 cm.

Para obtener las muestras de sedimentos se usaron jeringas de plástico de 10 c.c. de capacidad, adaptadas como nucleadores, facilitándose de esta manera la extracción del sedimento y su depositación en frascos de vidrio de 125 c.c. de capacidad, conteniendo 90 c.c. de una dilución 1:10 de medio mineral (agua de mar) como medio de transporte y conservación antes de ser inoculados en el medio MS contenido en los frascos viales bajo condiciones de anaerobiosis. Las muestras deben ser llevadas rápidamente al laboratorio para ser inoculadas en los frascos viales, dado que una exposición prolongada al oxígeno del aire puede alterar las condiciones de los sedimentos.

Para sembrar en los frascos viales se toma una alícuota de 1 ml de dilución del sedimento, inyectándose a través del tapón de hule del frasco vial. O bien se puede realizar la inoculación in situ.

Los frascos se incuban a 30°C, de 30 a 60 días, observando periódicamente si existe algún cambio en las condiciones del medio, indicado por el vire del color de amarillo paja a rosa, comparado contra un testigo.

III.4. Aislamiento Primario a Partir de las Muestras de Sedimentos.

III.4.1. Estudio Cualitativo para la Detección de Metano en la Fase Gaseosa en el Frasco con el Medio Líquido.

Terminado el período de incubación de las muestras, se realizó una prueba para la detección de metano en la fase gaseosa presente en los frascos, como un parámetro indicativo de la presencia o ausencia de bacterias metanogénicas. Esto se llevó a cabo mediante cromatografía de gases, cuyas condiciones de operación fueron las siguientes:

Cromatógrafo Varian 2700, DIF 64 y  $128 \times 10^{11}$  A/mV

Temperatura de inyección, temperatura del detector 100°C

Temperatura de la columna, temperatura del ambiente 25°C

Vp 1 cm/min

Columna: Reoplex 400 10%/chr WAEDMCS PO/100

6ft x 1/8 acero inoxidable

Posteriormente se realizaron otras detecciones de metano y para probar el sistema anaeróbico empleado, se utilizaron las siguientes condiciones:

Detector de Conductividad térmico

Temperatura de inyección, temperatura del detector 150°C

Temperatura de la columna 120°C

Gas acarreador Helio 30 ml/min

#### III.4.2. Cultivo en Medio Sólido

Para el aislamiento de las bacterias metanogénicas se procedió a inocular en medio sólido a partir de las muestras de sedimentos previamente incubadas, y que fueron positivas para el análisis de metano.

El aislamiento se hizo en cajas de Petri con medio MS sólido, que fueron colocadas en desecadores de plástico equipados con una llave de paso para hacer el vacío y gasificados con nitrógeno para mantener las condiciones anaeróbicas, incubándose a 30°C durante un período de 1 mes gasificando frecuentemente para restablecer las pérdidas de gas nitrógeno que pudieran presentarse.

A partir de las cajas se realizaron exámenes morfológicos macro y microscópicos de las colonias aisladas, siguiendo parámetros habituales para la descripción del tipo de colonia, así como sus particularidades, efectuando la prueba de la tinción de Gram.



Conjuntamente con la tinción de Gram, se empleó la técnica de contraste de fases para realizar observaciones microscópicas directas buscando rasgos morfológicos particulares en las bacterias que las señalaran como posibles miembros de algún género de bacterias metanogénicas.

#### III.4.3. Identificación de Colonias de Bacterias Metanogénicas por Exposición a la luz UV en Onda Larga

En base a la propiedad de la emisión de fluorescencia por los cultivos de colonias metanogénicas cuando se exponen a los haces provenientes de una fuente de radiación UV de amplio aspecto se pueden diferenciar de aquellas que no lo son, en cultivos mixtos, aunque se debe tomar en cuenta la edad del cultivo, ya que los cultivos jóvenes presentan una fluorescencia fuerte, la cual disminuye a medida que éste envejece, tornándose amarillo-verdosa o parda.

La técnica consiste en exponer las cajas durante 1 a 2 minutos a la fuente de luz UV. La fluorescencia debe ser observable a partir de los primeros 15 segundos de exposición.

Las colonias de bacterias metanogénicas así identificadas pueden ser marcadas para proceder después a un aislamiento en cultivo puro.

#### III.4.4. Microfotografías Obtenidas Usando Objetivo de Inmersión y de Contraste de Fases.

De los estudios morfológicos efectuados basados en técnicas de tinción de Gram y contraste de fases, se seleccionaron las colonias que mostraron semejanza con la morfología característica de los diferentes tipos de bacterias metanogénicas.

El procedimiento para obtener las microfotografías fue el siguiente:

- 1.- Las preparaciones se tiñen con las colorantes de Gram.
- 2.- Se observan al objetivo de inmersión y se busca un campo adecuado para la exposición.
- 3.- Se ajusta la cámara y se da un tiempo de exposición de 5 segundos para cada campo.

#### III.5. Pruebas Bioquímicas

##### III.5.1. Detección de Metano en Fase Gaseosa en Cultivos Mixtos.

La prueba bioquímica utilizada por su eficiencia para demostrar la presencia de bacterias metanogénicas y dar el índice de producción de metano presente en el cultivo es

la cromatografía de gases, ya que el metano es el único producto que las diferencia de otras bacterias, sirviendo también ésta para efectuar correlaciones semicuantitativas entre los porcentajes de metano contenido en las muestras estudiadas.

### III.5.2. Prueba de Producción de Metano a Partir de Fuentes de Carbono Utilizables por las Metanobacterias.

De las fuentes de carbono que son utilizadas por las bacterias metanogénicas, se eligieron únicamente las orgánicas y en particular, el metanol y el acetato los cuales fueron probados separadamente en cultivos líquidos MS, como única fuente de carbono disponible, a partir de los cultivos aislados en medio sólido, como un procedimiento para diferenciar entre los géneros de bacterias metanogénicas.

#### IV. RESULTADOS

##### IV.1. Resultados Morfológicos y Macroscópicos

Las descripciones morfológicas de las colonias aisladas de cada una de las muestras de acuerdo con los estudios microscópicos realizados, se incluyen en la tabla siguiente (Tabla IV.1)

TABLA IV.1

<u>FOTOGRAFIA</u> No.	<u>MUESTRA</u> <u>CORRESP.</u>	<u>OBSERVACION</u> EN	<u>MORFOLOGIA</u> <u>MACROSCOPICA</u>	<u>MORFOLOGIA</u> <u>MICROSCOPICA</u>	<u>GRAM</u>
1	3	N	Colonias pequeñas, circulares, bordes redondeados, con pigmentación amarilla en el centro	Bacilos con espora terminal	+
2	6	CF	Colonias translúcidas de bordes irregulares, color amarillizo	Bacilos	+
3	6	N	Colonias translúcidas de bordes irregulares, color amarillizo	Bacilos	+
4	10	N	Colonias de tamaño variable, en forma de estrella y bordes irregulares, blancas opacas	Cocos	+
5	10	CF	Colonias de tamaño variable, en forma de estrella y bordes irregulares, blancas opacas	Cocos	+
6	EP-1	CF	Colonias de bordes irregulares, opacas, de color amarillizo pálido, arborescentes (ramificadas)	Cocos	+

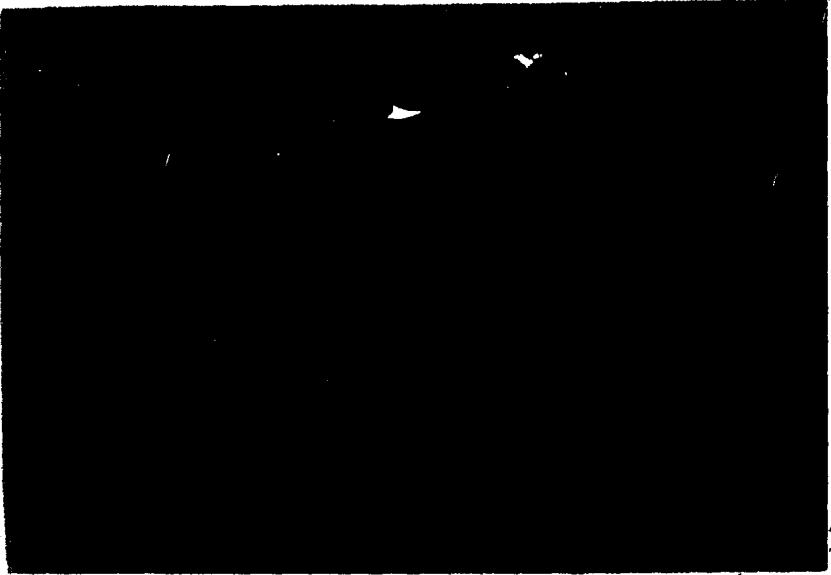
Continuación Tabla IV.1

<u>FOTOGRAFIA</u> <u>No.</u>	<u>MUESTRA</u> <u>CORRESP.</u>	<u>OBSERVACION</u> <u>EN</u>	<u>MORFOLOGIA</u> <u>MACROSCOPICA</u>	<u>MORFOLOGIA</u> <u>MICROSCOPICA</u>	<u>GRAM</u>
7	R	N	Colonias planas, de bordes irregulares de tamaño variable, con depresión central	Cocos	+
8	R	CF	Colonias planas, de bordes irregulares de tamaño variable, con depresión central	Cocos	+
9	EP-2	CF	Colonias translúcidas de bordes irregulares, tamaño variable, forma alargada	Cocos con algunas formas bacilares o espirales	+
10	EP-2	CF	Colonias pequeñas translúcidas en forma de estrella	Formas cocobacilares	+

N = Microscopía usando objetivo de inmersión (100 x)

CF = Microscopía usando objetivo de inmersión, con modificación a contraste de fases

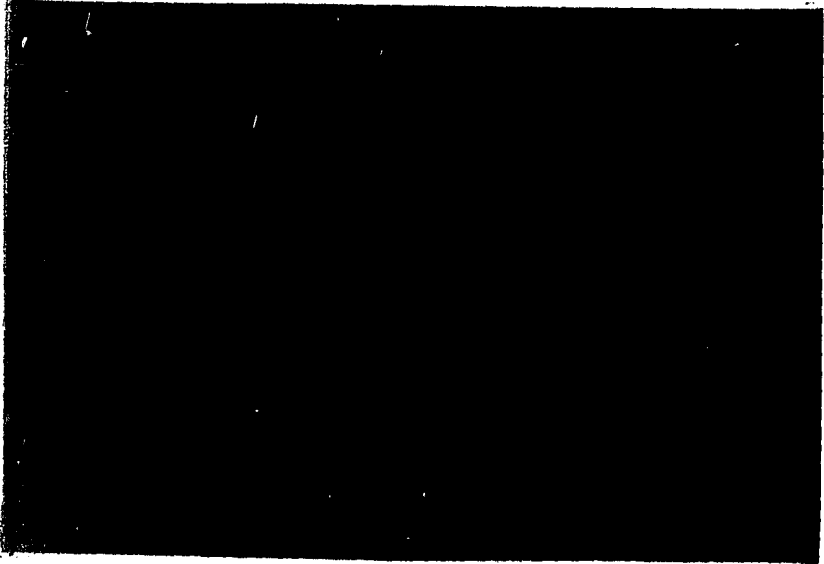
IV.2. Microfotografía



Microfotografía No. 1



Microfotografía No. 2

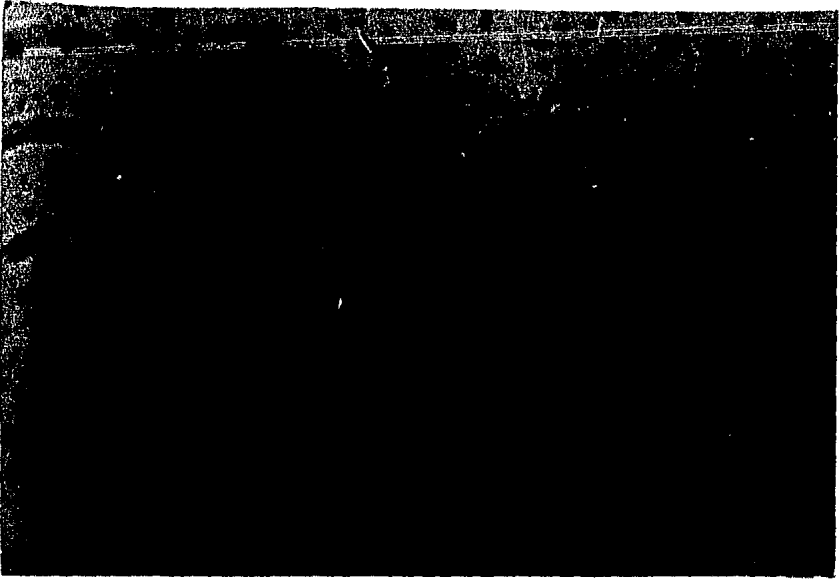


Microfotografía No. 3

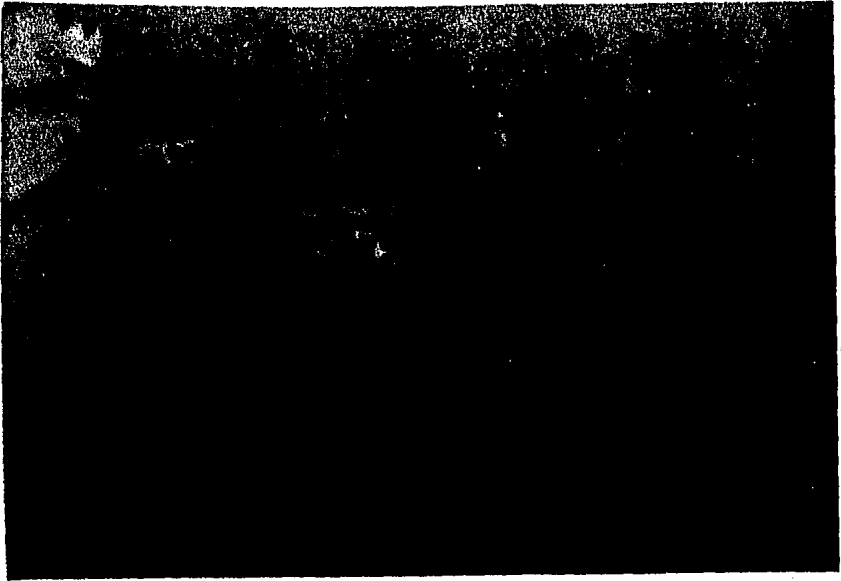


Microfotografía No. 4

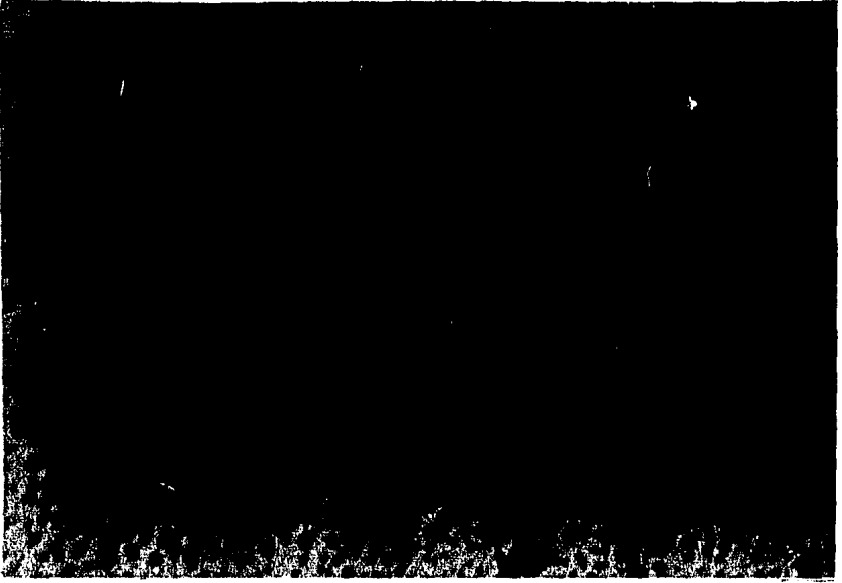




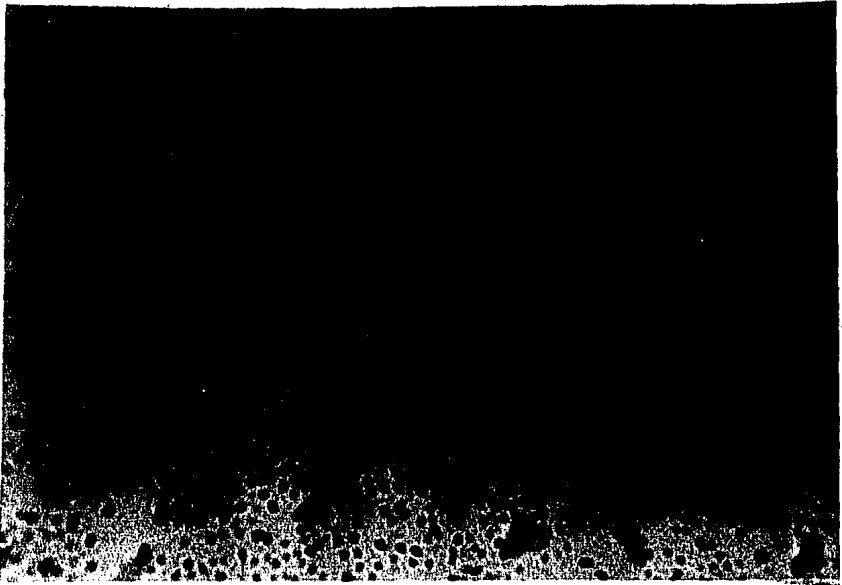
Microfotografía No. 5



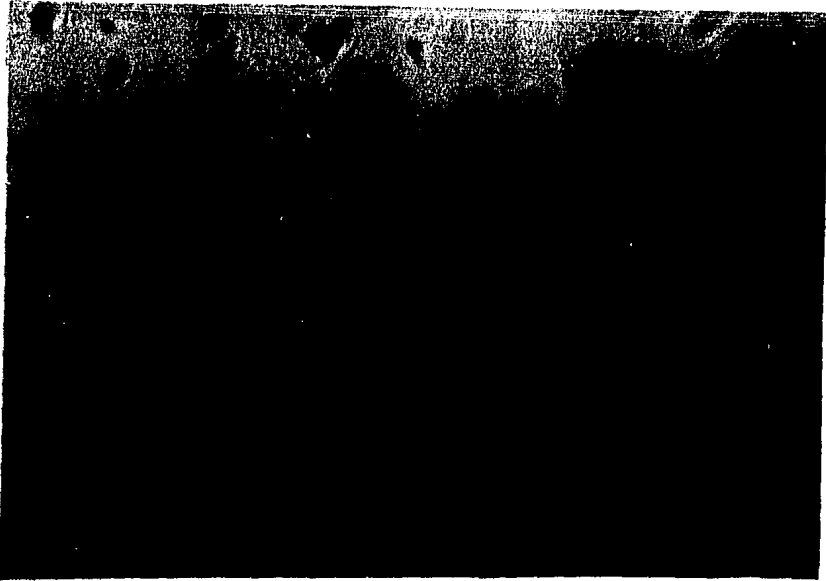
Microfotografía No. 6



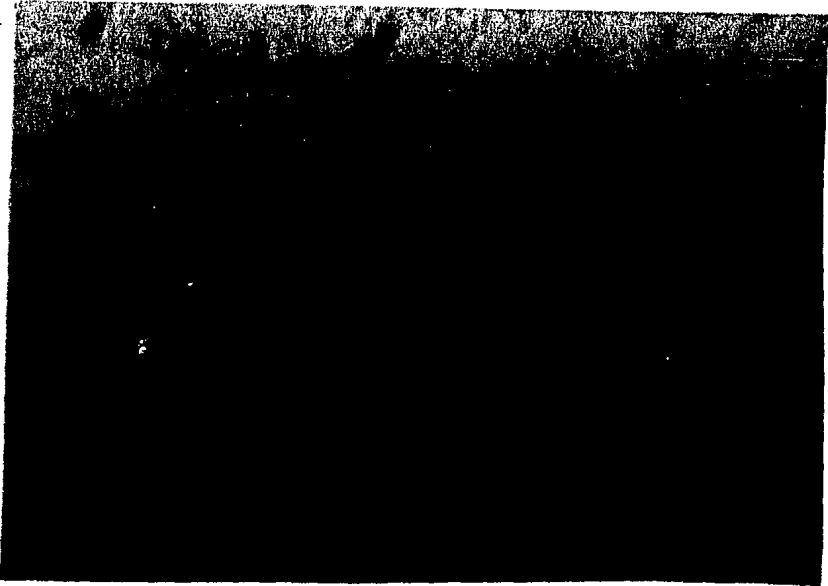
Microfotografía No. 7



Microfotografía No. 8



Microfotografía No. 9



Microfotografía No. 10

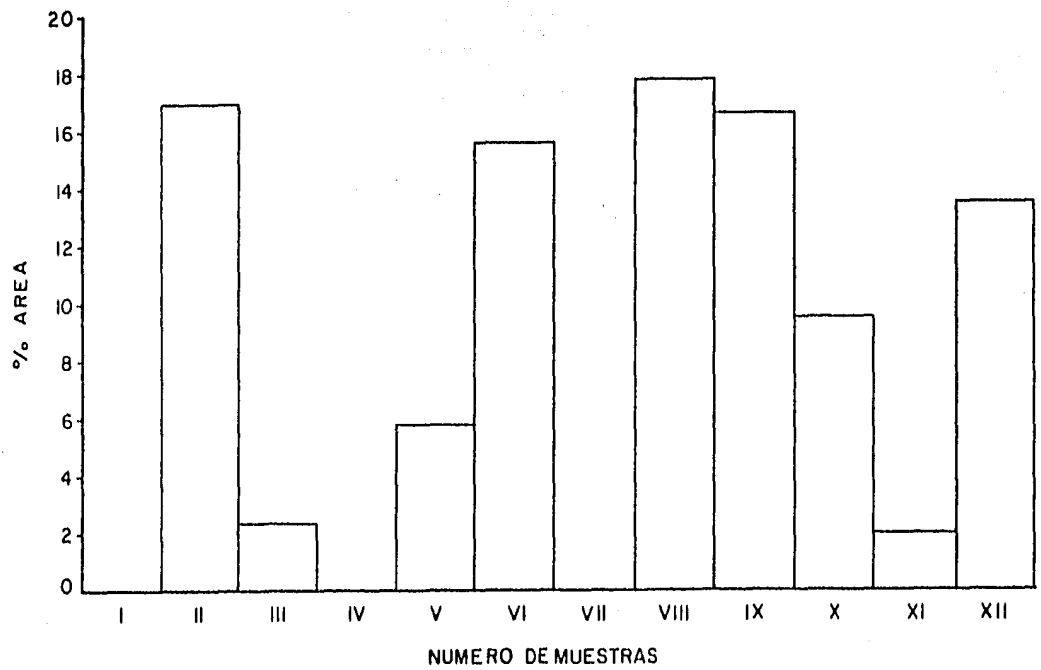
### IV.3. Datos Cromatográficos

Los porcentajes de metano obtenidos por análisis cromatográfico correspondientes al primer muestreo son los siguientes.

Tabla IV. 2. Porcentajes de metano obtenidos para las muestras analizadas

Muestra	Número de Control	Porcentaje de área (%)
I (muestra 3)	1	Metano presente en cantidad suficiente para contribuir al porcentaje de área total
	2	17.013
	3	2.265
II (muestra 6)	4	Metano presente en cantidad no suficiente para contribuir al porcentaje de área total
	5	5.748
III (muestra 10)	6	15.624
	7	No presentó metano
IV (muestra R)	8	17.737
	9	16.589
V (muestra EP1)	10	9.546
	11	1.939
VI (muestra EP2)	12	13.540

Los resultados de la Tabla IV.2. aparecen en la gráfica IV.1.



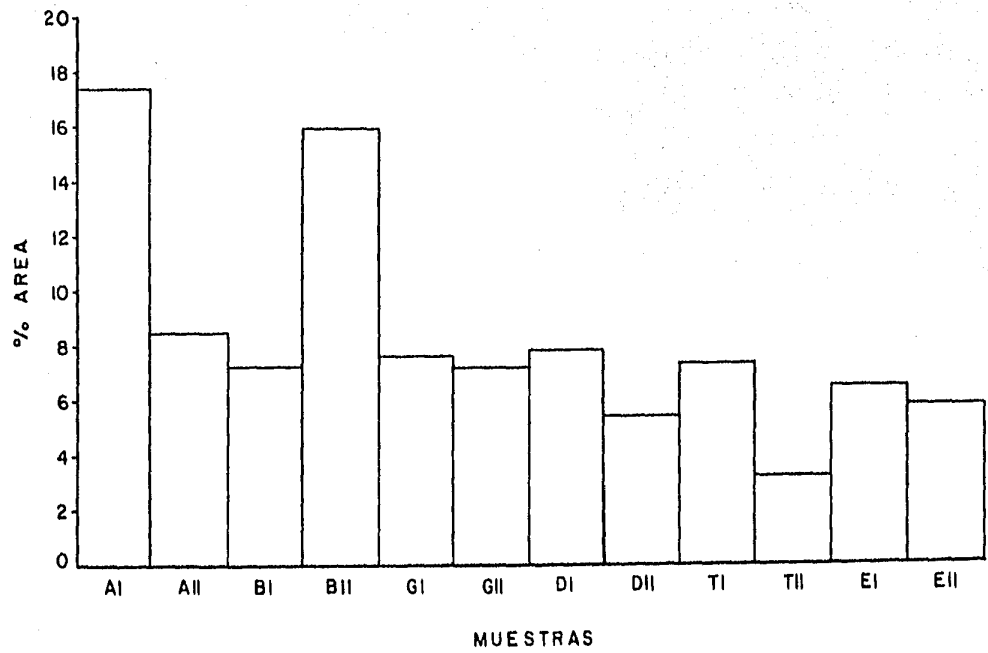
GRAFICA. IV.1 PORCENTAJES DE AREA DE METANO OBTENIDOS EN LAS MUESTRAS.

Los datos correspondientes al segundo muestreo fueron -  
obtenidos mediante un análisis semicuantitativo para el  
metano presente en la fase gaseosa y aparecen en la - -  
Tabla IV.2.

Tabla IV.2. Porcentajes de área que representan concen-  
traciones de metano obtenidas para las mues-  
tras analizadas del segundo muestreo.

Muestra	Número de Prueba	Porcentaje de Area (%)
1	Alpha I	17.352
	Alpha II	8.470
2	Betha I	7.466
	Betha II	15.856
3	Gamma I	7.62
	Gamma II	7.155
4	Delta I	7.818
	Delta II	5.452
5	Theta I	7.254
	Theta II	3.137
6	Epsilon I	6.576
	Epsilon II	5.841

Los resultados aparecen en la gráfica IV.2.



GRAFICA. IV.2 PORCENTAJES DE AREA DE METANO OBTENIDOS PARA LAS MUESTRAS ANALIZADAS

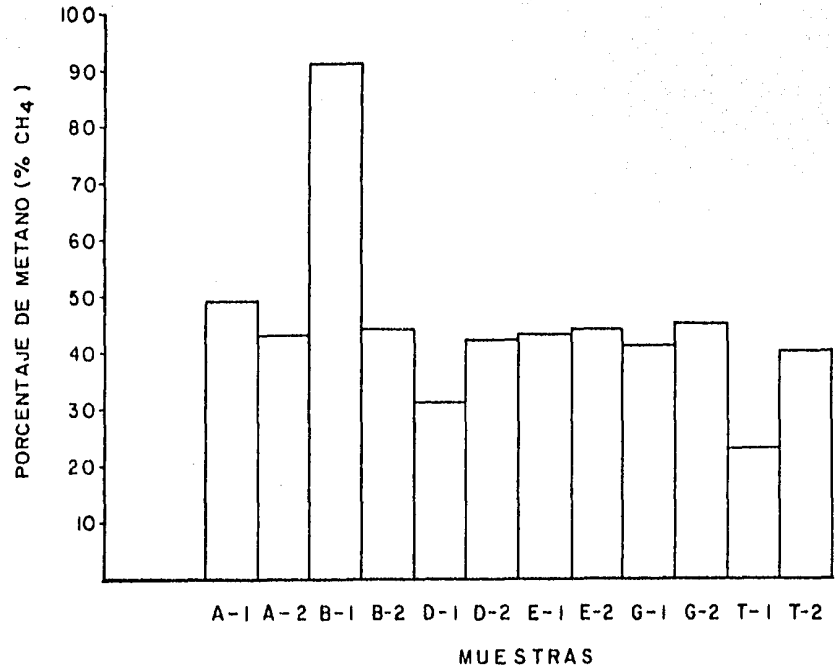
Los porcentajes totales de metano obtenidos en porcentajes de volumen de fase gaseosa presente en cada muestra son:

Tabla IV.3. Porcentajes en volumen de metano presentes en las muestras

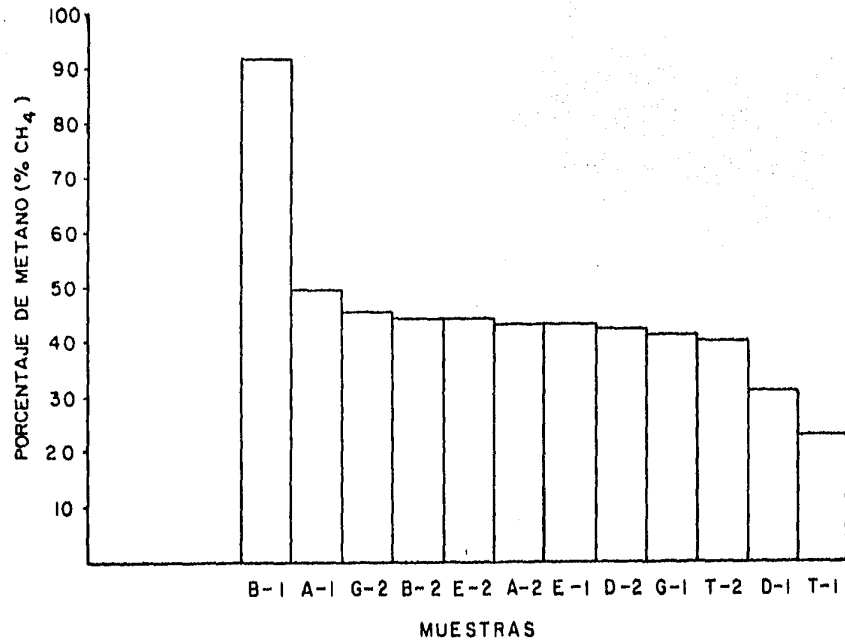
Muestra	Número de Prueba	% en volumen de metano
1	Alpha I	49
	Alpha II	43
2	Betha I	91
	Betha II	44
3	Gamma I	41
	Gamma II	45
4	Delta I	31
	Delta II	42
5	Theta I	23
	Theta II	40
6	Epsilon I	43
	Epsilon II	44

Estos porcentajes están representados en las gráficas IV.3.1., IV.3.2. y IV.3.3., las cuales muestran los mismos porcentajes, arreglados según el número de la muestra, en orden decreciente y en orden creciente de % en volumen de metano de las muestras, respectivamente.

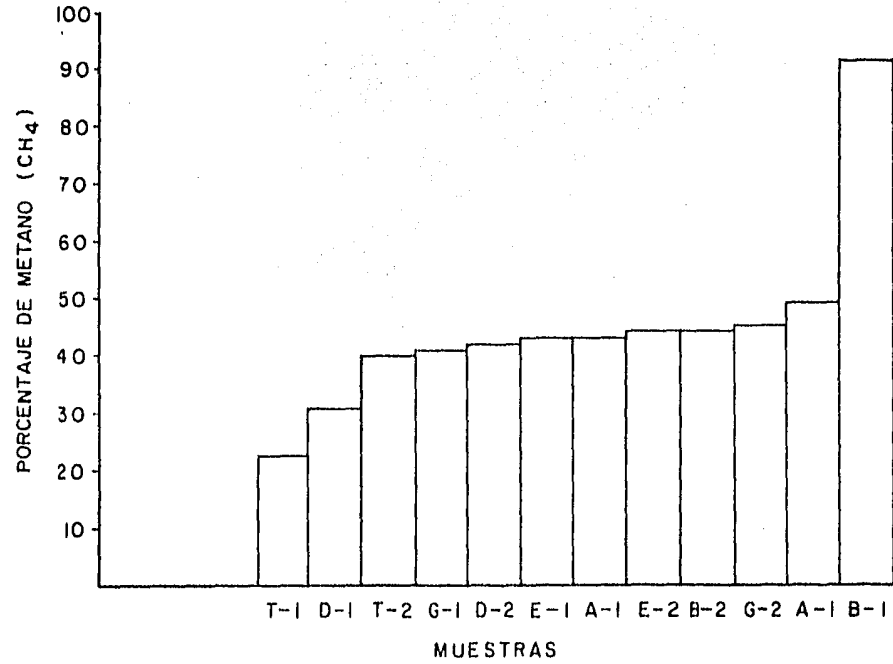




GRAFICA.IV.3.1 PORCENTAJES DE METANO ENCONTRADOS CORRESPONDIENTES A LAS MUESTRAS ANALIZADAS



GRAFICA .IV. 3.2 PORCENTAJES EN VOLUMEN DE METANO (CH<sub>4</sub>)  
PRESENTE EN CADA MUESTRA



GRAFICA IV.3.3 PORCENTAJES EN VOLUMEN DE METANO (CH<sub>4</sub>)  
PRESENTES EN CADA MUESTRA

Los porcentajes fueron registrados a los 35 días de incubación de las muestras, haciéndose por duplicado para cada una de las colonias aisladas a partir de los cultivos en placa.

Con el objeto de observar si la producción de metano obedece al comportamiento de una variable continua, se hizo una tabulación de los resultados de los porcentajes de gas producidos en cada una de las muestras de acuerdo con los requerimientos para construir una curva de distribución normal.

La Tabla IV.4. resume los parámetros estadísticos necesarios para representar la distribución de porcentajes como función de la altura normalizada de la ordenada, según establecen las ecuaciones que se describen más adelante.

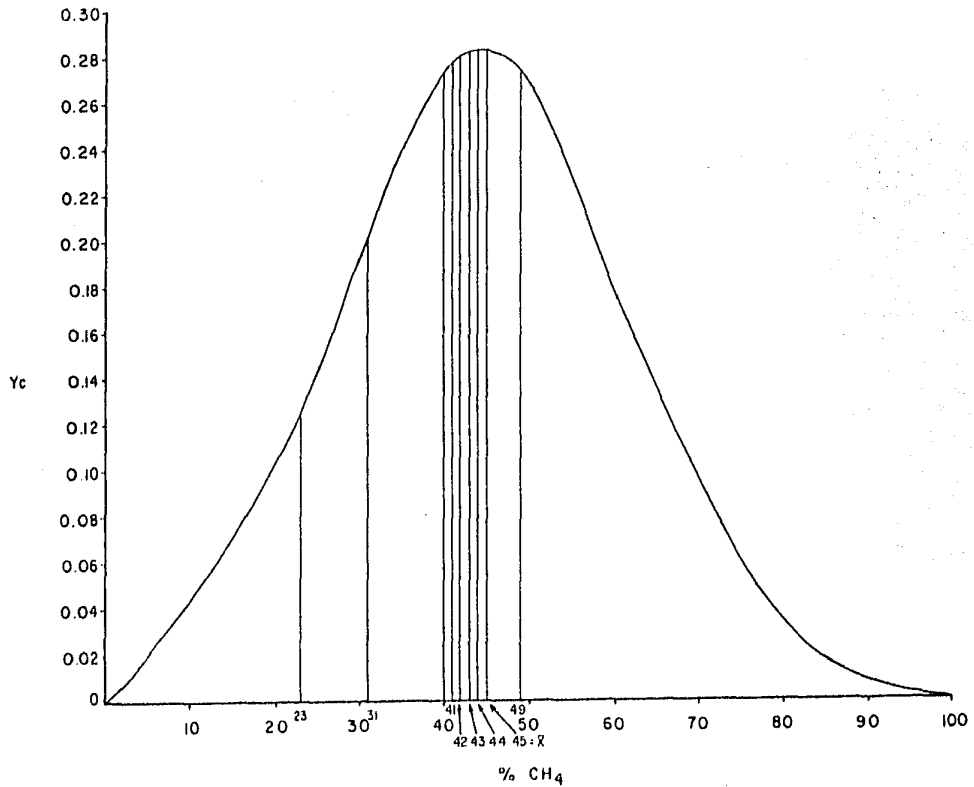
Tabla IV.4. Datos de la curva normal para los porcentajes de metano

X	fX	$X - \bar{X}$	$(X - \bar{X})^2$	X/S	Alguna proporcional a la ordenada $- X^2/2S^2$	Yc Altura de la ordenada Y <sub>0</sub> = 0.283
23	1	-21.9	479.61	-1.29	0.435	0.120
31	1	-13.9	193.21	-0.82	0.714	0.200
40	1	- 4.9	24.01	-0.29	0.959	0.270
41	1	- 3.9	15.21	-0.23	0.974	0.276
42	1	- 2.9	8.41	-0.17	0.986	0.279
43	2	- 1.9	3.61	-0.11	0.994	0.281
44	2	- 0.9	0.81	0.05	0.999	0.282
45	1	0.1	0.01	0.0	1.000	0.283
49	1	4.1	16.81	0.24	0.972	0.275
91	1	46.1	2125.21	2.72	0.025	0.007

$$(\sum (X - \bar{X})^2) = 2866.9$$

La gráfica IV.4 representa la distribución de los porcentajes de metano en función de la altura de la ordenada, - obteniendo las áreas proporcionales a cada uno de los porcentajes.

La gráfica muestra que la mayoría de los porcentajes de área son inferiores al valor promedio ( $\bar{x} = 45$ , dado que las diferencias entre los porcentajes de área se hacen más pequeñas en la proximidad de la vecindad de este valor.



GRAFICA IV.4. AREAS PROPORCIONALES BAJO LA CURVA NORMAL ENTRE LA X Y LOS VALORES DE % CH<sub>4</sub>

Cálculos

$$X = X_1 + X_2 + \dots + X_{10}$$

$$X = 449$$

La medida es:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{N} ; N = 10$$

$$\bar{X} = 44.9$$

S = desviación estándar

$$S = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N}$$

$$\sum (X_i - \bar{X})^2 = 2866.9 ; N = 10$$

$$S = 16.93$$

La altura proporcional de la ordenada  $e^{-X^2/2S^2}$  se obtiene de una tabla de áreas proporcionales para la distribución de Gauss.

Para los cálculos de  $Y_c$  (altura normalizada de la ordenada) se tiene que calcular el valor  $Y_o$ , cuando  $X = 0$  ;

$$Y_o = \frac{N_i}{2.5066(S)} e^{-X^2/2S^2}$$

en donde  $N_i = fX = 1.2$

como  $X = 0$

$$Y_o = \frac{N_i}{2.5066(S)}$$

con  $N_i = 12$  y  $S = 16.93$

$$Y_o = 0.283$$

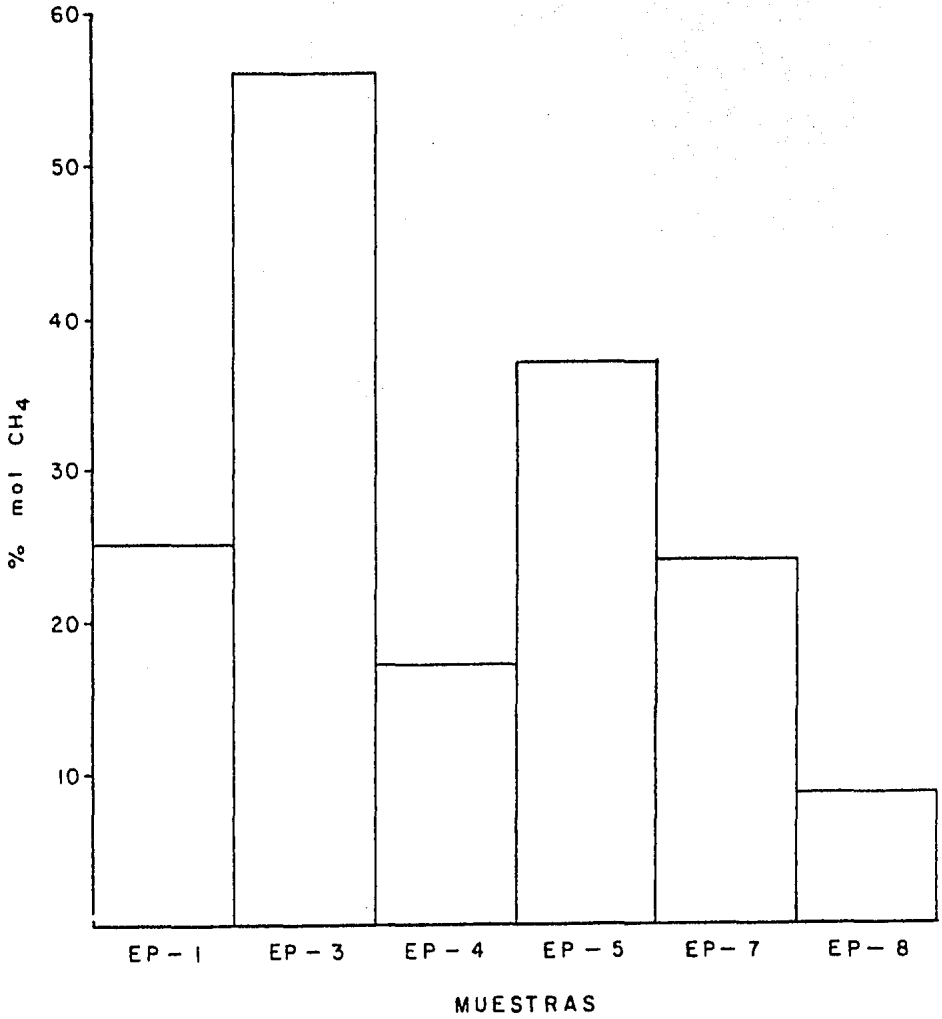
Los valores de  $Y_c$  se han obtenido multiplicando el valor  $y_o$  por cada uno de los valores de la columna para la altura proporcional de la ordenada,  $e^{-X^2/2S^2}$  para los valores de  $X \neq 0$ .



Los resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas con las colonias aisladas en medio sólido MS, con fuentes de carbono orgánico utilizadas por las bacterias metanogénicas se muestran en la siguiente Tabla IV.5.

Medio MS con Acetato	% mol. CO <sub>2</sub>	Medio MS con Metanol	% mol. CO <sub>2</sub>
MSA-3	40	MSM-3	29.2
MSA-5	37	MSM-4	4.0
MSA-9	27	MSM-5	52.0
MSA-10	6	MSM-6	40.0
MSA-12	33	MSM-8	6.0
MSA-13	17	MSM-9	44.0
		MSM-11	39.0
		MSM-12	13.5
		MSM-13	10.0

Los testigos MSA-T y MSM-T fueron negativos para CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>. A partir de un tercer muestreo efectuado en correlación con la investigación de la actividad sulforreductora en el área bajo estudio con el objeto de verificar la relación existente entre este fenómeno y la metanogénesis, se obtuvieron una serie de muestras en cuyo análisis cromatográfico se detectó metano en los siguientes porcentajes: (Tabla IV.6) y están representados en la gráfica IV.6 correspondiente.



GRAFICA IV.6. VALORES EN % MOL CH<sub>4</sub> CORRESPONDIENTES AL TERCER MUESTREO

Tabla IV.6

Muestra	% Mol de Metano
EP 1	25
EP 3	56
EP 4	17
EP 5	37
EP 7	24
EP 8	8.9

Las condiciones de operación para estos análisis fueron:

Cromatógrafo de gases Varian 2700

Detector: Conductividad Térmica

Columna: MMSA, 6F x 1/8" s.s.

Temperatura de la columna: 80°C

Gas de arrastre Nitrógeno, 30 ml/min.

Volumen de inyección: 200 microlitros

## V. DISCUSION DE RESULTADOS

Las muestras de sedimentos sembrados e incubados en medio líquido MS en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante un mes, presentaron un rango de producción de metano entre 1.93% y 100% v/v de CH<sub>4</sub> en 40 cc de capa gaseosa por encima del nivel del medio de los viales. Los sedimentos provienen de aguas salobres (Mah, 1977), aunque la mayoría de los estudios han sido efectuados con sedimentos marinos (Emery y Hogan, 1958; Barnes y Goldberg, 1976; Reeburgh, 1977; Oremland y Taylor, 1978) y de agua dulce (Molongoski, 1976; Rudd, 1976; Winfrey y Zeikus, 1976, 1977, 1979; Strayer y Tiejde, 1978; Jorgensen, 1978).

La variación observada en los valores de metano producido en los sedimentos, puede deberse: a) los distintos sitios en donde se colectaron las muestras, b) a la profundidad, c) la fecha del muestreo, d) la temperatura in situ, y e) el número de metanógenos (Zeikus y Winfrey, 1976), ya que las condiciones dentro del sedimento varían drásticamente en pocos centímetros de profundidad (Droop y Jannasch, 1980).

A las colonias aisladas se les efectuaron estudios macroscópicos y microscópicos utilizando los procedimientos usuales para la identificación de bacterias metanogénicas (Zeikus, 1977; Mah y Smith, 1981).

La identificación de colonias metanogénicas por emisión de fluorescencia, fue positiva para algunas colonias de los cultivos, ya que ésta es una prueba presuntiva para demostrar la presencia de bacterias metanogénicas en cultivos mixtos (Edwards y McBride, 1975; Mink y Dugan, 1977; Doddema, 1978) a las cuales se les efectuaron estudios microscópicos obteniéndose las microfotografías tomadas en contraste de fases (Mink y Dugan, 1977; Doddema, 1978) y tinción de Gram (Zeikus, 1977; Mah y Smith, 1981) y se observaron diversos tipos de morfologías bacterianas por ser estos cultivos mixtos (Davis, 1966; Zeikus y Winfrey, 1976; Winfrey y Zeikus, 1977; Mink y Dugan, 1977; Patel y Roth, 1978; Hogan y van den Berg, 1979; Boone, 1980).

Los resultados cromatográficos muestran que en todos los casos en los que se incubaron muestras de sedimentos siempre se detectó metano (Swinnerton, 1962; Edwards, 1975; Zeikus y Winfrey, 1976, Atkinson, 1967; Zeikus, 1977; Winfrey y Zeikus, 1977; Oremland y Taylor, 1978; Winfrey y Zeikus, 1979; Zinder y Mah, 1979; Molongoski y Klug, 1980).

Las pruebas de producción de metano a partir de metanol y acetato utilizando las colonias crecidas en medio sólido MS fueron negativas, detectándose únicamente CO<sub>2</sub> en

la fase gaseosa, y no se presentó cuando se utilizaron cultivos mixtos (Winfrey y Zeikus, 1976, 1977; Patel y Roth, 1978; Zinder y Mah, 1979; Mah y Smith, 1981).

La presencia de  $\text{CO}_2$  en los viales pudo deberse a las siguientes causas:

- 1.- El acetato es directamente transformado a  $\text{CO}_2$  por bacterias no metanogénicas.

El acetato puede ser transformado a  $\text{CO}_2$  aún en ausencia de actividad metanogénica (Winfrey y Zeikus, 1977, 1979).

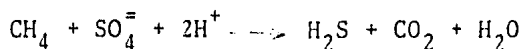
La presencia de bacterias anaeróbicas reductoras del sulfato en el medio, contribuye a que existan relaciones sintróficas con otras bacterias heterótrofas, debido a que no llevan a cabo el ciclo de los ácidos tricarbóxílicos en forma completa, transformando anaeróbicamente el acetato a  $\text{CO}_2$ , con la reducción de sulfato a sulfhídrico (Jorgensen, 1977; Zinder y Mah, 1979).

- 2.- La presencia de  $\text{CO}_2$  en los viales que contenían metanol como fuente de carbono, sugiere que se trató de una fermentación anaerobia de este sustrato. Por otra parte se favorece la fermentación del metanol a  $\text{CO}_2$  en condi - ciones de anaerobiosis usando gas nitrógeno (Winfrey y Cols, 1977).

- 3.- Se produjo metano, con una reducción posterior a CO<sub>2</sub> por bacterias no metanogénicas.

La oxidación del metano por las bacterias anaeróbicas reductoras de sulfato puede demostrarse por la producción del <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de CH<sub>4</sub> derivado del acetato - (Cappenberg, 1974).

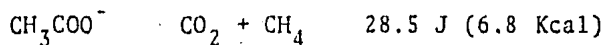
La oxidación anaeróbica del metano podría ocurrir como consecuencia de la reducción de sulfato a sulfhídrico (Barnes y Goldberg, 1976);



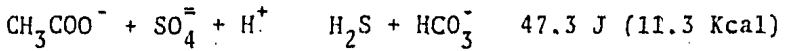
- 4.- Competencia por el Acetato y el Hidrógeno

Las bacterias reductoras de sulfato y las metanogénicas pueden competir por el acetato, dando como resultado la inhibición de la metanogénesis (Mah, 1977), debido a la presencia de sulfato en el medio - - (Winfrey y Zeikus, 1977), favoreciéndose termo - - dinámicamente las reacciones siguientes (Martens y - Barnes, 1974, 1977):

Producción de metano a partir de acetato:

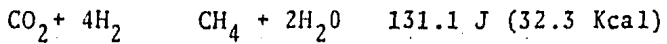


Utilización de acetato en presencia de sulfato:

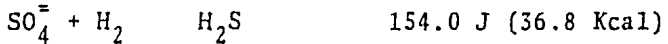


La competencia por el hidrógeno disponible entre las bacterias reductoras de sulfato y las metanogénicas, ocurre de la siguiente manera:

Metanogénesis a partir de  $\text{CO}_2$ :



Reducción de sulfato:



predominando la reducción de sulfato que está termodinámicamente favorecida (Atkinson, 1967; Cappenberg, 1974; Nikaido, 1977; Bernard, 1979; Winfrey y Zeikus, 1977, 1979).



### CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, se concluye que:

- a) Existe actividad metanogénica en los sedimentos de Estero Pargo, demostrada por la presencia de metano en todas las muestras.
- b) La distribución de la actividad metanogénica varía en función de los sitios de muestreo, la época del año y la profundidad de los sedimentos, así como de la capacidad de la población bacteriana para adaptarse al medio de cultivo, - reflejándose en los diferentes porcentajes de metano - - obtenidos en cada una de las muestras.
- c) Se econtró que se produce metano a partir del medio con - formiato y acetato cuando se incuban muestras de sedimen - tos, ya que en éstos se preservan las condiciones natura - les y se mantienen las interrelaciones ecológicas entre la población bacteriana, pero no se presentó la metanogénesis cuando se utilizó acetato o metanol como únicas fuentes de carbono en cultivos mixtos aislados en medio MS sólido, - obteniéndose únicamente  $CO_2$ , lo que implica que la metano - génesis es un proceso simbiótico dependiente de las - - interrelaciones entre la población bacteriana presente en los sedimentos.

Por lo anteriormente expuesto, se concluye que este es un trabajo pionero sobre la investigación de la metanogénesis en sedimentos estuarinos, como parte fundamental de un conjunto de estudios de investigación sobre ecología microbiana en la Laguna de Términos, que se está realizando en el Laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, de la U.N.A.M.

BIBLIOGRAFIA

- ATKINSON, L.P. and F.A. RICHARDS, 1967. THE OCURRENCE AND DISTRIBUTION OF METHANE IN THE MARINE ENVIRONMENT. *Deep Sea Res.* 14: 673-684.
- BARESI, L.R.A. et al. 1978. METHANOGENESIS, FROM ACETATE ENRICHMENT STUDIES. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 186-197.
- BARNES, R.O. and GOLDBERG, E.D., 1976. METHANE PRODUCTION AND CONSUMPTION IN ANOXIC MARINE SEDIMENTS. *Geology* 4: 297-300.
- BERGEY'S, 1974. MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Buchanan R.E. and Gibbons. N.E., co-editores, 8th Ed, The Williams et Wilkins Company, Baltimore, U.S.A.
- BOONE, D.R. and M.P. BRYANT, 1980. PROPIONATION-DEGRADING BACTERIUM, Syntrophobacter wolinii sp. nov. gen. nov., FROM METHANOGENIC ECOSYSTEMS. *Appl. and Environ. Microbiol.* 40 (3): 626-632.
- CAPPENBERG, T.E., 1974. INTERRELATIONS BETWEEN SULFATE REDUCING AND METHANE PRODUCING BACTERIA IN BOTTOM DEPOSITIES OF A FRESHWATER LAKE I. FIELD OBSERVATIONS. Antoine van Leeuwenhoek J. *Microbiol. Serol.* 40: 285-295.
- CLAYPOOL, G.E. and I.R. KAPLAN, 1974. IN NATURAL GASES IN MARINE SEDIMENTS, ed I.R. Kaplan, p. 99-140 Plenum. New York.

- DAVIS, J.R. and H.F. YARBROUGH, 1976. ANAEROBIC OXIDATION OF HYDROCARBONS BY Desulfovibrio desulfuricans. Chemical Geology. 1 : 137-144.
- DAWSON, K.A. et al. 1980. CHARACTERISTICS OF ANAEROBIC OXALATE-DEGRADING ENRICHMENT CULTURES FROM THE RUMEN. Appl. and Environ. Microbiol. 40 (4): 840-846.
- DODDEMA, J.H. and G.D. VOGELS, 1978. IMPROVED IDENTIFICATION OF METHANOGENIC BACTERIA BY FLUORESCENCE MICROSCOPY. Appl. and Environ. Microbiol. 36 (5): 752-754.
- DROOP, M.R. and H.W. JANNASCH. ADVANCES IN AQUATIC MICROBIOLOGY Academic Press, 1980, Vol. 2, Chap. 2, pág. 92.
- EDWARDS, T. and B.C. McBRIDE, 1975. NEW METHOD FOR THE ISOLATION OF METHANOGENIC BACTERIA. Appl. Environ. Microbiol. 29: 540-545.
- EMERY, K.O. and DEAN HOGGAN, 1958. GASES IN MARINE SEDIMENTS. Bulletin of the American Association of Petroleum Geologists, Vol. 42 (9): 2174-2188.
- HOBAN, D.J. and van den BERG, L., 1979. EFFECTS OF IRON ON CONVERSION OF ACETIC ACID TO METHANE DURING METHANOGENIC FERMENTATIONS. J. of Appl. Bacteriol. 37: 153-159.
- JORGENSEN, B.B., 1977. THE SULFURE CYCLE OF A COASTAL MARINE SEDIMENTS (Limfjorden Denmark). Limnol. and Ocean., 22 (5): 814-832.
- KARUBE, I. and SHINICHI KURIYAMA, 1980. METHANE PRODUCTION FROM WASTEWATERS BY IMMOBILIZED METHANOGENIC BACTERIA. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 22: 847-857.

- LYNN, E. BARBER, 1979. METHANE PRODUCTION IN SITU LAKE WINGRA, THESIS, The University of Wisconsin, PhD Bacteriology.
- MAH, R.A. and WARD, D.M., 1977. BIOGENESIS OF METHANE. Ann. Rev. Microbiol., 31: 309-341.
- MAH, R.A. and SMITH, M.R., 1971. THE METHANOGENIC BACTERIA, Chap. 76. The Prokaryotes, Vol. I, pág. 946-977. Springer-Verlag.
- MARTENS, CH. S. and BERNER, R.A., 1974. METHANE PRODUCTION IN THE INTERSTITIAL WATERS OF SULFATE-DEPLETED MARINE SEDIMENTS, Science, 185: 1167-1169.
- MARTENS, C.S. and BERNER, R.A., 1977. INTERSTITIAL WATER CHEMISTRY OF ANOXIC LONG ISLAND SOUND SEDIMENTS. I. DISSOLVED GASES. Limnology and Oceanography, 22 (1): 10-35.
- MINK, R. and DUGAN, P., 1977. TENTATIVE IDENTIFICATION OF METHANOGENIC BACTERIA BY FLUORESCENCE MICROSCOPY. Appl. and Environ. Microbiol. 33: 713-717.
- MOLONGOSKI, J.J. and KLUG, M.J., 1977. CHARACTERIZATION OF ANAEROBIC HETEROTROPHIC BACTERIA ISOLATION FROM FRESH WATER LAKE SEDIMENTS, Applied and Environmental Microbiology 31: 83-90.
- MOLONGOSKI, J.J. and KLUG, M.J., 1980. ANAEROBIC METABOLISM OF PARTICULATE ORGANIC MATTER IN THE SEDIMENTS OF A HYPEREUTROPHIC LAKE. Freshwater Biology 10: 507-518.

- NIKAIKO, M., 1977. ON THE RELATION BETWEEN METHANE PRODUCTION AND SULFATE REDUCTION IN BOTTOM MUDS CONTAINING SEA WATER SULFATE. *Geochemical Journal*. 11: 199-206.
- OREMLAND, R.S. and TAYLOR, B.F., 1978. SULFATE REDUCTION AND METHANOGENESIS IN MARINE SEDIMENTS. *Geochemica et Cosmochimica Acta*. 42: 209-214.
- PATEL, G.B. and ROTH, L.A., 1977. EFFECT OF SODIUM CHLORIDE ON GROWTH AND METHANE PRODUCTION OF METHANOGENS. *Can. J. Microbiol.* 23: 893-897.
- PATEL, G.B. and ROTH, L.A., 1978. ACETIC ACID AND HYDROGEN METABOLISM DURING COCULTURE OF AN ACETIC PRODUCING BACTERIUM WITH METHANOGENIC BACTERIA. *Can. J. Microbiol.* 24: 1007-1016.
- REEBURGH, W.S. and HEGGIE, D.T., 1977. MICROBIAL METHANE CONSUMPTION REACTIONS AND THEIR EFFECT OF METHANE DISTRIBUTIONS IN FRESHWATER AND MARINE ENVIRONMENTS. *Limnology and Oceanography* 22: (1): 1-9.
- RUDD, J.W. FURUTANI, A. *et al.* 1976. FACTORS CONTROLLING METHANE OXIDATION IN SHIELD LAKES: THE ROLE OF NITROGEN FIXATION AND OXYGEN CONCENTRATION. *Limnology and Oceanography* 21 (3): 357-364.
- SECRETARIA DE MARINA, DIRECCION GENERAL DE OCEANOGRAFIA, 1979. *Estudio Geográfico de la Región de Ciudad del Carmen*.

- SEGURA, L.R. y WONG-CHANG, I., 1980. FOTOGRAFÍAS RECIENTES DE ESTERO PARGO, LAGUNA DE TERMINOS, CAMP. Mco. An. Centro Ciencias del Mar y Limnología, Univ. Nal. Autón. de México 7 (1): 1-14.
- STRAYER, R.E. and TIEJDE, J.E., 1978. IN SITU METHANE PRODUCTION IN A SMALL HYPEREUTROPHIC HARD-WATER LAKE: LOSS OF METHANE FROM SEDIMENTS BY VERTICAL DIFFUSION AND EBULLITION. *Limnol. Oceanography* 23 (6): 1201-1206.
- STRAYER, R.F. and TIEJDE, J.E., 1978. KINETIC PARAMETERS OF THE CONVERSION OF METHANE PRECURSOR TO METHANE IN A HYPEREUTROPHIC LAKE SEDIMENT. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 330-340.
- TOERIEN, D.F. and HATTING, W.H.J., 1969. ANAEROBIC DIGESTION. *Water Research* 3: 385-416.
- WINFREY, M.R. and NELSON, D.R., 1977. ASSOCIATION OF HYDROGEN METABOLISM WITH METHANOGENESIS IN LAKE MENDOTA SEDIMENTS. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 33 (2): 312-318:
- WINFREY, M.R. and ZEIKUS, J.G., 1977. EFFECT OF SULFATE ON CARBON AND ELECTRON FLOW DURING MICROBIAL METHANOGENESIS IN FRESHWATER SEDIMENTS. *Applied. and Environ. Microbiol.* 33 (2): 257-281.
- WINFREY, M.R. and ZEIKUS, J.G., 1979. MICROBIAL METHANOGENESIS AND ACETATE METABOLISM IN A MEROMICTIC LAKE. *Appl. and Environ. Microbiol.* 37 (2): 213-221.

- WINFREY, M.R. and ZEIKUS, J.G., 1979. ANAEROBIC METABOLISM OF IMMEDIATE METHANE PRECURSORS IN LAKE MENDOTA. *Appl. and Environ. Microbiol.* 37 (2): 244-253.
- ZEIKUS, J.G. and WINFREY, M.R., 1967. TEMPERATURE LIMITATION OF METHANOGENESIS IN SEDIMENTS. *Appl. and Environ. Microbiol.* 31 (1): 99-107.
- ZEIKUS, J.G., 1977. THE BIOLOGY OF METHANOGENIC BACTERIA. *Bacteriological Reviews*, 514-541.
- ZEHNDER, A.J.B. and BROCK, T.D., 1979. METHANE FORMATION AND METHANE OXIDATION BY METHANOGENIC BACTERIA. *Journal of Bacteriology*, 137 (1): 420-432.
- ZINDER, S.H. and MAH, R.A., 1979. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A THERMOPHILIC STRAIN OF Methanosarcina, UNABLE TO USE  $H_2-CO_2$  FOR METHANOGENESIS. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (5): 996-1008.