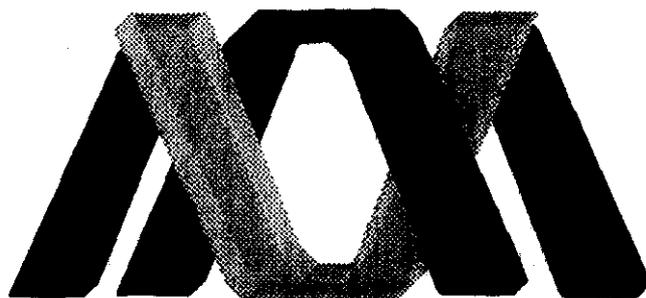


1.1.4.3



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA
✓ DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

✓ Hidrólisis de acetamida por un bicultivo de
Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina mazei

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

✓ MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

✓ Q. ZENIA MARÍA GUTIÉRREZ TINTOR

✓ Comité Tutorial: Dr. Oscar Monroy Hermosillo
M.en B.E. Florina Ramírez Vives

Jurado: Dra. Gabriela Moeller Chávez
M. en B. Luis Torres Bustillos

México, D.F. a 13 de Diciembre de 1999. ✓

1.1.4.3



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Posgrado en Biotecnología

Diciembre 13, 1999.

**M. en B.E. FLORINA RAMÍREZ VIVES
P R E S E N T E .**

Por medio de este conducto, la **Comisión del Posgrado en Biotecnología**, le agradece su participación como Secretaria en el examen de grado de Maestría de la alumna **ZENIA MARÍA GUTIÉRREZ TINTOR**, quien defendió y expuso la tesis "**Hidrólisis de acetamida por un bicultivo de *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina mazei***." a los 13 días del mes de diciembre de mil novecientos noventa y nueve.

Así mismo, le agradece su participación como Tutora durante el desarrollo de la misma.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E .
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"**

**DR. JAVIER BARRIOS GONZÁLEZ
COORDINADOR**



UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Michoacán y La Purísima, Col. Vicentina, México, D.F. 09340. Tels: (5) 723-63-51 (5) 724-49-99, Fax: (5) 724-47-12,
e-mail: psGBT@xanum.uam.mx internet: <http://www.iztapalapa.uam.mx/iztapala.www/division.cbs/biotecnolo/inicio.htm>

RESUMEN

En este trabajo se presentan las pruebas realizadas para estudiar la interacción de una bacteria aerobia (*Bacillus sphaericus*) y una bacteria anaerobia estricta (del género *Methanosarcina*), dentro de un reactor continuo. Se usó como sustrato la acetamida que es un compuesto xenobiótico tóxico, frecuentemente desechado en las aguas residuales de varios tipos de industrias químicas.

En primer lugar, en una cinética en lote a diferentes concentraciones de acetato pero igual volumen de inóculo, se determinaron las constantes de velocidad máxima de formación de metano ($v_{m\acute{a}x}$) y de constante de saturación (K_s) para *Methanosarcina mazei*, cuyos valores corresponden a 0.046 mmolCH₄/L.h y 124 mgAc/L respectivamente.

Después se hicieron cultivos en lote con *B. sphaericus* comparando dos especies de bacterias metanogénicas (*Methanosarcina barkeri* y *Methanosarcina mazei*) y diferentes concentraciones de oxígeno disuelto, manteniendo constantes la concentración de biomasa del bacilo y la de acetamida (20 mM). Los mejores resultados se obtuvieron cuando hubo un 90 % de desaparición de la acetamida y formación de metano (30 % de la producción máxima esperada) con la combinación de *B. sphaericus* y *M. mazei*.

Luego se hizo un cultivo de lote alimentado variándose la concentración de acetamida (A_m) en diferentes volúmenes de medio. Los resultados muestran que con los volúmenes de recambio usados, el oxígeno disuelto disponible permitía el aumento de *B. sphaericus*. Esto es, el acetato producido por la hidrólisis de acetamida es consumido principalmente por el mismo bacilo para producir biomasa, quedando una baja concentración de acetato residual (< 2 mM) para la metanogénesis, la cual no se vio favorecida.

Posteriormente se trabajó con el bicultivo de *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina mazei* en un cultivo continuo a diferentes tasas de dilución 1, 0.6 y 0.5 d⁻¹, variando el sustrato a 1.5, 2 y 3 gAm/L. Los resultados indican que no hay metanogénesis debido a una concentración residual de acetato muy pequeña (100mg/L), ya que solo se alcanzaron eficiencias del 40 %.

Se concluye que no hay metanogénesis bajo estas condiciones, ya que el acetato es consumido a mayor velocidad por *B. sphaericus*. Además de que el bicultivo no forma un conglomerado activo, debido a que *M. mazei* pudo estar inhibida por el oxígeno.

Descripción de la tesis.

Esta tesis consta de siete capítulos, al principio de cada capítulo se hace una breve introducción o resumen, se plantean los objetivos particulares para cada uno de ellos y al final se presentan las conclusiones particulares. Además consta de un índice general, uno de figuras y otro de tablas.

En el primer capítulo se hace una descripción de la digestión anaerobia en reactores UASB, las características más importantes de *Bacillus sphaericus* y de *Methanosarcina sp*, así como de las características de la acetamida. Asimismo se presentan algunos trabajos en donde se muestran las características de los conglomerados de reactores bajo condiciones anaerobias.

En el segundo capítulo se describen los métodos experimentales usados tanto para los experimentos en lote como para los ensayos en continuo y las técnicas de análisis entre las que destaca la de acetamida que fue desarrollada en el transcurso de esta tesis.

En el capítulo tres se muestran los resultados experimentales de las constantes cinéticas para *Methanosarcina mazei*.

En el capítulo cuatro se muestran los datos cinéticos en lote del bicultivo *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina sp* bajo condiciones controladas de oxígeno.

El quinto capítulo muestra la información obtenida de un cultivo de lote alimentado, a partir del cual se inició el cultivo continuo. Este último experimento fue el objetivo principal de este trabajo de tesis, es decir, observar la interacción entre una aeróbica y otra bacteria anaerobia para producir metano a partir de acetamida.

En el sexto capítulo se dan las conclusiones generales a las que se llegaron, además de una serie de recomendaciones para proyectos posteriores. Finalmente, se incluye toda la bibliografía consultada durante el trabajo.

Índice General

Resumen.	i
Índice General.	iii
Índice de figuras.	vi
Índice de tablas.	viii
Abreviaturas.	ix
1. Introducción	
1.1. Justificación de la tesis.	2
1.2. Objetivo general.	2
1.3. Hipótesis.	3
1.4. Digestión anaerobia.	3
1.4.1. Hidrólisis y acidogénesis	4
1.4.2. Acetogénesis	4
1.4.3. Metanogénesis	5
1.5. Modelo estructural de un consorcio granular anaeróbico	6
1.5.1. Consorcios aerobios dentro de la digestión anaerobia	9
1.6. Características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos involucrados en la degradación de acetamida en reactores anaerobios.	11
1.6.1. Género <i>Methanosarcina</i>	11
1.6.1.1. <i>Methanosarcina barkeri</i>	12
1.6.1.2. <i>Methanosarcina mazei</i>	12
1.6.2. <i>Bacillus sphaericus</i>	14
1.7. Reactor anaerobio UASB.	15
2. Materiales y métodos	
2.1. Introducción.	17
2.2. Inóculo.	18
2.3. Medio de cultivo.	18
2.4. Métodos analíticos	

2.4.1. Medición de acetamida.	19
2.4.2. Medición de acetato.	19
2.4.3. Medición de amonio.	20
2.4.4. Medición de metano.	20
2.4.5. Medición de biomasa.	21
2.4.6. Peso seco.	21
2.4.7. Medición de oxígeno disuelto.	21
2.4.8. Medición de pH.	22
2.5. Reactivos.	22
3. Determinación de las constantes cinéticas para <i>M. mazei</i>	
3.1. Resumen.	23
3.2. Objetivo particular	24
3.3. Diseño experimental.	24
3.4. Resultados y discusión	24
3.5. Conclusiones	27
4. Degradación de acetamida por bicultivos de bacterias metanogénicas y <i>B. sphaericus</i> en lote	
4.1. Resumen.	28
4.2. Objetivos particulares	29
4.3. Diseño experimental.	29
4.4. Resultados y discusión	30
4.5. Conclusiones.	36
5. Degradación de acetamida por un bicultivo <i>Bacillus sphaericus</i> y <i>Methanosarcina mazei</i>	
5.1. Introducción.	37
5.2. Objetivos particulares	38
5.3. Diseño experimental	
5.3.1. Reactor de lote alimentado	38
5.3.2. Reactor en continuo	39
5.4. Resultados	
5.4.1. Reactor de lote alimentado	41

5.4.2. Reactor en continuo	
5.4.2.1. Hidrólisis de acetamida	43
5.4.2.2. Cuantificación de la biomasa en el lecho del reactor continuo	49
5.4.2.3. Microscopía electrónica	50
5.5. Discusión	56
5.6. Conclusiones	
5.6.1. Reactor de lote alimentado	58
5.6.2. Reactor de cultivo continuo	59
6. Conclusiones y recomendaciones	60
7. Bibliografía.	63

Índice de figuras

- 1.1. Modelo conceptual de Guiot *et al.* (1992) para la distribución microbiana dominante de un lodo granular anaeróbico.
- 3.1. Producción de metano por *Methanosarcina mazei* a través del tiempo usando diferentes concentraciones de acetato.
- 3.2. Efecto de diferentes concentraciones de acetato en la velocidad de formación de metano para *Methanosarcina mazei*.
- 3.3. Linearización de los datos por la ecuación de Linerwaver-Burk para *Methanosarcina mazei* a diferentes concentraciones de acetato de sodio.
- 4.1. Vista de los bioensayos en los que fueron inoculados los bicultivos para medir la producción de metano.
- 4.2. Cultivo de *B. sphaericus* con 20 mM de *Am*(◆); productos formados *Ac*(▲) y NH_4^+ (+).
- 4.3. Bicultivo de *M. mazei* con *B. sphaericus* en la proporción 12 de oxígeno disuelto.
- 4.4. Bicultivo de *M. barkeri* con *B. sphaericus* en la proporción 12 de oxígeno disuelto.
- 4.5. Bicultivo de *M. mazei* con *B. sphaericus* en la proporción 17 de oxígeno disuelto.
- 4.6. Bicultivo de *M. barkeri* con *B. sphaericus* en la proporción 17 de oxígeno disuelto.
- 4.7. Bicultivo de *M. mazei* con *B. sphaericus* en la proporción 28 de oxígeno disuelto.
- 4.8. Bicultivo de *M. barkeri* con *B. sphaericus* en la proporción 28 de oxígeno disuelto.
- 5.1. Reactor de lote alimentado.
- 5.2. Reactor continuo inoculado con *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina mazei*.
- 5.3. Comportamiento del reactor de lote alimentado, el cual muestra la desaparición de acetamida (◆), la formación de acetato (▲) y la aparición de metano (*).
- 5.4. Comportamiento de la acetamida a la entrada (◆), a la salida (■), del acetato a la entrada (▲), a la salida (●) y la detección de metano (*) a las diferentes cargas volumétricas en el reactor continuo.
- 5.5. Observaciones en el microscopio de contraste de fases (100x) de una muestra del lecho de lodos del reactor continuo. En el cuadro izquierdo (a) se ve una gran acumulación de biomasa, alcanzando a diferenciar al bacilo. En el cuadro derecho (b) se observa claramente al bacilo formando una especie de red, que concuerda justo donde se ve el pigmento.

- 5.6. Espectro de infrarrojo del pigmento colorido obtenido en el reactor en continuo usando como fuente de carbono el acetato de sodio.
- 5.7. Reactor continuo con alimentación de medio de Balch sin reductores, usando como sustrato ácido acético.
- 5.8. Vista del lecho del reactor al inicio del experimento en continuo.
- 5.9. Vista del lecho del reactor continuo al final de la etapa experimental.
- 5.10. Imagen panorámica en MEB (8Kv; 90 μ m) de un flóculo obtenido del reactor continuo, en donde se observa la predominancia y algunas aglomeraciones de *B. sphaericus*.
- 5.11. Imágenes de MEB (8Kv; 30 μ m) del flóculo obtenido del reactor. Las figuras muestran una ampliación de la parte superior izquierda de la Figura 5.10. En la superior se observan algunas aglomeraciones de *B. sphaericus*, así como una pequeña aglomeración de *M. mazei*. En la imagen inferior se aprecia un cúmulo de *M. mazei* y la predominancia de *B. sphaericus*.
- 5.12. Imágenes de MEB de un flóculo obtenido del reactor. La figura superior (8Kv; 90 μ m) muestran otra toma panorámica del mismo gránulo en donde se ve la predominancia de *B. sphaericus*. La imagen inferior (8Kv; 30 μ m) es una ampliación en la que se observa el bicultivo, así como la presencia de filamentos largos.
- 5.13. Imagen de MEB (8Kv; 900 μ m) del flóculo obtenido del reactor, la cual muestra una serie de filamentos que está presente en otra fracción del gránulo, lo que sugiere que es parte de los exopolímeros formados por ambas bacterias.
- 5.14. Imagen de MEB (8Kv; 30 μ m) de un flóculo del reactor, en donde se ve la formación de una red de *B. sphaericus* y en la parte superior derecha un bacilo mucho más grande que el resto de la población y lo reportado en la literatura.
- 5.15. Imágenes de MEB del flóculo del reactor. En la imagen superior (8Kv; 30 μ m) se contempla el bicultivo en donde el *B. sphaericus* está recubriendo las aglomeraciones formadas por parte de *M. mazei*. En la imagen inferior (5Kv; 90 μ m) se observan otras aglomeraciones del bicultivo.
- 5.16. Imagen de MEB (10Kv; 30 μ m) de un flóculo del reactor, en donde se contempla el bicultivo, resaltando la presencia de *Methanosarcina mazei*.

- 5.17. Eficiencia de hidrólisis de acetamida con respecto a la carga volumétrica. (◆): DQO y (▲): %Am
- 5.18. Eficiencia de remoción de acetato en función de la concentración de acetamida residual.

Índice de tablas

- 1.1. Reacciones realizadas durante la metanogénesis.
- 1.2. Características fisiológicas y taxonómicas de las especies de *Methanosarcina*.
- 1.3. Algunos valores de constantes cinéticas para *Methanosarcina barkeri*.
- 1.4. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de *Bacillus sphaericus*.
- 1.5. Características fisiológicas y taxonómicas de *Bacillus sphaericus*.
- 2.1. Preparación del medio de cultivo.
- 3.1. Velocidades iniciales de formación de metano y tiempo de la fase lag realizada por *Methanosarcina mazei* para las diferentes concentraciones de acetato.
- 3.2. Constantes cinéticas para algunas cepas de *Methanosarcina*.
- 4.1. Proporciones en volumen de medios usados en los bioensayos.
- 4.2. Degradación de acetamida por bicultivo de *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina sp* a temperatura de 35°C; pH de 7.0 y $Am_i=20mM$.
- 4.3. Constantes cinéticas para *B. sphaericus* y de *M. mazei*
- 5.1. Diferentes concentraciones de acetamida en la alimentación del reactor de lote alimentado.
- 5.2. Diseño experimental para el crecimiento de *B. sphaericus* y *M. mazei* en un cultivo continuo.
- 5.3. Hidrólisis de acetamida y formación de productos medidos por etapa en el reactor.
- 5.4. Resultados de la estimación de biomasa dentro del reactor para las bacterias, durante la alimentación con acetamida y acetato.
- 5.5. Comparación de las actividades específicas de *M. mazei* bajo diferentes condiciones.

Abreviaturas

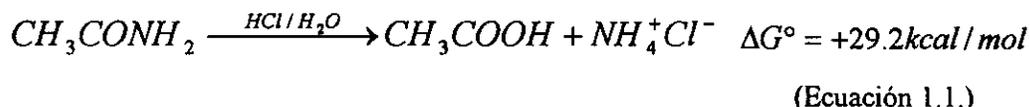
A	Adenina
Ac	Acetato
ADN	Ácido desoxiribonucleico
A _{esp}	Actividad específica
Am	Acetamida
ATCC	American Type Culture Collection
Au	Símbolo químico del oro
Bd	Pares de bases
Bv	Carga volumétrica
C	Citosina
C ¹²	Símbolo químico del carbono
CH ₄	Metano
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DQO	Demanda Química de Oxígeno
F ₄₂₀	Factor sensible a 420 nm
F ₄₃₀	Factor sensible a 430 nm
F _{390-A}	Factor sensible a 390 nm unido a adenina
F _{390-G}	Factor sensible a 390 nm unido a guanina
G	Guanina
K _s	Constante de saturación
μ _{max}	Velocidad máxima de crecimiento
MEB	Microscopía electrónica de barrido
η	Eficiencia
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria
NCTC	National Collection of Type Cultures
NH ₄ ⁺	Amonio
OD	Concentración de oxígeno disuelto
rARN	Ácido ribonucleico ribosomal
spp	Especies
SST	Sólidos Suspendidos Totales
SSV	Sólidos Suspendidos Volátiles
TRH	Tiempo de residencia hidráulico
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
v _{máx}	Velocidad máxima de formación de metano
v/v	Relación volumen a volumen determinados
Y	Constante de rendimiento celular

Capítulo 1

Introducción

1.1. Justificación de la tesis

La acetamida es uno de los principales contaminantes producido en las industrias textil, farmacéutica y de pinturas (Moretti *et al.* 1978). La toxicidad de la acetamida además de ser altamente irritante, es un agente cancerígeno y mutagénico en ratas (Merck, 1994; DiGeronimo *et al.* 1967). Sin embargo, Gorniak *et al.* (1994) indican que la acetamida actuó como antídoto en ratas que ingirieron *Palicourea marcgravii*, vegetal que en sus hojas contiene ácido monofluoroacético, el cual es el principio activo tóxico de la planta. Es un compuesto muy estable a condiciones ambientales por no encontrarse libre en la naturaleza se dice que es xenobiótico. Los valores de la energía libre de Gibbs (ΔG°) calculados por Mavrouniotis (1991), ecuación 1.1; indican la estabilidad de la acetamida.



La degradación biológica de la acetamida puede llevarse a cabo por bacterias de varios géneros, como por ejemplo *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Acetobacter*, entre otras (Toerien, 1967; Ramírez, 1995 y 1996; Guyot *et al.* 1994 y 1995).

Torres *et al.* (1992), Guyot *et al.* (1994 y 1995) y Ramírez *et al.* (1998), demostraron que la degradación de la acetamida se lleva a cabo en condiciones anaerobias por un consorcio microbiano mixto debido a la interacción de una bacteria aeróbica y una bacteria metanogénica.

En esta tesis se estudia la interacción entre *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina mazei*, para degradar acetamida hasta metano.

1.2. Objetivo general

- Estudiar en bicultivo la interacción de una bacteria metanogénica (del género *Methanosarcina*) con una aerobia estricta (*Bacillus sphaericus*) en la degradación de un compuesto no metanizable, la acetamida. Se revisó la interacción del bicultivo con dos cepas metanogénicas para estudiar la diferencia como por ejemplo la sensibilidad al oxígeno en pequeños paquetes de células (tetradas) y conglomerados grandes.

1.3. Hipótesis

- “Es posible sostener el crecimiento de *Bacillus sphaericus* y de una *Methanosarcina* en bicultivo con acetamida. En este proceso *Bacillus sphaericus* hidrolizará el sustrato a amonio y acetato; luego las dos competirán bajo condiciones controladas, por el acetato, la bacteria aerobia para producir biomasa y la bacteria anaerobia para producir metano”.

1.4. Digestión anaerobia

Zitomer *et al.* (1997) comentan la amplitud de condiciones que implica el término anaerobio, ya que para los zoólogos y paleontólogos éstas condiciones se dan a concentraciones menores de 0.8 mgO₂/L, mientras que para los microbiólogos este debe ser menor a 0.08 mgO₂/L presentando un espectro infinito de posibilidades.

De acuerdo a Toerien y Hattingh (1969) la digestión anaerobia es un proceso que ocurre en la naturaleza y puede ser definido como una serie de transformaciones biológicas en las cuales la materia orgánica, en ausencia de oxígeno, es convertida a metano y bióxido de carbono. En el último paso los microorganismos metanogénicos utilizan sustratos simples como el H₂/CO₂, formiato, metanol, metilaminas, acetato y CO.

En la tabla 1.1. se muestran algunas reacciones realizadas durante la metanogénesis (Zehnder, 1988). En ella se muestra al CO₂ como aceptor final de electrones, el cual es reducido a metano y en donde el H₂ es el donador de electrones. También se muestran otras tres reacciones, una a partir de formiato y las restantes a partir de acetato, observándose que todas ellas son termodinámicamente espontáneas.

Tabla 1.1. Reacciones realizadas durante la metanogénesis.

Ecuación	ΔG° (KJ/reacción)	Referencia
$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	- 130.7	Madigan <i>et al.</i> (1998)
$4HCOO^- + 4H^+ \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	- 144.5	Thauer (1998)
$CH_3COO^- + H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2$	- 36	Daniels (1993)
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	- 31	Daniels (1993)

Lawrence y McCarty (1967) propusieron dividir el proceso en tres etapas y es McInerney y Bryant (1981) quienes proponen el modelo según el cual las complejas relaciones

microbianas que se llevan a cabo para degradar la materia orgánica son la hidrólisis y acidogénesis, la acetogénesis y la metanogénesis.

1.4.1. Hidrólisis y acidogénesis

La primera etapa es la hidrólisis de los polímeros complejos, polímeros naturales o macromoléculas, tales como polisacáridos, proteínas y grasas, a unidades más simples o monoméricas. En este paso intervienen por ejemplo las bacterias celulolíticas y otras hidrolíticas anaerobias estrictas o facultativas.

Autores como Hattingh *et al.* (1967), Kotzé *et al.* (1968) y Thiel *et al.* (1968) han establecido y medido la presencia de varias enzimas extracelulares como las celobiasas, las proteasas y las amilasas en digestores anaerobios. Las enzimas extracelulares degradan moléculas orgánicas complejas a unidades más pequeñas, en donde los resultados indicaron que las actividades enzimáticas estuvieron correlacionadas de manera significativa con algún parámetro tanto químico como biológico.

Los productos finales de las poblaciones de bacterias en esta etapa son ácidos grasos saturados (valérico), ácidos grasos volátiles (propiónico, butírico y acético), lactato, etanol, formiato y bióxido de carbono. McCarty *et al.* (1963) concluyeron que el ácido acético es el más abundante y además el intermediario más importante. La producción de ácidos en esta etapa tiende a disminuir el pH y a provocar la inhibición de la digestión anaerobia (Ramírez, 1992).

Rivera *et al.* (1993) proponen un ejemplo de hidrólisis y fermentación a partir de la glucosa como se muestra en la ecuación 1.4.1.



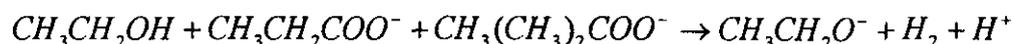
Ecuación 1.4.1.

1.4.2. Acetogénesis

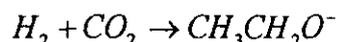
El segundo paso es la oxidación de los ácidos grasos volátiles (AGV) obtenidos en la acidogénesis, como los ácidos propiónico, butírico, succínico, alcoholes los cuales son transformados a ácido acético, hidrógeno y CO₂ por un grupo de bacterias acetogénicas

productoras obligadas de hidrógeno (OHPA por sus siglas en inglés). Las reacciones que realizan son inhibidas por el hidrógeno que producen, por lo que es necesario que éste no se acumule en el medio, por lo que tienen una estrecha relación con bacterias que remueven el hidrógeno (hidrogenofílicas). De manera concertada, la etapa que se conoce como acetogénesis es cuando los homoacetógenos producen acetato a partir del H_2 y CO_2 y las bacterias oxidadoras (sintrofas) de ácidos grasos continúan la fermentación hasta acetato. Es importante señalar que todo el hidrógeno producido en las etapas fermentativa y acetogénica debe ser consumido de inmediato por las bacterias homoacetogénicas, por las metanogénicas hidrogenofílicas o por las sulfatoredutoras, para poder mantener un balance energético favorable para llevar a cabo las reacciones acetogénicas a partir de los compuestos de la primera etapa (Madigan *et al.* 1998).

Las ecuaciones 1.4.2. a y b indican las reacciones llevadas a cabo en la etapa acetogénica (a) y homoacetogénica (b) propuestas por Rivera *et al.* (1993).



ecuación 1.4.2. (a)



ecuación 1.4.2. (b)

1.4.3. Metanogénesis

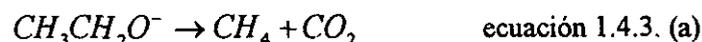
Esta es la última etapa de la digestión anaerobia, en donde el sustrato principal es el acetato. A partir de éste, las bacterias metanogénicas acetoclásticas llevan a cabo la producción de metano por el rompimiento del acetato en los grupos metilo y carboxilo del acetato. Por otro lado, bacterias metanogénicas hidrogenofílicas usan los electrones del H_2 para reducir al CO_2 y producir metano.

McCarty *et al.* (1963) junto con otros investigadores han concluido que aproximadamente el 70 % del metano, en reactores, se origina a partir de acetato, mientras que el otro 30 % del metano tiene su origen de la reducción del bióxido de carbono por el hidrógeno.

Desde la década de los cincuenta han habido investigadores que han propuesto las vías de formación de metano, involucrando un acarreador de carbono hipotético o a través de un intermediario. Por ejemplo, Blaylock y Stadtman (1964) mostraron que el grupo metilo de

la metilcobalamina servía como precursor de metano en extractos libres de células de *Methanosarcina barkeri*. Recientemente Thauer (1998) publicó un trabajo en el cual explica la bioquímica de la metanogénesis propuesta hasta hoy en día.

Las ecuaciones 1.4.3. a y b indican las reacciones llevadas a cabo en las etapas acetoclástica (a) e hidrogenotrofa (b) propuestas por Rivera *et al.* (1993).



1.5. Modelo estructural de un consorcio granular anaeróbico

Guiot *et al.* (1992) propusieron un modelo de la organización de poblaciones en los granos anaeróbicos estructurado en multicapas. En él, las asociaciones de bacterias sintróficas, incluyendo a las consumidoras de hidrógeno, deben estar localizadas en una capa externa en donde predominan las acidogénicas y en el centro se sitúan a las metanogénicas acetoclásticas.

La teoría de Guiot *et al.* (1992) se debió a observaciones bajo el microscopio electrónico, de granos fragmentados; así mismo como del análisis de actividades específicas de granos gastados gradualmente y por los cambios en la actividad específica metabólica con el tamaño de distribución y extensión del grano (ver figura 1.1.).

Los granos pueden ser de 1 ó 2 milímetros de diámetro y pueden acumularse en el reactor en grandes cantidades, con una apariencia bien definida. Es posible que esto sea debido a la velocidad ascendente en los reactores UASB la cual crea una presión constante de selección para los organismos, los cuales pueden ser adheridos a otros o formar granos con buena sedimentación (lo que se conoce como auto-inmovilización). La configuración granular presenta varias ventajas desde el punto de vista de la ingeniería de reactores como por ejemplo, los microorganismos por lo general están densamente empacados; no hay espacio perdido en los soportes inertes; la esfericidad provee un máximo en la relación microorganismo y espacio; aunque la enorme densidad granular es equivalente a la densidad de cada célula bacteriana, estos muestran excelentes propiedades de sedimentación por su gran tamaño (Hulshoff Pol *et al.*; 1986).

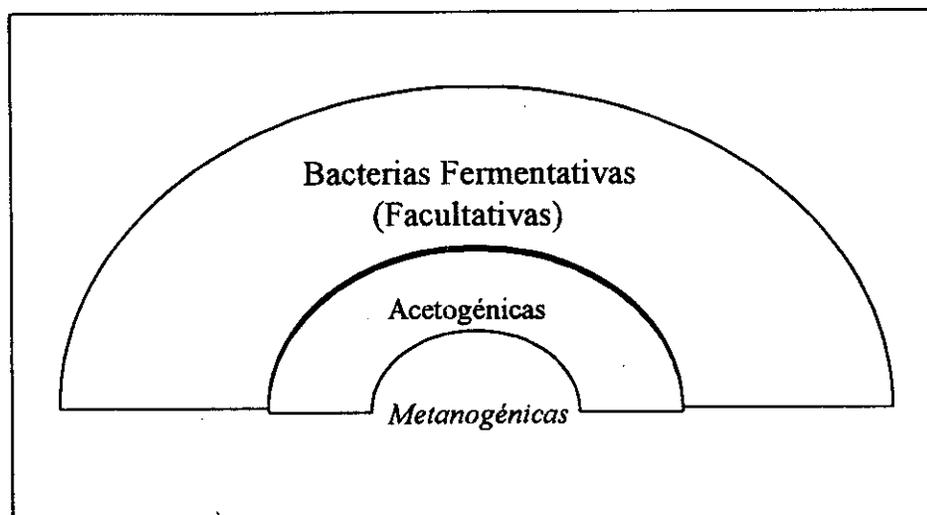


Figura 1.1. Modelo conceptual de Guiot *et al.* (1992) para la distribución microbiana dominante de un lodo granular anaeróbico.

El proceso llevado a cabo en reactores tipo UASB se basa en la idea de que al interactuar o mantenerse muy cercanos los microorganismos presentes, efectúan una disminución de la actividad de degradación y posteriormente una desintegración del lodo granular. Este tipo de asociaciones sintróficas aparecen como colonias mixtas en lugar de microcolonias separadas. Las relaciones sintróficas en los flóculos o granos no son solamente de importancia para la transferencia de hidrógeno entre especies sino también para otras inter especies que transfieren otros sustratos (Rivera *et al.* 1993).

Una hipótesis del modelo estructural propuesto es que la degradación anaeróbica completa de la materia orgánica a bióxido de carbono y metano, requiere de la acción simultánea de varios grupos metabólicos, por lo que la agregación de microorganismos anaeróbicos dentro de un grano optimizaría la cooperación entre los organismos participantes. Esto es, por la reducida distancia de difusión para la transferencia de metabolitos además de incrementar de manera estrecha la asociación celular. La termodinámica del proceso, la cual es controlada por la presión parcial de hidrógeno, no debería suceder a menos que el hidrógeno producido sea consumido por las bacterias hidrogenotrofas (Boone y Bryant, 1980).

La formación de granos con aguas residuales de carbohidratos complejos incluye una amplia variedad de tipos morfológicos bacterianos (Guilot *et al.* 1992), en donde los grupos

tróficos aseguran los pasos exitosos de conversión desde el sustrato inicial hasta los productos finales. Algunos autores han sostenido que estos grupos tróficos están completamente distribuidos a través del espacio granular y una organización interna no es obvia. Bochem *et al.* (1982) describieron la apariencia estratificada de granos termófilos alimentados con acetato.

Beeftink y Staugaard (1986) encontraron una baja densidad celular en el centro del grano producido por la inactivación y autólisis de las células internas debido a la deficiencia de sustrato provocada por las limitaciones de difusión, en un reactor acidificado y alimentado con glucosa. Esto demostró que las morfologías activas en la zona para acidogénicas está limitada por la profundidad, en cambio sostienen la idea de un espacio interno a los granos en una zona activa solo para microorganismos acidotróficos.

Un estudio realizado por Zitomer *et al.* (1997) en presencia de oxígeno demostró que no se formaron granos y que los procesos aeróbicos y metanogénicos no ocurren de manera secuencial. Observó que los cultivos que recibieron oxígeno suficiente para oxidar aproximadamente el 30% del DQO presentaron de 10 a 18 horas de fase *lag*, la cual es significativa en la producción de metano, además demostró que las bacterias metanogénicas no pueden sobrevivir al incrementarse el oxígeno disuelto sino que, sólo bajo algunas condiciones pueden producir metano al mismo tiempo que se utiliza el oxígeno.

Rivera *et al.* (1993) propusieron que para entender el proceso de granulación del lodo anaerobio es importante conocer tres factores que juegan un papel decisivo en la agrupación bacteriana inicial:

1. La naturaleza del grano, incluyendo su porosidad, estructura y dimensión de poro, carga superficial, densidad de las partículas (en caso de reactores de lecho fluidizado y expandido), área superficial específica y tensión superficial.
2. Factores ambientales como pH, temperatura, fuerza iónica, composición y concentración de los compuestos orgánicos en la solución y régimen de flujo.
3. Las propiedades de los microorganismos involucrados tales como las características de superficie incluidos la hidrofobicidad y movilidad electroforética, la fisiología bacteriana (la producción de polímeros extracelulares) y la morfología bacteriana.

También, Rivera *et al.* (1993) indicaron las ventajas de la formación de agregados bacterianos, las que a continuación se enlistan.

1. Las poblaciones de microorganismos sintróficos establecidas como asociaciones multicelulares bajo condiciones fisiológicas favorables tienden a formar granos o flóculos.
2. La interacción de microorganismos sintróficos dentro de un agregado trae como consecuencia la simbiosis.
3. Se favorece el crecimiento en el interior de un grano, a diferencia del crecimiento de células suspendidas libremente, debido a que pueden aumentar la asimilación de nutrientes.
4. La granulación protege a las células de los protozoarios depredadores, por ejemplo de los ciliados anaeróbicos.
5. La distancia de difusión para intermediarios de fermentación es mínima en los granos; lo cual produce una mayor eficiencia que conserva cada fracción de energía disponible en un sistema de degradación compleja.
6. Se forma un microambiente más favorable dentro del agregado en el que el metabolismo aún es posible, a pesar de que fuera del grano existan condiciones desfavorables para el crecimiento (como por ejemplo los valores extremos de pH y la presencia de oxígeno).

1.5.1. Consorcios aerobios dentro de la digestión anaerobia

Toerien *et al.* (1969) hicieron una notable referencia acerca del descubrimiento de las bacterias metanogénicas además de su aislamiento. Las bacterias metanogénicas están aparentemente muy esparcidas en la naturaleza y pueden ser encontradas en el suelo ordinario de jardín, lodo negro, en el rumen de animales herbívoros, pantanos, lagunas, lagos y en los procesos de tratamiento de aguas de alcantarillado.

De manera frecuente no se concibe que la metanogénesis y la respiración aeróbica sucedan en el mismo cultivo, debido a que se utiliza el oxígeno en las reacciones biológicas aeróbicas, pero es potencialmente tóxico para los microorganismos metanogénicos. Sin embargo, bajo condiciones limitadas de oxígeno la biotransformación puede ser efectuada por una mezcla de cultivos (Zitomer *et al.* 1997).

Toerien *et al.* (1967) aislaron una gran variedad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas de lodos, bajo tratamiento por digestión anaerobia. Ellos concluyeron que el grupo de bacterias anaeróbicas del tipo acidogénicas formaban parte muy importante y constante de la población total del reactor. Además, encontraron que ambos grupos estaban correlacionados de manera significativa con parámetros químicos tales como pH, contenido de ácidos grasos volátiles, alcalinidad y actividad enzimática de la vía glucolítica y del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

En los sistemas aireados, la supervivencia de los metanogénicos se atribuye a la formación de micronichos anaerobios exentos de oxígeno (Field *et al.* 1995). Los microorganismos facultativos en la superficie de las partículas de los lodos granulares consumen el oxígeno antes de que éste se difunda en las regiones internas (Kato *et al.* 1993). Este efecto de desplazamiento de oxígeno puede explicar el desprendimiento de metano de los tanques de aireación de lodos activados (Wable *et al.* 1994) o la presencia de bacterias metanogénicas en lodos activados aeróbicos (Lens *et al.* 1995) o al exitoso arranque de los procesos metanogénicos inoculados con lodos aeróbicos (Wu *et al.* 1987).

Zitomer y Shrout (1997) en un experimento con limitaciones de oxígeno alcanzaron la mayor remoción de DQO del efluente y una recuperación más rápida de pH después de una alta carga de carbohidratos en diferentes sistemas anaerobios estrictos. La velocidad de remoción de la DQO es esencial en sistemas anaerobios y no es afectada en modo adverso por una limitada aireación e incluso se incrementa bajo ciertas condiciones. Otros posibles beneficios de sistemas metanogénicos con oxígeno incluyen la degradación de diversos compuestos orgánicos específicos y mezclas que proceden de secuencias reductivas y oxidativas de reacciones biológicas y degradación de compuestos orgánicos específicos a través del cometabolismo de las reacciones metanotróficas.

Los sistemas limitados de aireación deberían ser usados en el futuro combinando los beneficios de los tratamientos anaeróbicos y aeróbicos, tales como la baja producción de

biomasa de los sistemas anaeróbicos y la rápida recuperación de altas cargas de los sistemas aeróbicos; para la mineralización de compuestos orgánicos específicos (xenobióticos y recalcitrantes) o mezclas que se transforman a través de una combinación de pasos oxidativos y reductivos.

1.6. Características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos involucrados en la degradación de acetamida en reactores anaerobios

Las especies responsables de la degradación de acetamida en reactores anaerobios que se manipularon bajo condiciones de aireación controladas, son *Bacillus sphaericus*, *Methanosarcina barkeri* y *Methanosarcina mazei*, por lo que es conveniente hacer una breve revisión de las características de estos microorganismos.

1.6.1. Género *Methanosarcina*

Los microorganismos metanogénicos son reconocidos como arqueobacterias debido a un análisis genealógico molecular basado en el conocimiento de la secuencia del segmento 16S de su ácido ribonucleico ribosomal (16S rRNA), junto con los análisis químicos de su pared celular los cuales indican que no contienen mureína y su membrana citoplasmática está constituida principalmente por lípidos poliisoprenoides (Balch *et al*, 1979). Además, las bacterias metanogénicas se diferencian por contener coenzimas como la F₄₂₀, la cual se degrada al contacto con el oxígeno formando, de manera paralela, los derivados F₃₉₀-A y F₃₉₀-G, perdiéndose un parámetro característico de estas bacterias: la fluorescencia (Rivera, *et al* 1993). De acuerdo a König y Stetter (1989) las bacterias anaerobias metanogénicas pertenecen al Reino de las Arqueobacterias y son representantes de la tercera línea descendiente en la evolución de la vida, definición basada en la comparación secuencial del ácido ribonucleico ribosomal (rARN).

De manera particular la clase de las arqueobacterias metanogénicas a la que pertenecen las bacterias de nuestro interés, *M. barkeri* y *M. mazei* son células capaces de formar metano como producto metabólico final predominante. Los sustratos que utilizan más comúnmente son la mezcla H₂/CO₂ y la de H₂/metanol; al formiato, al acetato, al metanol y a las metilaminas. Son anaerobias estrictas; producen epifluorescencia azul-verdosa cuando son

expuestos a la longitud de onda de 420 nm. Las células poseen coenzima M, F₄₂₀, F₄₃₀ y metanopterina (Boone y Mah, 1989). Las especies son del orden *Methanomicrobiales*, de la familia *Methanosarcinaceae* y del género *Methanosarcina*.

1.6.1.1. *Methanosarcina barkeri*

De acuerdo a Boone y Mah (1989) son cuerpos cocoides que aparecen en agregados irregulares de 1.5 a 2 micrómetros de tamaño. Contienen membrana isoprenoide C₂₅ como principal lípido neutral, además son cepas que no son disueltas o destruidas por dodecil sulfonato de sodio (ver Tabla 1.2.).

Su metabolismo productor de energía involucra la formación de metano; los sustratos usados pueden ser la mezcla H₂/CO₂, el metanol, la metilamina, la dimetilamina, la trimetilamina, el acetato y el monóxido de carbono. El grupo metilo del metanol o el acetato son reducidos a metano sin oxidación intermedia a CO₂. No pueden fermentar los carbohidratos, aminoácidos, formiato, etanol, propionato y butirato.

Utilizan como fuente de nitrógeno al amoníaco, incluso pueden fijar el nitrógeno molecular y como fuente de azufre usa sulfuros. El crecimiento y formación de metano es más rápido en un medio con H₂/CO₂ o metanol que con acetato. La composición molar de los pares de bases (Bd) guanina y citosina (G+C) del ADN es de 39 a 44 %. Su hábitat se encuentra en los fangos de aguas frescas y marinas, rumen de rumiantes, lagunas con desechos animales y en lodo residual de digestores anaerobios. Los diversos tipos de cepas comerciales son en primer lugar la MS que corresponde a DSM 800 y ATCC 43569; en segundo lugar la cepa 227 (utilizada en este trabajo) que corresponde a la DSM 1538 y a la ATCC 43567; por último, la UBS que es equivalente a la DSM 1311 (Boone y Mah, 1989).

1.6.1.2. *Methanosarcina mazei*

Son colonias de color blanco amarillento a amarillento bronce en tubos rodados (ver Tabla 1.2.), con apariencia granular cuando el cultivo es joven (<7 días). De acuerdo a Boone y Mah (1989) las colonias viejas son lisas, circulares, transparentes y brillantes. La

composición molar de los pares de bases de G+C en ADN es de 42%. Utiliza metilaminas, metanol, H_2/CO_2 y acetato como sustratos catabólicos.

Su hábitat se encuentra en las pilas de hojas en descomposición, suelos de jardín, digestores de lodos residuales y sólidos urbanos, barro negro y heces de animales herbívoros. Los diversos tipos de cepa comerciales son la S-6 (utilizada en este trabajo) que corresponde a la DSM 2953 y a la ATCC 43572; la cepa Z-558 es equivalente al biotipo 3 y a la DSM 2244. Para la LYC se encuentra como ATCC 43573 y por último para MC3 se encuentra como DSM 2907.

Algunos valores de constantes cinéticas para *Methanosarcina barkeri* encontrados en la literatura se muestran en la Tabla 1.3. Para la cepa *Methanosarcina mazei* no se encontraron valores de las constantes cinéticas.

Tabla 1.2. Características fisiológicas y taxonómicas de las especies de *Methanosarcina*.

Prueba	<i>Methanosarcina barkeri</i>	<i>Methanosarcina mazei</i>
Morfología	Cocos ¹ largos y Pequeños agregados ²	Cocos irregulares
Dimensiones	1.5 a 2.0 μm	1.0 a 3.0 μm
Gram	Positiva	Negativa
Motilidad	Negativa	Negativa
pH	5-7 ²	5.5 a 8.5 ²
Temperatura de crecimiento	35 a 42 ² °C	20-45 ²
Concentración de NaCl para el crecimiento	<0.2 ² M	<0.1 ² M
Tiempo de duplicación	Cepa 227 1.44 a 1.5 ³ d Cepa TM-1 0.48 ³ d Cepa MS 1.39 ³ d	Cepa S-6 0.69-1.29 d

¹ König y Stetter, 1989; ² Boone *et al.*, 1993; ³ Zinder y Mah, 1979.

Tabla 1.3. Algunos valores de constantes cinéticas para *Methanosarcina barkeri*.

Parámetro	Valor	Referencia
K_m aparente a p_{H_2} 1700 Pa	13.0 μM	Robinson y Tiedje, 1984.
K_m aparente para acetato cepa Fusaro	3.0 mM	Schönheit <i>et al.</i> 1982.
K_m aparente para acetato cepa 227	4.5 mM	Westermann <i>et al.</i> 1989.

1.6.2. *Bacillus sphaericus*

Es una bacteria aerobia perteneciente al género *Bacillus*, el cual a su vez forma parte del grupo con endosporas de la familia *Bacillaceae*.

Este género fue caracterizado por Cohn (Krieg, 1984), encontrando que en general son células que forman bastones rectos, junto con endosporas muy resistentes bajo condiciones adversas y no más de una por célula. Son bacterias Gram positivas, flageladas, aerobias o anaerobias facultativas. El oxígeno es el aceptor final de electrones el cual puede ser reemplazado por otros compuestos en algunas especies. La morfología y tamaño de las colonias son muy variables, además algunas pueden producir pigmentos en ciertos medios. La mayoría de las especies tienen una unión cruzada con ácido tipo meso-diaminopimélico en su pared celular y los fosfolípidos que predominan son fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol.

De acuerdo a Meyer y Neide (Krieg, 1984), *Bacillus sphaericus* crece en agar con una variedad de nutrientes en colonias compactas, amontonadas o extendidas sobre la superficie. Algunas cepas no comunes producen colonias con pigmentos rosas. La composición molar de los pares de bases de G+C en el ADN que se ha registrado para 68 cepas es de 34 a 40%. Esta bacteria crece en una gran variedad de sustratos de los cuales se aprecia un mayor consumo de ácido pirúvico, biotripticasa, gelatina, acético, acetamida, propionamida, isobutiramida, casaminoácidos y extracto de levadura (Ramírez, 1995). Se han aislado de suelos, sedimentos marinos y de agua fresca, leche, alimentos antiácidos y lodos anaerobios. El tipo de cepa comercial es la ATCC 14577 que corresponde a la DSM 28, NCIB 9370 y NCTC 10338.

En la tabla 1.4. se muestra la velocidad de crecimiento en diferentes condiciones (Ramírez, 1995). Un parámetro importante es el valor de K_s , que se determinó a una concentración de oxígeno del 20% cuyo valor es de 0.330%.

Tabla 1.4. Velocidades específicas de crecimiento (μ) de *Bacillus sphaericus*.

Parámetro medido	Velocidad específica (h^{-1})
Temperatura	0.110
Cloruro de sodio	0.107
Extracto de levadura y peptona de caseína	0.095
Oxígeno	0.126
pH	0.220

Ramírez, 1995

Otras características fisiológicas y taxonómicas de *Bacillus sp* se observan en la tabla 1.5, de la que resalta, por ejemplo, que tiene motilidad debido a los flagelos peritricos que posee y presenta una respuesta positiva de la citocromo oxidasa, ya que contiene citocromo b.

Tabla 1.5. Características fisiológicas y taxonómicas de *Bacillus sphaericus*.

Prueba	Respuesta
Morfología	Bastones rectos
Dimensiones	1 a 2.5-5 μ m
Gram	Positiva
Motilidad	Positiva
Esporas	Redondas, resistentes a 30 minutos de pasteurización
pH	5 a 8.5
Temperatura de crecimiento	20 a 40°C
Oxígeno	5 a 50%
Catalasa	Positiva
Citocromo oxidasa	Positiva
%G-C	34

Ramírez, 1995

1.7. Reactor anaerobio UASB

El proceso de digestión anaerobia es una buena alternativa para el tratamiento de aguas residuales debido a las ventajas que presenta con relación a los sistemas aerobios: poca formación de biomasa, degradación de desechos con la formación de una fuente alterna de energía como es el metano y que representa un proceso económico (Ramírez, 1993).

La necesidad de mejorar la eficiencia en la digestión anaerobia ha dado lugar al desarrollo de diversos reactores. Los ejemplos más significativos de tipo de reactores son los filtros anaerobios, los de película fija de flujo descendente, el lecho anaerobio expandido y el lecho fluidizado (Kato, 1994). Uno de los más importantes es el reactor anaerobio de lecho de lodos y flujo ascendente (UASB por sus siglas en inglés) desarrollado por Lettinga *et al.* (1980).

El reactor UASB opera con flujo ascendente a través de un lecho de lodos de la columna permitiendo que los microorganismos presentes en él floculen y sedimenten en el fondo del reactor. El aspecto fundamental de los reactores UASB lo constituyen los lodos granulares indispensables para su correcto funcionamiento. La característica de éstos, es contar con

una elevada actividad metanogénica y a su capacidad de sedimentación lo que les permite tener un alto grado de retención en el reactor, lográndose por lo tanto, separar el tiempo de residencia hidráulica del tiempo de retención celular (Ramírez, 1993).

Otra de las ventajas que presenta este tipo de tecnología en el tratamiento de aguas residuales es por las altas cargas orgánicas (del orden de 10 kgDQO/m³d), el tamaño del contenedor ocupa menos espacio respecto a los reactores aeróbicos.

Capítulo 2

Materiales y metodologías generales

2.1. Introducción

En este trabajo se observa que un compuesto tóxico, como la acetamida, es capaz de ser degradado por un bicultivo de bacterias aerobias y anaerobias que cohabitan en un mismo sistema. Para ello se desarrollaron experimentos en lote para evaluar las condiciones con las cuales debería operarse el bicultivo en continuo. Las decisiones se hicieron mediante el seguimiento de ciertos parámetros analíticos, los cuales son el principal tema de discusión de este capítulo y de los cuales se muestra a continuación su procedimiento.

2.2. Inóculo

Bacillus sphaericus se aisló y caracterizó por Ramírez (1993 y 1996). A partir de una alicuota de ésta se llevaron a cabo propagaciones de cultivo de manera previa en medio de Balch y acetamida (1 g/L) como fuente de carbono. Cada experimento se realizó con la cepa inicial a pH 7 y a la temperatura de 35°C hasta tener un crecimiento en la etapa exponencial (aproximadamente 30 horas).

Methanosarcina mazei cepa S-6 y *Methanosarcina barkeri* cepa 227 se obtuvieron de la colección ATCC. Previo a cada experimento se propagaron en medio anaerobio de Balch *et al.* (1979) con reductores, con una concentración de 5 g/L de acetato y 1 g/L de extracto de levadura y peptona respectivamente. El crecimiento se siguió de acuerdo a la producción de metano.

2.3. Medio de cultivo

El medio de alimentación durante este trabajo fue hecho bajo condiciones estériles utilizando como medio de cultivo el propuesto por Balch *et al.* (1979) (véase Tabla 2.1.), pero sin los agentes reductores. El sustrato fue acetamida. Se mezclaron todos los componentes en un matraz aforado de un litro, por último se midió el pH sin ajustarlo a 7.0, solo se verificó si se encontraba cercano a la neutralidad y se esterilizaba a 121°C durante 15 minutos.

Tabla 2.1. Preparación del medio de cultivo.

Solución	Volumen usado por litro de medio	Concentración de sales en la solución (g/L)
Solución mineral 1	50 mL	K ₂ HPO ₄ 6.00
Solución mineral 2	50 mL	KHPO ₄ 6.00; NH ₄ Cl 2.40; NaCl 12.00; MgCl ₂ ·6H ₂ O 2.10; CaCl ₂ ·H ₂ O 0.16.
Solución de oligoelementos	10 mL	Acido nitrilotriacético 1.50; MgSO ₄ ·7H ₂ O 3.00; MnSO ₄ ·2H ₂ O 0.50; CaCl ₂ ·2H ₂ O 0.10; CoCl ₂ 0.10; ZnSO ₄ 0.10; CuSO ₄ ·5H ₂ O 0.01; AlK(SO ₄) ₂ 0.01; H ₃ BO ₃ 0.01; Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0.01.
Solución de vitaminas	1 mL	Biotina 0.0020; ácido fólico 0.0020; piridoxina 0.0100; tiamina 0.0050; riboflavina 0.0050; D-L-ácido pantoténico 0.0050; vitamina B ₁₂ 0.0001; ácido p-aminobenzóico 0.0050; ácido lipóico 0.0050.
Solución de cloruro de níquel	1 mL	NiCl ₂ 0.50.
Solución de sulfato de hierro	1 mL	FeSO ₄ ·7H ₂ O 2.00.

2.4. Métodos analíticos

2.4.1. Medición de acetamida.

La medición de este compuesto se hizo a través de cromatografía de gases con un equipo Varian Star 3400 CX, con detector de ionización de flama (FID). Las condiciones de operación del equipo fueron: temperaturas controladas de la columna 120°C; del inyector 200°C y del detector 220°C. Se utilizó helio como gas acarreador a través de una columna capilar AT-1000 de 25 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno. El procedimiento que se siguió fue recolectar 1 mL de muestra respectiva para cada tiempo, se acidificaba con la adición de 50 μ L de ácido fórmico concentrado, seguida por una centrifugación a 12800xg durante 15 minutos y se inyectaban 2 μ L al equipo (o se juntaban lotes semanales guardándolos bajo refrigeración a 4°C). La cuantificación se hizo a través de una curva patrón de acetamida a diferentes concentraciones en el intervalo de 1 a 20 mM.

$$[Am] = 42178x + 12663 \quad \text{con } r^2 = 0.9946$$

donde $[Am]$ = concentración de acetamida (mmolAm/L) y

x = la respuesta leída del equipo (área bajo la curva).

2.4.2. Medición de acetato.

Este compuesto fue medido en un cromatógrafo de gases HP 5890 a través de un detector tipo FID. Las condiciones de operación del equipo fueron la temperatura controlada de columna a 130°C, temperatura del inyector 200°C y del detector 220°C. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a través de una columna capilar AT-1000 (ALTECH) de 10 m de longitud y 0.53 mm de diámetro interno. El procedimiento fue el siguiente; se recolecta 1 mL de muestra que se acidifica con 50 μ L de ácido clorhídrico al 50% v/v e inmediatamente se centrifuga a 12800xg durante 15 minutos y se inyectan 0.2 μ L en el equipo (o se juntaban lotes semanales guardándolos bajo refrigeración a 4°C). La cuantificación se hizo a través de una curva patrón de acetato a diferentes concentraciones en el intervalo de 1 a 20 mM.

$$[Ac] = 3.3 \cdot 10^{-4} x - 0.9319 \quad \text{con } r^2 = 0.9845$$

donde $[Ac]$ = concentración de acetato (mmolAc/L) y

x = la respuesta leída del equipo (área bajo la curva).

2.4.3. Medición de amonio.

La medida de amonio se realizó con el uso de un electrodo selectivo, que emplea una membrana hidrofóbica de gas permeable, intercambiadora de iones, que separa la muestra problema de la solución interna de cloruro de amonio del electrodo (Suárez, 1998). Este método es aplicable a concentraciones de 0.03 a 1400 mg de N-NH₄⁺/L (APHA 1989).

El procedimiento es el siguiente: a 10 mL de muestra se adiciona 0.5 mL de NaOH 10 N y se afora a 50 mL con agua desionizada. La mezcla se coloca en un vaso de precipitados de 50 mL junto con un agitador magnético, se introduce el electrodo a una inclinación de 45° (Suárez, 1998) y se mide el tiempo durante 3 minutos, obteniéndose una respuesta estable del potencial de reducción. La cuantificación se realiza a través de una curva patrón de cloruro de amonio (NH₄Cl) a diferentes concentraciones en el intervalo de 50 a 500 mg/L.

$$[NH_4^+] = 1.99 \cdot 10^{-2} x + 0.6975 \quad \text{con } r^2 = 0.9845$$

donde $[NH_4^+]$ = concentración de amonio (mg/L) y

x = la respuesta leída del equipo (mV).

2.4.4. Medición de metano.

El metano se midió mediante un cromatógrafo de gases GOW-MAC serie 550 con detector de conductividad térmica (TCD). Las condiciones del equipo fueron: temperaturas controlada de columna 140°C, del inyector 170°C y del detector 190°C. Se utilizó una columna empacada de Carbosphere 80/100 de 3 m de largo y de diámetro interno de 1/8 de pulgada utilizando helio como gas acarreador. El procedimiento fue recolectar 1 mL de muestra bajo condiciones estériles de la fase gaseosa e inyectar 0.1 mL (las muestras de los bioensayos se llevaban tal cual al equipo y las muestras del reactor una vez tomadas, se

protegían mediante un septo). La cuantificación se hizo a través de una curva patrón de acuerdo al ensayo: 1.5 a 20 mmolCH₄/L y de 0 a 100% de metano.

$$[CH_4] = 4655x - 126 \quad \text{con } r^2 = 0.9985$$

donde [CH₄]=concentración de metano (mmolCH₄) y
x = la respuesta leída del equipo (área bajo la curva).

2.4.5. Medición de biomasa.

En estudios realizados por Ramírez (1997) se encontró una relación de la absorbancia de *Bacillus sphaericus* en crecimiento exponencial en función de la cantidad de biomasa como peso seco. Se usó un espectrofotómetro Bausch & Lomb a una longitud de onda de 600 nm. El procedimiento seguido fue: tomar 5 mL de muestra en un tubo de ensaye y medir directamente la absorbancia usando como blanco una alícuota de 5 mL de medio de Balch (1979) sin reductores y estériles en un tubo Hungate sellado.

2.4.6. Peso seco

La cuantificación de peso seco se hizo a través de la ecuación obtenida a partir de una curva patrón de absorbancia producida por *B. sphaericus* en fase exponencial en función al peso seco medido.

$$\chi = 4655x - 126 \quad \text{con } r^2 = 0.9845$$

donde χ = concentración en peso seco (mgcel) y
x = la respuesta leída del equipo (absorbancia).

2.4.7. Medición de oxígeno disuelto

La medición del oxígeno disuelto se realizó mediante el uso de un electrodo de referencia, calibrándolo con una solución de sulfito de sodio al 2 % p/v (0 mg/L) y el segundo punto es una exposición al aire (100 mg/L). El procedimiento fue tomar una alícuota suficiente para

cubrir la zona de detección de la sonda y que la lectura se estabilizara por al menos durante 15 segundos.

2.4.8. Medición del valor de pH.

La medición de este parámetro se realizó mediante el uso de un electrodo de referencia, calibrándolo con soluciones de amortiguador de fosfatos para trabajar en el intervalo de $\text{pH}=7$. El procedimiento fue tomar una alícuota suficiente para cubrir la zona de detección de la sonda y que la lectura se estabilizara por al menos durante 15 segundos.

2.5. Reactivos

Las sustancias utilizadas durante todo el experimento para preparación de medio fueron grado reactivo analítico. Respecto a los equipos de cromatografía, las curvas patrón de referencia se hicieron con reactivos calidad cromatográfica, al igual que los gases requeridos en cada uno de los equipos usados. Se utilizó agua destilada para la preparación del medio de alimentación.

Capítulo 3

Determinación de las constantes cinéticas de *M. mazei*

3.1. Resumen

En la literatura se encuentran valores de las constantes cinéticas de algunas bacterias metanogénicas, pero no las de *Methanosarcina mazei* en particular. En este capítulo se describen los experimentos que se hicieron, en donde se varió la concentración de acetato para encontrar las constantes cinéticas de crecimiento y de consumo de sustrato de *M. mazei*. Se encontró que la velocidad máxima de formación de metano (v_{\max}) es de 0.046 mmolCH₄/Lh y la constante de afinidad (K_s) es de 124 mgAc/.

3.2. Objetivo particular

- Calcular las constantes cinéticas de *M. mazei* mediante experimentos para medir la cinética de consumo de sustrato.

3.3. Diseño experimental

En frascos serológicos de 60 mL que contenían 20 mL de medio de Balch *et al.* (1979), en los cuales se añadió acetato en distintas concentraciones (2.4; 4.7; 12; 16 y 24 mM) usando como inóculo 2 mL de un cultivo de *M. mazei* en fase de crecimiento exponencial.

Los parámetros que se midieron para evaluar el desarrollo de este experimento fueron las concentraciones de metano a través del tiempo y de acetato al inicio y al final del experimento. Los bioensayos se hicieron por duplicado.

3.4. Resultados y discusión

En la Figura 3.1 se presenta la producción de metano en función del tiempo para cada una de las concentraciones de acetato usadas de acuerdo al diseño experimental. En esta se observa como aumenta la producción de metano respecto al incremento de sustrato adicionado.

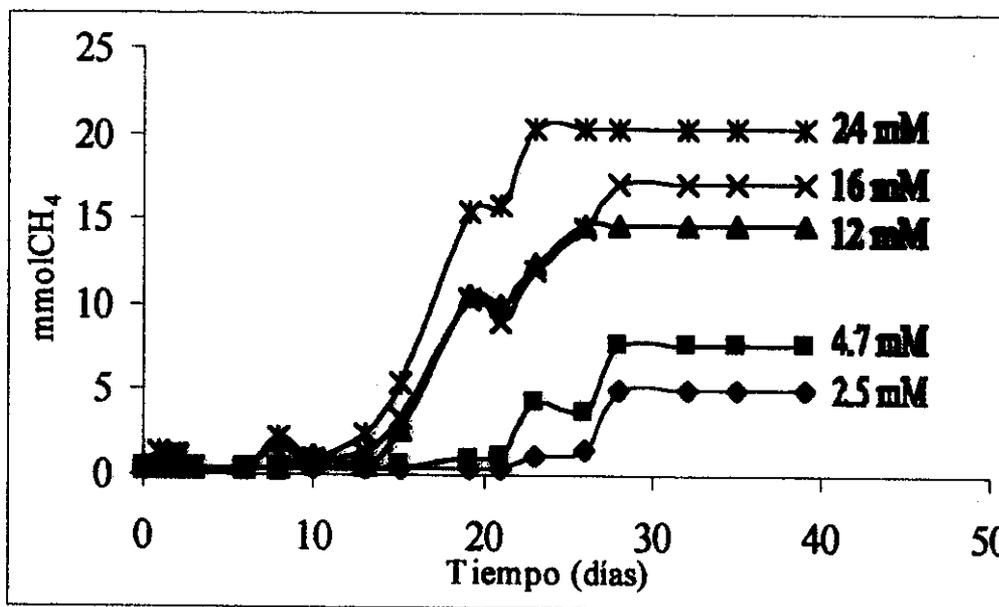


Figura 3.1. Producción de metano por *Methanosarcina mazei* a través del tiempo usando diferentes concentraciones de acetato.

La producción de metano comienza después de una fase lag muy grande debido probablemente a la baja concentración de extracto de levadura y peptona en el medio; se puede ver también que a bajas concentraciones de acetato la fase lag se duplica. La Figura 3.1 sugiere trabajar solo con la parte de crecimiento exponencial para determinar los valores de las constantes cinéticas deseadas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.1 en donde la fase exponencial o de crecimiento está representada por la pendiente obtenida por un ajuste de línea recta. Además se muestran los tiempos de inicio de la fase exponencial de la producción de metano para cada una de las diferentes concentraciones de acetato. Se observa que entre mayor sea la concentración de sustrato en el medio menor es la fase lag de formación de metano. La tercer columna muestra el balance de materia. La cantidad máxima de metano esperada (teórica) se calculó basándose en la concentración inicial de acetato. La cantidad de metano experimental se calculó a partir de la máxima producción de metano.

Tabla 3.1. Tiempo de retardo y velocidades de formación de metano por *Methanosarcina mazei*.

Ac ₀ (mM)	Ac ₀ (mg/L)	% η CH ₄	t _{retardo} (días)	k (mmolCH ₄ /L.d)	r ²
2.4	144	100	21	0.5866	0.8667
4.7	282	100	21	0.8052	0.9531
12	720	100	13	0.8666	0.9526
16	960	91	13	1.0171	0.9885
24	1440	74	13	1.0292	0.9278

A partir de las velocidades de formación de metano en función de la concentración de acetato se construye la ecuación de Monod, (Figura 3.2.).

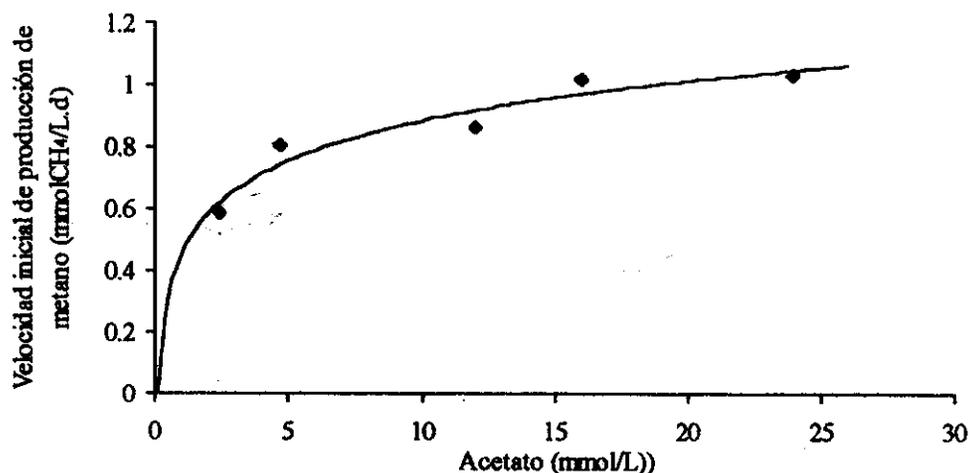


Figura 3.2. Efecto de la concentración de Ac en la velocidad de formación de CH₄ por *M. mazei*.

La tendencia muestra que a mayor concentración del sustrato mayor es la velocidad de metanogénesis. La gráfica de Linerwaver-Burk, es decir, el inverso de la velocidad de producción de metano en función del inverso de la concentración de sustrato, (figura 3.3.) nos proporciona la velocidad máxima de producción de metano y la constante de saturación.

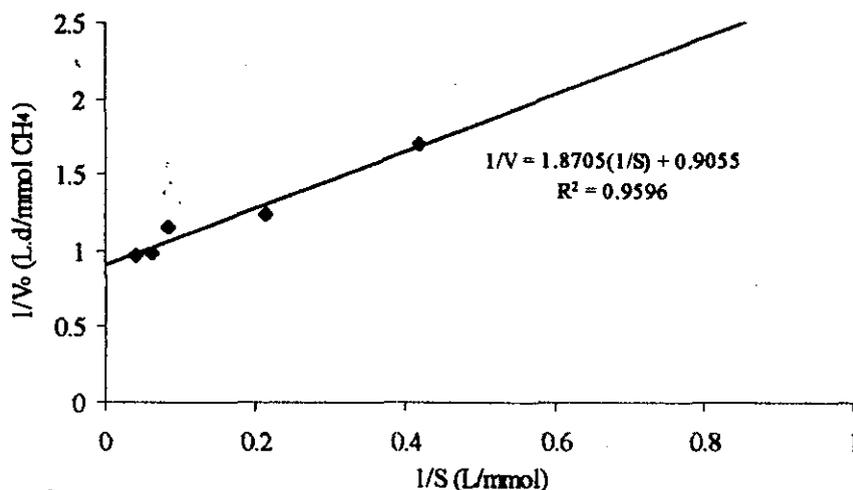


Figura 3.3. Ecuación de Linerwaver-Burk para evaluar la formación de metano por *M. mazei*.

$$v_{\max} = \frac{1}{b} = \frac{1 \text{ mmolCH}_4}{0.9055 \text{ Ld}} = 1.104 \frac{\text{mmolCH}_4}{\text{Ld}} = 0.046 \frac{\text{mmolCH}_4}{\text{Lh}}$$

$$K_s = m \cdot v_{\max} = 1.8705 \frac{\text{dmmolAc}}{\text{mmolCH}_4} * 1.104 \frac{\text{mmolCH}_4}{\text{Ld}} = 2.05 \frac{\text{mmolAc}}{\text{L}}$$

$$2.05 \frac{\text{mmolAc}}{\text{L}} * 60 \frac{\text{mgAc}}{\text{mmolAc}} = 124 \frac{\text{mgAc}}{\text{L}}$$

en donde: m es la pendiente y
 b es la ordenada al origen.

Los valores de las constantes cinéticas obtenidas se comparan en la Tabla 3.2. con algunos datos obtenidos de la literatura. No fue posible medir el rendimiento celular (Y) para *M.*

mazei debido a dificultades en la manipulación del equipo, por la pequeña cantidad de células suspendidas en cada unidad experimental.

TABLA 3.2. Constantes cinéticas para algunas cepas de *Methanosarcina*.

Parámetro	<i>Methanosarcina mazei</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i> ¹ (227)	<i>Methanosarcina spp</i> ²
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0.046 mmol/Lh ^a	0.023	0.0125
K _s (mgAc/L)	124	300	180
Y (gcel/gAc)	n.d.	0.0267-0.0533 ^b	0.035

1, Zehnder, 1988; 2, Jetten *et al.* 1992; a, es velocidad máxima de formación de metano; b, es *M. barkeri spp*; n.d, no determinado.

Con respecto al valor de K_s este se encuentra por debajo de los reportados por Zehnder (1988) y Jetten *et al.* (1992) para otras especies; lo cual indica que *M. mazei* presenta una mayor afinidad por el sustrato, respecto a las comparadas.

3.5. Conclusiones

En los valores cinéticos de *M. mazei* calculados experimentalmente se observa que la velocidad máxima de formación de metano es favorable para la metanobacteria, en condiciones reducidas; aunque, la constante de rendimiento celular es muy pequeña respecto a las otras *Methanosarcina spp*.

Capítulo 4

Degradación de acetamida por bicultivos de bacterias metanogénicas y *B. sphaericus* en lote

4.1. Resumen

Los experimentos que se muestran en este capítulo fueron el soporte principal de la hipótesis propuesta, debido a que en la literatura se encuentra información acerca de la coexistencia de poblaciones de bacterias aerobias estrictas y anaerobias estrictas. Sin embargo, no hay información de dos cepas puras cultivadas conjuntamente (bicultivos), en los que se hubieran encontrado las condiciones adecuadas para coexistir. En este capítulo se hizo una serie de experimentos, en los cuales se variaron la concentración del inóculo anaerobio (*Methanosarcina barkeri* y *Methanosarcina mazei*) en un medio con concentraciones limitadas de oxígeno disuelto manteniendo constante a *Bacillus sphaericus*. Los resultados muestran que la mejor eficiencia de degradación (del 95%), con una producción esperada de metano del 30% fue con la combinación de *B. sphaericus* y *M. mazei*.

4.2. Objetivos particulares

- Hacer pruebas de bicultivos en lote para observar el comportamiento y establecer las condiciones adecuadas de coexistencia.
- Estudiar en cultivos por lote la degradación de acetamida hasta metano por *Bacillus sphaericus* con *Methanosarcina mazei* o con *Methanosarcina barkeri* y comparar los resultados.

4.3. Diseño experimental

El experimento consistió en comparar el comportamiento de los cultivos *M. barkeri* y *B. sphaericus* con *M. mazei* y *B. sphaericus*.

Se realizaron en frascos serológicos de 60 mL (figura 4.1), en los cuales se varió el volumen de inóculo de *Methanosarcina* (5, 10, 15 y 20 mL) manteniendo constante el volumen de inóculo de *Bacillus* (2 mL) (tabla 4.1), con una concentración de acetamida de 20mM.

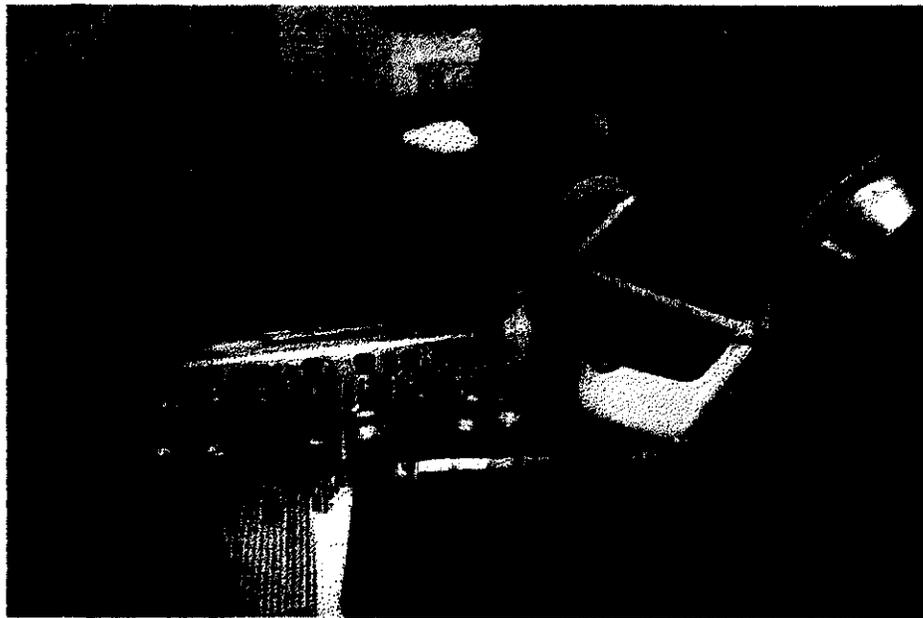


Figura 4.1. Vista de los bioensayos en los que fueron inoculados los bicultivos para medir la producción de metano.

Tabla 4.1. Proporciones de medio e inóculo usados en los bioensayos.

Proporción inóculo aerobio	12%	17%	28%	100%
Volumen de inóculo aerobio (mL)	2	2	2	2
Volumen de inóculo anaerobio (mL)	15	10	5	0
Volumen de medio aerobio	3	8	13	18

Los experimentos se trabajaron bajo condiciones limitadas de oxígeno y cada bioensayo se realizó por duplicado. Los parámetros que se midieron para evaluar esta serie de experimentos fueron acetamida, acetato, metano y amonio a través del tiempo. Además, la concentración del oxígeno disuelto y pH se midieron al inicio y final del experimento.

4.4. Resultados y discusión

Los resultados cualitativos de la cinética con los bicultivos fueron los siguientes. Al inicio, cuando se realizaron las inoculaciones, el bioensayo no presentó color ni turbidez en el medio. Sin embargo, a partir del segundo día aparece una turbidez blanca muy semejante entre los bioensayos, debida al crecimiento de *B. sphaericus*, misma que después de 15 días desaparece y se advierte la formación de diminutos flóculos (<1mm de diámetro) de color negro.

La proporción 100% (6.11 mgOD/L) corresponde solamente a *B. sphaericus* en medio Balch sin reductores y se tomará como blanco. En la Figura 4.2 se observa como disminuye en 2 días la concentración de acetamida, se incrementa la concentración de amonio a una similar de la acetamida hidrolizada indicando que éste no es utilizado como fuente de nitrógeno por *B. sphaericus*. Además, el no detectar la presencia de metano indica que no puede producirlo a partir de acetamida, pero sí hidrolizarla y consumir el acetato formado.

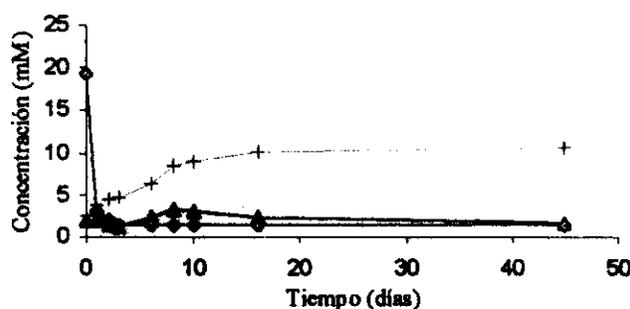


Figura 4.2. Cultivo de *B. sphaericus* con 20 mM de Am (◆); productos formados Ac (▲) y NH₄⁺ (+).

A partir de las siguientes relaciones del bicultivo hablamos ya de cultivos mixtos, es decir, se mezclaron las diferentes proporciones variando las dos especies diferentes de *Methanosarcina*.

En la proporción 12% ó 0.92 mgOD/L (ver Figuras 4.3 y 4.4), se ve que la hidrólisis de la acetamida es a los seis y ocho días, pero con mayor eficiencia en *Methanosarcina mazei* (90%) que en *Methanosarcina barkeri* (72%). También la concentración de metano fue mayor para *M. mazei* siendo de casi 25% mientras que para *M. barkeri* es de 15% del esperado. La aparición de amonio se presenta en ambas series alcanzando una concentración final de 16 y 17 mM respectivamente.

El acetato residual se observa con mayor abundancia en *M. barkeri* (13 mM) que para *M. mazei* (4 mM) debido probablemente a que *M. barkeri* es más sensible a la presencia de oxígeno en el medio y por lo tanto no lo consume (Boone y Mah, 1989).

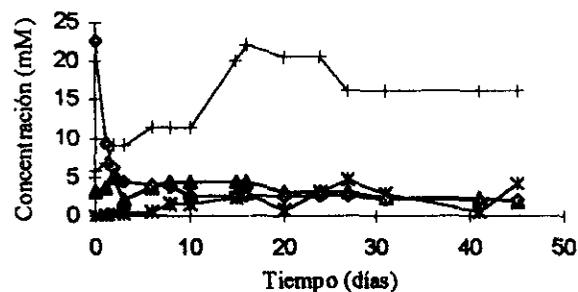


Figura 4.3. Bicultivo de *M. mazei* con *B. sphaericus* en la proporción 12% de oxígeno disuelto. Los símbolos indican: Am (◆), Ac (▲), CH₄ (●) y NH₄⁺ (+).

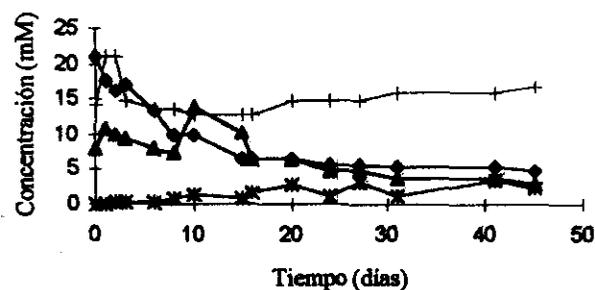


Figura 4.4. Bicultivo de *M. barkeri* con *B. sphaericus* en la proporción 12% de oxígeno disuelto. Los símbolos indican: Am (◆), Ac (▲), CH₄ (●) y NH₄⁺ (+).

En la proporción del 17% ó 1.22 mgOD/L (Figuras 4.5. y 4.6.), la degradación de acetamida para *M. mazei* es a los 3 días con una eficiencia del 81%; Para *M. barkeri* es de 10 días con una eficiencia del 92%. La producción de metano no fue buena, siendo menor al 10% del esperado en ambas *Methanosarcina*. Respecto al acetato se observa en las gráficas que permanece casi constante y alrededor de 5 mM, en ambos bicultivos.

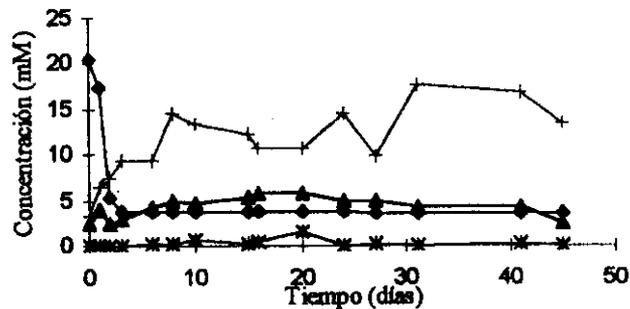


Figura 4.5. Bicultivo de *M. mazei* con *B. sphaericus* en la proporción 17% de oxígeno disuelto. Los símbolos indican: Am (◆), Ac (▲), CH₄ (♣) y NH₄⁺ (⊕).

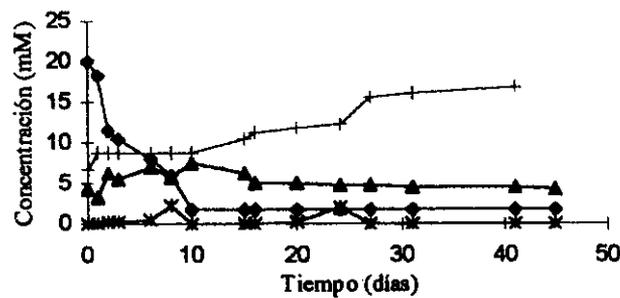


Figura 4.6. Bicultivo de *M. barkeri* con *B. sphaericus* en la proporción 17% de oxígeno disuelto. Los símbolos indican: Am (◆), Ac (▲), CH₄ (♣) y NH₄⁺ (⊕).

En la proporción 28% ó 4.22 mgOD/L (Figuras 4.7. y 4.8.) la hidrólisis de acetamida es lenta (después de los 8 días); Aunque con una eficiencia del 95% para *M. mazei* y del 75% para *M. barkeri*. En estos experimentos se ve al inicio la acumulación de acetato, el cual es consumido a los 8 días y empieza la aparición de metano, siendo la mayor producción para *M. mazei* (30%) que para *M. barkeri* (20%).

Tabla 4.2. Degradación de acetamida por bicultivo de *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina sp* a temperatura de 35°C; pH de 7.0 y Am_i= 20mM.

Microorganismo	<i>M. mazei</i>			<i>M. barkeri</i>			<i>B. sphaericus</i>
	12	17	28	12	17	28	
Proporción %							100
Tr (d)	6	3	8	8	10	10	2
η Am %	91	81	95	72	92	75	93
Am _{res} (mM)	3.83	3.81	3.71	4.92	1.67	4.92	1.39
Ac _{res} (mM)	3.71	2.97	4.12	13.39	7.49	1.91	1.51
Fase lag de CH ₄ (d)	27	20	6	41	24	6	
CH ₄ (% del total esperado)	23	8	30	16	10	20	0.00
NH ₄ ⁺ fin (mM)	16	17	18	17	17	19	10
[OD] _{i-f} (mg/L)	0.92-0	1.22-0	4.22-0	0.92-0	1.22-0	4.22-0	6.11-0
pH _{i-f}	7.4-8.2	7.4-7.9	7.1-7.9	7.4-8.0	7.4-7.8	7.1-7.8	7.0-7.1

Abreviaturas: Tr = tiempo para la máxima degradación; η = eficiencia; Am = acetamida; Ac = acetato; res = residual en el tiempo de máxima degradación; CH₄ = metano; NH₄⁺ = amonio; [OD] = concentración de oxígeno disuelto en la solución; i = al inicio y f = al final del proceso.

De acuerdo a la tabla 4.2. se observa que el máximo de eficiencia de hidrólisis de la acetamida por parte de *B. sphaericus* (93%) es a los 2 días de haber iniciado el experimento. Sin embargo se encontró un promedio del 90% conforme se varía la proporción de inóculo aerobio, con excepción de las proporciones 28% utilizando a *M. barkeri* como inóculo anaerobio en donde el valor es del 75% y del 72% para la proporción 12%. En los bioensayos donde se utilizó a *M. mazei* como inóculo se observa que la hidrólisis de acetamida es mayor en el medio que tiene más oxígeno. Con *M. barkeri* no se observa que el valor más alto de hidrólisis sea donde hay más oxígeno.

Respecto a los valores de metano registrados en la tabla 4.2, cabe señalar en primer lugar que cuando las proporciones de inóculo aerobio es de 17% estos máximos son menores al 10% de la acetamida convertida a metano aunque la tendencia observada siempre fue menor a 5% de la acetamida metanizada. Además, cabe señalar que estos son los valores más pequeños respecto a las otras proporciones en los bioensayos, por lo que se considera que aún no hay una fase exponencial sino que aún es una fase lag. Se observa también, que a mayor concentración de oxígeno es menor la fase lag y es mayor la producción de metano. Con respecto a este parámetro se esperaba una tendencia de aumento conforme se incrementara la proporción de inóculo anaerobio, sin embargo este no se presentó y se registraron valores de hasta 30% en la proporción de 28% de la combinación de *B. sphaericus* y *M. mazei* donde predomina el medio aerobio debido a una mejor hidrólisis de acetamida. Por otro lado, no se observa una tendencia en los tiempos donde se presentan

estos máximos, pero se observa que todos son después de los 20 días de haber iniciado el experimento, es decir cuando el oxígeno está totalmente consumido.

De acuerdo a las mediciones iniciales de oxígeno disuelto, se observa una disminución del valor conforme aumenta el volumen de inóculo anaerobio. El valor final de este parámetro al final del experimento fue de cero mg/L, por lo que se procedió hacer otro experimento para medir el oxígeno disuelto a través del tiempo y saber en qué momento se consume.

Este ensayo se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones. En un matraz se puso un volumen de 200 mL de medio aerobio el cual se inoculó con el 20 % v/v de *Bacillus sphaericus* se selló y se registró el oxígeno disuelto que al inicio fue de 6 mg/L, a las dos horas fue de 4 mg/L, pero a las 12 y 24 horas el electrodo siempre registró un valor de cero. Se recuerda que el tiempo de duplicación de esta bacteria es de 6 horas, es decir, es el tiempo en el que utiliza el oxígeno para su proliferación por lo que se acepta este valor como cierto.

Acerca de los valores de pH se observa que al inicio es de 7.2 ± 0.2 y al final para el blanco no hay mucha variación permaneciendo en el valor de 7. Sin embargo, la tendencia que se observa, es que hay un incremento menor a una unidad de pH conforme se disminuye el volumen de medio aerobio.

De acuerdo a la evidencia mostrada y comparando las constantes cinéticas de *M. mazei* obtenidas en el capítulo 3 y los de *B. sphaericus* (tabla 4.3.) se decidió trabajar con una proporción 1:10 del bicultivo *B. sphaericus* y *M. mazei* respectivamente.

TABLA 4.3. Constantes cinéticas para *B. sphaericus* y de *M. mazei*.

Parámetro	<i>Bacillus sphaericus</i> ¹	<i>Methanosarcina mazei</i>
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0.0042	0.046 ^a (mmolCH ₄ /Lh)
K _s (mg/L)	37	124
Y (gcel/gAc)	0.018	

1, Ramírez *et al.* 1998; a, es velocidad máxima de formación de metano.

4.5. Conclusiones

Los resultados de los bicultivos en lote muestran que el consorcio formado con *M. mazei* presentó mayor conversión de acetamida a metano, menor tiempo de retardo y menor concentración de acetamida residual que el formado con *M. barkeri*; tanto en la acumulación de metano como en la hidrólisis de acetamida, indicando que la cepa de *M. mazei* puede adaptarse mejor a estas condiciones de cultivo. Sin embargo, la cantidad de acetato residual al final del experimento es similar en todos los cultivos al del cultivo puro de *Bacillus sphaericus*, por lo que la producción de metano presente en los bioensayos pudiera originarse de una hidrólisis celular del bacilo debido al cambio en la turbidez del medio después de 15 días de haber iniciado el experimento. Esto es, al estar reducido el medio sin oxígeno, esta bacteria aerobia decrece. Para poder estar seguros de lo anterior se sugiere hacer un conteo de células viables de *Bacillus sphaericus* al inicio y al final de futuros experimentos.

Capítulo 5

Degradación de acetamida por un bicultivo de *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina mazei*

5.1. Introducción

Los estudios de reactores en lote son útiles debido a que el experimentador logra apreciar algunos puntos importantes acerca de los cultivos en estudio antes de inicializar un reactor en continuo. Por ejemplo, un factor importante es el no cambiar las condiciones de operación encontradas en los estudios anteriores para poderlos aplicar en los estudios, en continuo. En este capítulo se indicará el diseño experimental y los resultados obtenidos trabajando en un reactor por lote alimentado así como los resultados de un reactor en continuo para degradar acetamida hasta metano. Durante el experimento se debieron cuidar varios aspectos tales como el efecto de la adición sucesiva de *Methanosarcina* al lecho de lodos que se estaba

formando. Este proceso se hizo en etapas debido a que es muy difícil proliferar estas bacterias en volúmenes mayores a un litro bajo condiciones anaerobias.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar la concentración de metano en un reactor de lote alimentado y de un reactor en continuo.
- Observar el proceso de hidrólisis de la acetamida a diferentes tasas de dilución en ambos reactores.
- Evaluar por medio del microscopio electrónico de barrido el lecho formado por *Methanosarcina mazei* y *Bacillus sphaericus* en el reactor continuo.

5.3. Diseño experimental

5.3.1. Reactor de lote alimentado

El reactor de lote alimentado consistió en una botella serológica de un litro de capacidad que contenía 750 mL de medio (ver Figura 5.1.), los cuales se encontraban en condiciones estériles. La botella en su tapa de rosca se encontraba horadada e insertado un tapón de hule y el cual a su vez contenía en la parte superior un tubo Hungate que también tenía su tapa de rosca horadada y su septo por el cual se tomaron las muestras bajo condiciones anaerobias y estériles. El inóculo consistió en 100 mL de *Bacillus sphaericus* (27 mg de biomasa) y 200 mL de *Methanosarcina mazei* (90 mg de biomasa), los cuales se encontraban en crecimiento en fase exponencial y 450 mL de medio de Balch sin reductores (aerobio), además se desplazó el oxígeno del aire en la fase vacía con N_2/CO_2 .



Figura 5.1. Reactor de lote alimentado.

Se hizo un monitoreo a través del tiempo y en el momento de que la acetamida casi había sido hidrolizada por completo, el reactor fue realimentado con cuatro diferentes concentraciones y volúmenes de medio aerobio (ver Tabla 5.1), desplazando el oxígeno por la mezcla de gases N_2/CO_2 . Los recambios se hacían en la cámara anaerobia quitando la tapa del frasco

Tabla 5.1. Diferentes concentraciones de acetamida en la alimentación del reactor de lote alimentado.

Etapa	I	II	III	IV
Oxígeno Disuelto	c/O ₂	s/O ₂	c/O ₂	c/O ₂
Acetamida (g/L)	2.0	1.5	1.0	2.0
Volumen de medio aerobio (mL)	500	100	500	500

Los parámetros que se determinaron fueron concentraciones de metano, acetamida y acetato por las técnicas ya establecidas en la metodología.

5.3.2. Reactor continuo

El trabajo experimental consistió en montar y arrancar un reactor continuo a escala laboratorio con una capacidad de 180 mL (ver Figura 5.2).

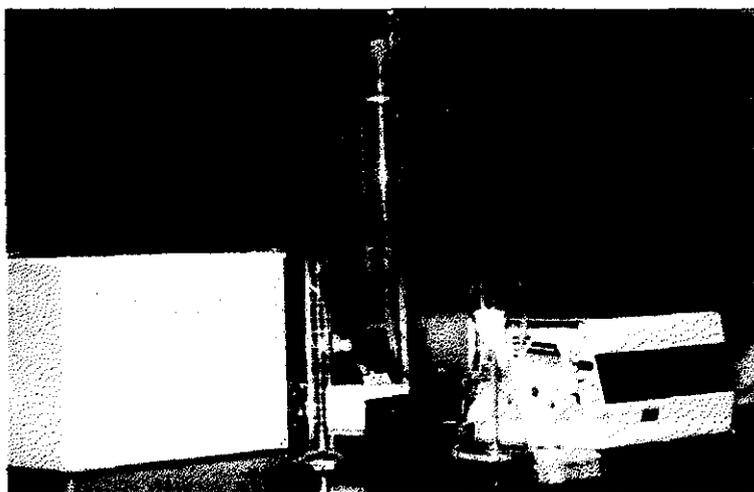


Figura 5.2. Reactor continuo inoculado con *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina mazei*.

Este reactor en condiciones estériles se inoculó con 25 mL de *Bacillus sphaericus* (17.5 mg de biomasa), 75 mL de *Methanosarcina mazei* (60 mg de biomasa), dentro de la cámara anaerobia para evitar el contacto del aire con el cultivo; El resto del reactor se llenó con medio de Balch sin resazurina y sulfuro de sodio. Para llevar la biomasa a una alta

concentración, el reactor permaneció en lote durante 72 h y posteriormente fue alimentado en continuo a diferentes concentraciones de acetamida como sustrato principal variando el tiempo de residencia hidráulico, hasta tenerlo en fase de estado estacionario, como se observa en la Tabla 5.2. La etapa final de alimentación se hizo con acetato para estudiar el comportamiento del bicultivo con este compuesto. El estado estacionario se consideró cuando se tenían al menos valores constantes en la acetamida de salida, después de haber transcurrido cinco veces el tiempo de residencia hidráulica.

Tabla 5.2. Diseño experimental para el crecimiento de *B. sphaericus* y *M. mazei* en un cultivo continuo.

ETAPA	A ¹	B ¹	C ²	D ²	E ²	F ²	G ¹	H ²	I ²	J ²
Am ₀ (mg/L)	1000	1500	2000	2000	2000	2000	3000	3000	3000	3000
TRH (d)	1	1.5	2.0	2.0	1.5	1.5	1.5	2.0	2.0	2.0

* Ac; 1, cambio por carga volumétrica; 2, reinoculación de *M. mazei*.

Las etapas marcadas son diferenciadas por cambio en el TRH o de concentración en la carga de alimentación, así como de una adición de la bacteria anaerobia (60 mg) para tener una mayor concentración de biomasa y es precisamente la última etapa en donde se hace un cambio de la fuente de carbono, es decir se utilizó acetato por acetamida.

Los parámetros que fueron monitoreados en el transcurso del experimento son: la concentración de metano, la hidrólisis de acetamida, la producción de acetato, la medición de amonio, del pH y de la biomasa en el efluente, los sólidos totales, fijos y volátiles al final del experimento; así como también una observación en el microscopio electrónico de barrido (MEB) de una pequeña muestra de los flóculos formados dentro del reactor. La producción de metano se mide por desplazamiento de una solución saturada de cloruro de sodio a pH de 2. También se efectuó una cuantificación de la biomasa, tanto aerobia como anaerobia, a través de diversos puntos del reactor como son en la entrada, en el lecho de lodos y en la salida de la columna al final de la alimentación con acetamida.

La metodología seguida para el tratamiento de la muestra para microscopía fue la propuesta por Sepúlveda *et al.* (1998):

1 mL de lodos se centrifuga a 750xg durante 3 minutos. Después se decanta el sobrenadante y se adiciona una solución de glutaraldehído al 6% en amortiguador de fosfatos (0.02 M y pH de 7.2) durante al menos 12 horas.

Transcurrido el tiempo se retira la solución de glutaraldehído y se hacen de 5 a 7 lavados por intervalos de 10 a 15 min cada uno usando el amortiguador de fosfatos.

Enseguida se procede a fijar con osmio al 2% en amortiguador de fosfatos durante 2 ó 3 horas (tener MUCHA PRECAUCION con la manipulación de este reactivo USAR GUANTES Y TRABAJAR BAJO LA CAMPANA DE EXTRACCIÓN). Inmediatamente transcurrido el tiempo se retira la solución y se hacen entre 3 a 5 lavados con amortiguador de fosfatos.

Una vez que la muestra ya tiene un color negro se procede a realizar una deshidratación y desecación en frío, esto es, mediante una serie de soluciones porcentuales de etanol desde el 30 al 100 % v/v con 3 lavados de 10 a 15 minutos cada una y siempre en frío. Terminado este proceso se hace la deshidratación con el equipo desecador a punto crítico, en donde el CO₂ líquido desplazará el etanol y residuos de agua. La muestra se somete a una temperatura de 36.1°C y a una presión de 1070 lb/pl² para que pase a fase gaseosa el bióxido de carbono. A partir de este momento la muestra es altamente higroscópica por lo que las condiciones de trabajo serán en un desecador.

Se monta la muestra en un soporte de aluminio específico compatible para la evaporadora de carbón y oro y el MEB y se realiza el recubrimiento con una capa de C y Au.

Finalmente terminado el proceso anterior, las muestras están listas para ser observadas en el MEB Zeiss Modelo DSM 940 A.

5.4. Resultados

5.4.1. Reactor de lote alimentado

En el caso del reactor de lote alimentado las observaciones cualitativas durante el experimento son semejantes a las presentadas en las cinéticas de bioensayos. Es decir en la inoculación no hubo ningún cambio en el medio, pero a partir del segundo día ya se apreciaba una turbidez del medio. Al final del experimento se advierte la formación de flóculos (<2 mm) oscuros sedimentados en la parte inferior del contenedor.

El reactor de lote alimentado se hizo con la finalidad de generar biomasa para el cultivo en continuo, lo cual no se logró pues al medir poca producción de metano se pensó que el

bicultivo formado no se encontraba en las condiciones idóneas, además de observar el comportamiento durante la experimentación.

Los resultados de los parámetros monitoreados en el experimento del reactor de lote alimentado, se muestran en la Figura 5.3. la cual se construye como concentración en función del tiempo. En ésta figura se observan las etapas de acuerdo a la variación en la concentración de acetamida.

En la etapa uno, se tiene que a partir de una concentración de acetamida de 2 g/L (experimental 38 mM), ésta se agota a los siete días mientras que el acetato formado presenta un periodo de saturación máxima de 19 mM (aprox. el 50 % del sustrato inicial). Cuando el acetato empieza a desaparecer comienza a registrarse la producción de metano hasta llegar a una concentración de casi 30 mmolCH₄/L a los veinte días. Sin embargo, esta concentración de metano es mayor que el acetato formado por lo que es probable que parte de la bacteria aerobia se estuviera hidrolizando por la falta de oxígeno en el medio y esta hidrólisis celular sirviera para que *Methanosarcina mazei* produjera metano. Guyot *et al.* (1994) demostraron la presencia de metano por hidrólisis celular a partir de cultivos con lodos.

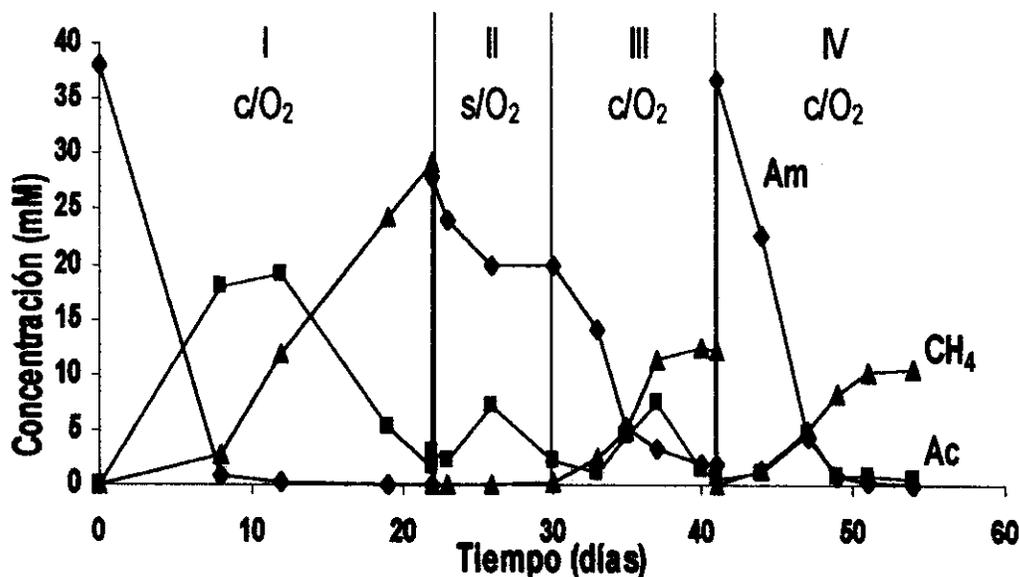


Figura 5.3. Comportamiento del reactor de lote alimentado, el cual muestra la desaparición de acetamida (◆), la formación de acetato (▲) y la aparición de metano (*).

En la segunda etapa, cuando todo el acetato se consume, se realimenta el reactor con 1.5 g/L de acetamida en 100 mL de medio aerobio con la finalidad de no perder las condiciones

anaerobias que ya se tenían, esperando que la desaparición del sustrato fuera en menos tiempo. Sin embargo, la falta de oxígeno en el reactor hace que la hidrólisis sea más lenta y con muy poca formación de acetato. Esto tal vez se debió a la baja concentración de oxígeno adicionado al medio, por lo que se decidió realimentar el reactor con 500 mL de medio aerobio y 1 g/L de acetamida (día 25). En esta fase la hidrólisis del sustrato fue todavía más lenta que la etapa anterior y la acumulación de acetato no se vió favorecida ($< 5\text{mM}$ en promedio), y en lo que concierne al metano formado alcanzó los $12\text{ mmolCH}_4/\text{L}$ cuando se observó que la acetamida casi había desaparecido por completo, indicando que parte de este metano se originó probablemente de una hidrólisis celular.

En la última etapa a los cuarenta y un días de tiempo de iniciado el experimento, se realimentó con 2 g/L de acetamida en 500 mL de medio aerobio con la finalidad de repetir las condiciones iniciales las cuales habían sido satisfactorias. La hidrólisis del sustrato se mejoró notablemente siendo similar que al inicio pero la formación de acetato no se vió favorecida ($< 25\%$) y por lo tanto, también la concentración de metano.

Los resultados muestran que al adicionar la acetamida y oxígeno disuelto en el medio dentro del reactor aumenta la biomasa de *Bacillus sphaericus*, ya que el acetato producido por la hidrólisis es consumido principalmente por el mismo bacilo para producir biomasa, quedando muy poco acetato residual para la metanogénesis.

Se muestra también que la producción de metano presenta una fase lag cada vez más larga debida probablemente a la presencia de oxígeno en el reactor y al poco acetato residual.

5.4.2. Reactor Continuo

5.4.2.1. Hidrólisis de la acetamida

El comportamiento de los parámetros más importantes como son la acetamida, la producción de acetato y de metano se muestran en la Figura 5.4, la cual se construye como carga volumétrica a través del tiempo, $B_v(\text{g/L.d})=f\{t(\text{días})\}$. La concentración del oxígeno disuelto en la entrada del reactor fue constante e igual a 6.4 mg/L y en la salida no se detectó valor alguno.

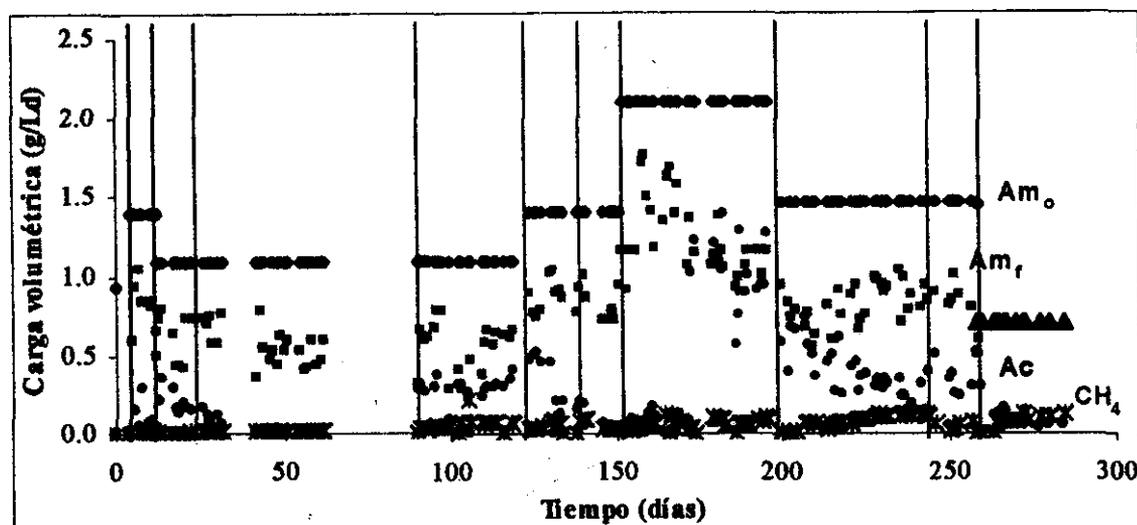


Figura 5.4. Comportamiento de la acetamida a la entrada (\blacklozenge), a la salida (\blacksquare), del acetato a la entrada (\blacktriangle), a la salida (\bullet) y la detección de metano ($*$) a las diferentes cargas volumétricas en el reactor continuo.

El análisis se hará con referencia a la degradación de acetamida como indicador del estado estacionario mencionando como se comportaron los otros parámetros en cada período. La información detallada se presenta sintetizada en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Hidrólisis de acetamida y formación de productos medidos por etapa en el reactor.

ETAPA	Período (días)	TRH (d)	Bv (g/L.d)	[Am] _{inf} (g/L)	[Am] _{eff} (g/L)	Efic.Am	[Ac] _{eff} (g/L)	[CH ₄] (g/L)	OD (mg/L.d)
A	4	1.38	1.08	1.4980	0.9021	39.57	0.1302	0.0079	4.63
B	7	1.85	1.18	2.0074	1.0791	45.35	0.3624	0.0062	3.46
C	9	1.87	1.09	2.0320	1.0832	48.46	0.0792	0.0261	3.42
D	40	1.94	1.01	1.9553	1.0207	47.79	0.4914	0.1189	3.30
E	29	1.41	1.39	1.9553	1.2467	36.24	0.3900	0.0925	4.60
F	17	1.41	1.39	1.9553	1.0301	47.29	0.0552	0.0395	4.60
G	5	1.46	2.05	2.9960	1.6496	46.65	0.9117	0.0885	3.12
H	44	2.09	1.43	2.9960	1.6597	44.61	0.7925	0.1688	4.50
I	11	2.01	1.49	2.9960	1.6691	44.29	0.6781	0.1002	4.30
J	9	2.07	0.70*				0.1037	0.2374	3.09

NOTA: El período se refiere al tiempo de operación; *alimentación con acetato. Abreviaturas: TRH = tiempo de residencia hidráulico; Bv = carga volumétrica; [Am] = concentración de acetamida; [Ac] = concentración de acetato; [CH₄] = concentración de metano; subíndices: inf = influente; eff = efluente.

En la etapa (A) con una carga de 1.1 g/L.d de acetamida se obtuvo una hidrólisis del 39.6% en promedio y aunque hay una acumulación de acetato del orden de 0.13 g (2mM) no se observa producción de metano.

Se decidió subir la carga volumétrica a 1.2 g/L.d de acetamida, de la cual se obtuvo una eficiencia de hidrólisis del 48.1% en promedio. Cabe señalar que esta etapa fue dividida en tres secciones (B, C y D) debido a la adición de *M. mazei* dentro del reactor; En la sección B se observa una mayor acumulación de acetato cuyo valor es de 0.36 g (6 mM) pero no hay producción de metano. En la segunda sección (C) después de adicionar *M. mazei* disminuye la acumulación de acetato a 0.08 g (1.3 mM) y se observa un ligero incremento en la concentración de metano de 1.6 mmolCH₄/L dentro del reactor, pero no hay desplazamiento por biogás. En la sección D se observa un incremento en la acumulación de acetato (0.49 g) y también un incremento notorio en la concentración de metano (7.8 mmolCH₄/L) dentro del reactor pero sin desplazamiento por biogás.

Una vez alcanzado el estado estacionario de esa etapa se procedió a realizar un cambio en la carga volumétrica de entrada a 1.4 g/L.d, disminuyendo el TRH a 1.5 días obteniendo una eficiencia de hidrólisis de la acetamida de 36% (etapa E), observando también una ligera disminución en la concentración de acetato (0.39 g) al igual que en el metano (5.6 mmolCH₄/L) dentro del reactor. Una vez mas se adicionó biomasa de la bacteria anaerobia dentro del reactor (etapa F) manteniendo las mismas condiciones anteriores de operación y se observó que la eficiencia de hidrólisis aumentó a un 47.3%, también se notó una disminución en la acumulación de acetato (0.06 g) de la misma manera que en la concentración de metano (2.5 mmolCH₄/L) dentro del reactor.

El siguiente cambio en la carga volumétrica del sustrato consistió en 2.1 g/L.d a un TRH de 1.5 días encontrando una eficiencia de hidrólisis del 47% (etapa G) en la fase final de la etapa, por lo que se observa un aumento en la acumulación de acetato (0.91 g), aunque no se observó la producción de biogás medida por desplazamiento pero la concentración de metano dentro del reactor se mantuvo constante (5.5 mmolCH₄/L).

Alcanzado una vez el estado estacionario de la etapa anterior se decidió hacer un cambio en la carga volumétrica a 1.43 g/L.d y un TRH de 2 días (etapa H). Bajo estas condiciones se observó una mayor concentración de metano en el biogás, es decir, mejores condiciones para *M. mazei*. La eficiencia de hidrólisis en este periodo es de 44.6%, la aparición de acetato es de 0.79 g/L y la concentración de metano es de 11.1 mmolCH₄/L la mas alta alcanzada durante todo el experimento usando como sustrato a la acetamida.

Dado que no se presentaron pruebas de que existiera una contaminación se decidió caracterizar al pigmento con un espectro de infrarrojo (véase Figura 5.6.).

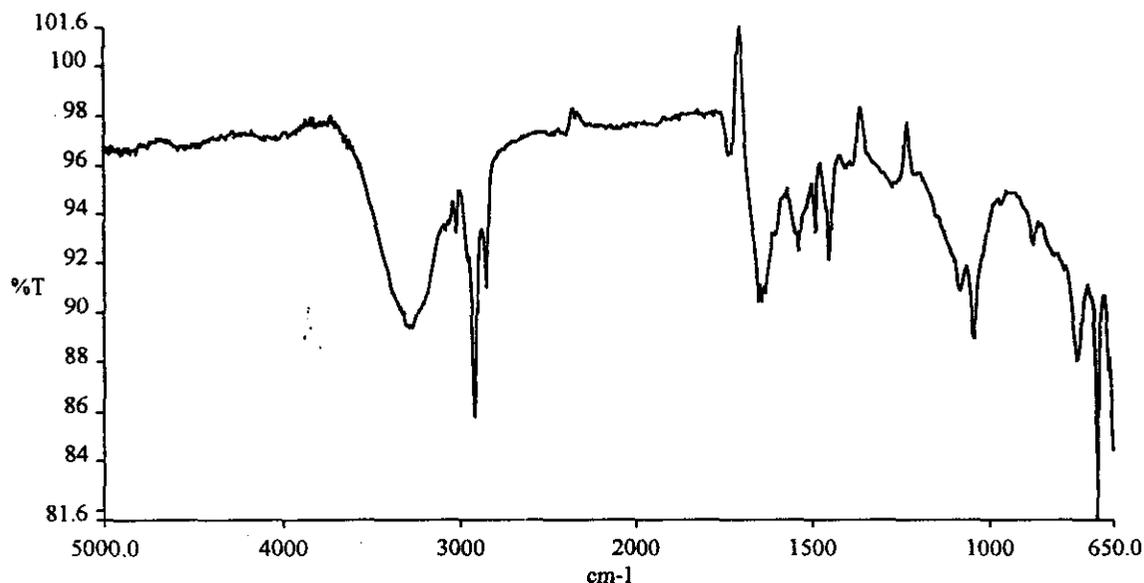


Figura 5.6. Espectro de infrarrojo del pigmento colorido obtenido en el reactor continuo usando como fuente de carbono el acetato de sodio.

El análisis del espectro es el siguiente: se observa la señal a 3300cm^{-1} indicando la presencia del grupo R-OH y éste no es muy abundante, lo que significa que no proviene de un ácido ó esta de forma coordinada con algún elemento. Para la confirmación del grupo ácido se indagan las señales a 1649 y a 1085cm^{-1} , lo que manifiesta la presencia del grupo carbonilo (C=O) indicando que es un ácido coordinado con algún elemento metálico. Continuando con el análisis se ven señales en 2913 , 2851 y a 1489cm^{-1} , lo que significa presencia de uniones C-H y a 3040cm^{-1} la presencia de un C tetraédrico.

De acuerdo al sustrato utilizado se concluye que es ácido acético en forma coordinada a algún elemento que pueda realizar el proceso, lo cual también es corroborado con el valor del pH del reactor en continuo, ya que en esta etapa el valor medido siempre fue de 8 unidades, esto es una unidad logarítmica más alta (ligeramente básico) respecto a las otras etapas en las cuales siempre fue de 7 ± 0.15 unidades. Se hizo un barrido por el visible sin determinar cual es el elemento metálico central del pigmento.

En lo que se refiere al lecho de lodos al inicio del experimento, después de la inoculación sólo se percibía la pequeña formación de una capa blanca en el fondo de la columna, arriba del vidrio sinterizado (Figura 5.8.). Con el paso del tiempo y conforme se hacía las inoculaciones con *Methanosarcina mazei* el espesor del lecho de lodos aumentó hasta alcanzar una altura de 1.5 cm de promedio en la base de la columna. Se formaron diminutos gránulos (<1 mm) y el color del lecho fue cambiando con el tiempo a negro pardusco. Al formarse el pigmento por el cambio de sustrato se observaron ligeros puntos rojo/café sobre el lecho pero no hubo cambio de color aparente en el transcurso de éste (Figura 5.9.). Como se mencionó anteriormente se hicieron algunas observaciones de este lodo en un microscopio de contraste de fases en las cuales se aprecia el pigmento y la abundancia de *Bacillus sphaericus* (Figuras 5.5. a y b).



Figura 5.7. Reactor continuo con alimentación de medio de Balch sin reductores, usando como sustrato ácido acético.

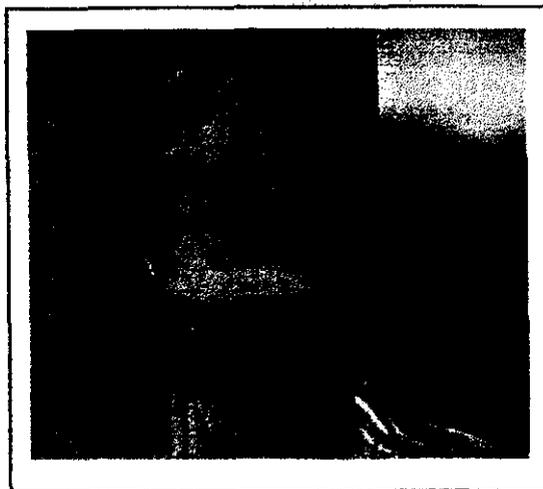


Figura 5.8. Vista del lecho del reactor al inicio del experimento en continuo.

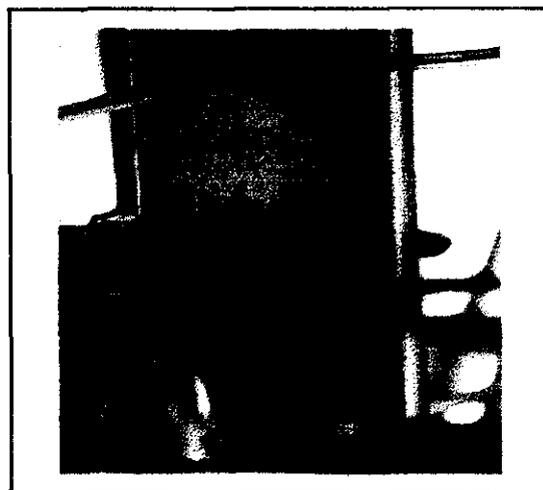


Figura 5.9. Vista del lecho del reactor continuo al final de la etapa experimental.

5.4.2.2. Cuantificación de la biomasa en el lecho del reactor continuo

Con la finalidad de conocer las condiciones en que se encontraban cada una de las bacterias, se hizo una cuantificación de células viables en diferentes puntos del reactor, al final del experimento con acetamida (etapa I). Se encontró que *B. sphaericus* está en mayor cantidad en la entrada del reactor (82.2 mgcel/L) y en el lodo no presenta actividad. *M. mazei*, por el contrario, se encuentra en el lecho de lodos (15.1 mgcel/L) en muy poca cantidad a la entrada y a la salida (ver Tabla 5.4.). La información del cálculo de las

cinéticas mostradas en el capítulo 3 fue usada para hacer el cálculo de estimación de la biomasa de *Methanosarcina* en el sistema y la biomasa de *Bacillus* de acuerdo a Ramírez *et al.* (1998). Estos resultados indican que efectivamente hay una diferencia en cuanto a la relación de biomasa entre una y otra bacteria, como ya se había observado en los experimentos anteriores.

Una vez terminado el experimento se midió los sólidos totales del reactor, a partir del volumen del lecho de lodos se obtiene el valor de 265.3 mgSST/L del reactor. Además se realizó una prueba de actividad metanogénica presentándose un valor de 0.0116 mmolCH₄/mgSSV.d. Este valor es mayor que el reportado por Guyot (1994) en la degradación de acetamida con lodos.

Tabla 5.4. Resultados de la estimación de biomasa dentro del reactor para las bacterias, durante la alimentación con acetamida y acetato.

ETAPA	<i>M. mazei</i> (mgcel/L)	<i>B. sphaericus</i> (mg de Bs/L)
Con ACETAMIDA		
En el LODO	15.0682	0
En la ENTRADA (manguera de entrada)	0.3835	82.156
En la SALIDA (parte sup. columna)	0.4441	62.919
Con ACETATO		
En el LODO	16.6760	0

5.4.2.3. Microscopía electrónica

Durante las etapas con alimentación de acetamida como sustrato principal se mantuvo en el trayecto de la columna el medio transparente, solo se apreciaba pequeñas presencias de turbidez en las mangueras de alimentación y salida (ver Figura 5.2.), semejante a la que se observa por el crecimiento de *Bacillus sphaericus*. Cuando se hizo el cambio de sustrato por acetato la columna empezó a presentar una coloración rosa, sin embargo después de una semana, pasados 15 días la coloración se intensificó a una rojo/café, como se ve en la Figura 5.7.

Para saber si las dos bacterias se encontraba en el lecho del reactor se realizaron una serie de observaciones en el microscopio electrónico de barrido (MEB). Se observa en las tomas panorámicas la abundancia del bacilo aeróbico (ver Figuras 5.10. y 5.12. a).

Sin embargo, como se señaló en el apartado 5.4.2.1, en un conteo de bacterias que se hizo está en forma latente y sin actividad en el lecho de lodos. De igual manera en algunas tomas de acercamiento se aprecian las dos formas diferentes de las bacterias manipuladas en el experimento (Figuras 5.11, 5.12.b, 5.15. y 5.16.), las cuales coinciden en tamaño de acuerdo a los valores de la literatura, incluso se aprecian los flagelos del bacilo. Se hace hincapié en que en algunas tomas de *Bacillus sphaericus* es más largo de lo reportado. Ramírez (1996) observó que *B. sphaericus* puede formar cadenas de dos o más células (Figuras 5.12.b y 5.14). Las Figuras 5.12.b y 5.13, presentan la formación de exopolímeros formados por una o ambas bacterias. La presencia de exopolímeros de estas dos bacterias ha sido reportado por Krieg *et al.* (1984), y Veiga *et al.* (1997). En un acercamiento (Figura 5.14.) se observa la predominancia del bacilo aerobio y panorámicamente parecía una nata.

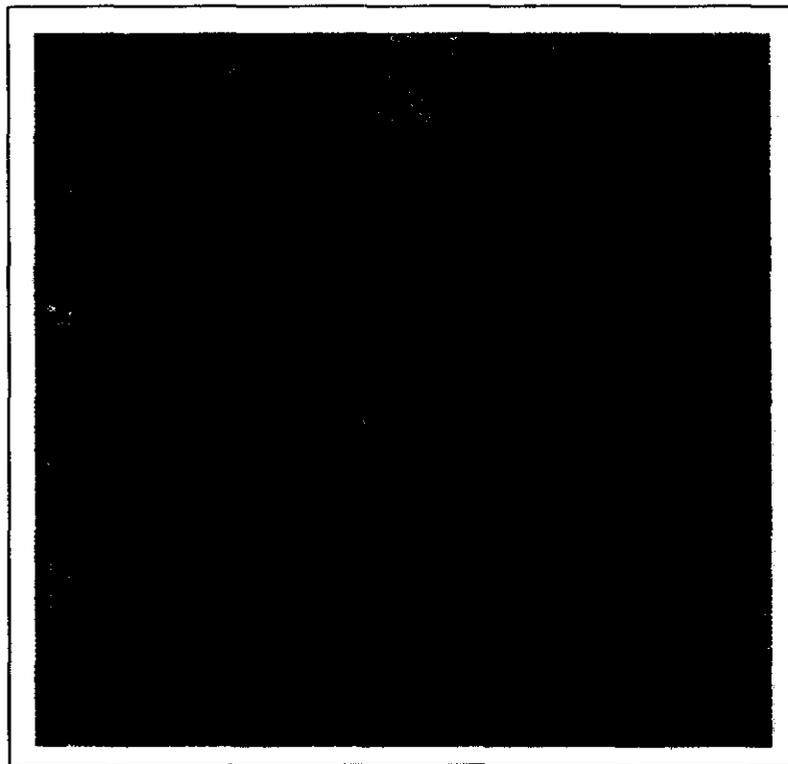


Figura 5.10. Imagen panorámica en MEB (8kV; 90 μ m; 1000x) de un flóculo obtenido del reactor continuo, en donde se observa la predominancia y algunas aglomeraciones de *B. sphaericus*.

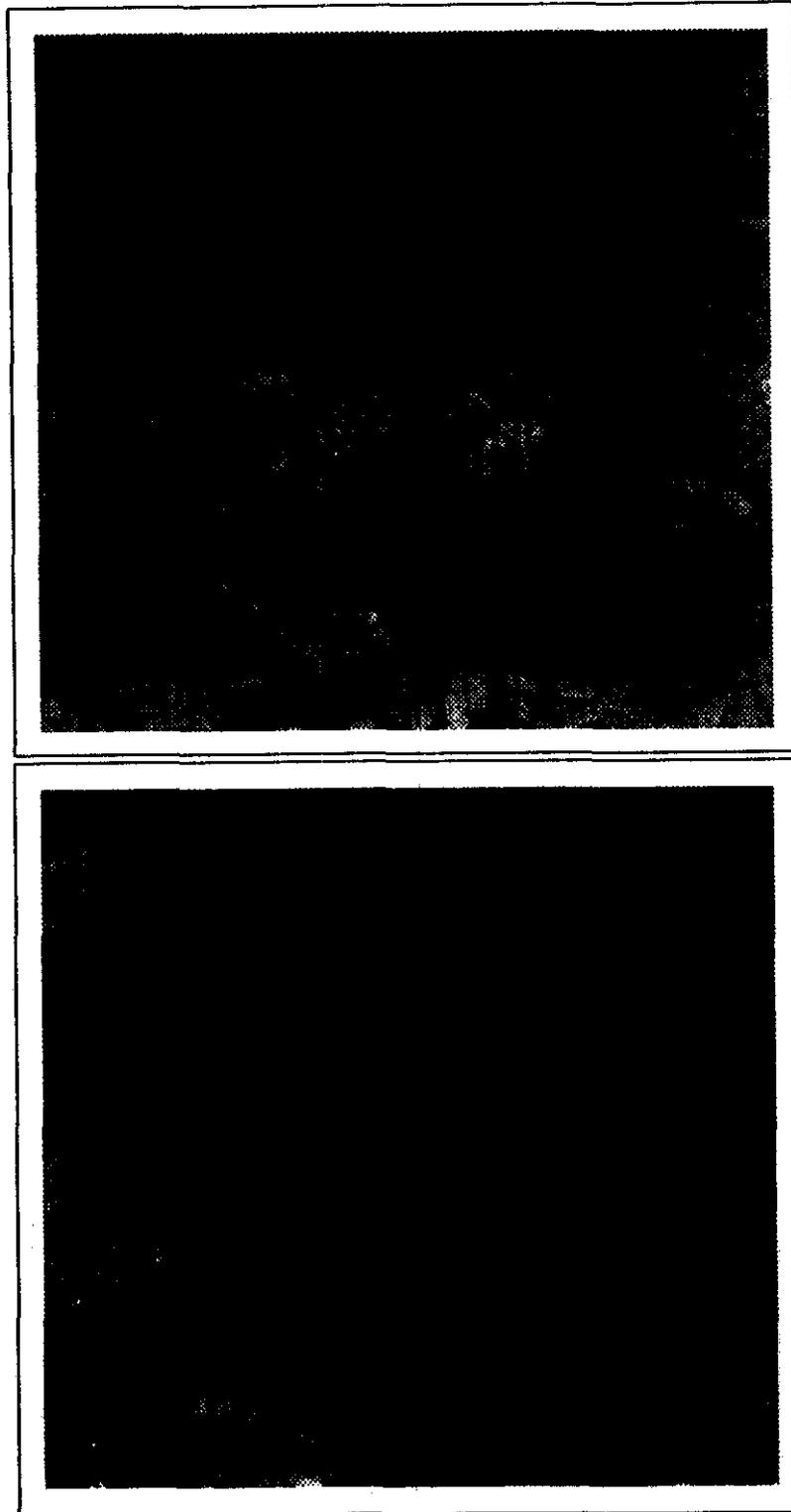


Figura 5.11. Imágenes de MEB (8kV; 30 μ m; 3000x) del flóculo obtenido del reactor. Las figuras muestran una amplificación de la parte superior izquierda de la Figura 5.10. En la superior se observan algunas aglomeraciones de *B. sphaericus*, así como una pequeña aglomeración de *M. mazei*. En la imagen inferior se aprecia un cúmulo de *M. mazei* y la predominancia de *B. sphaericus*.

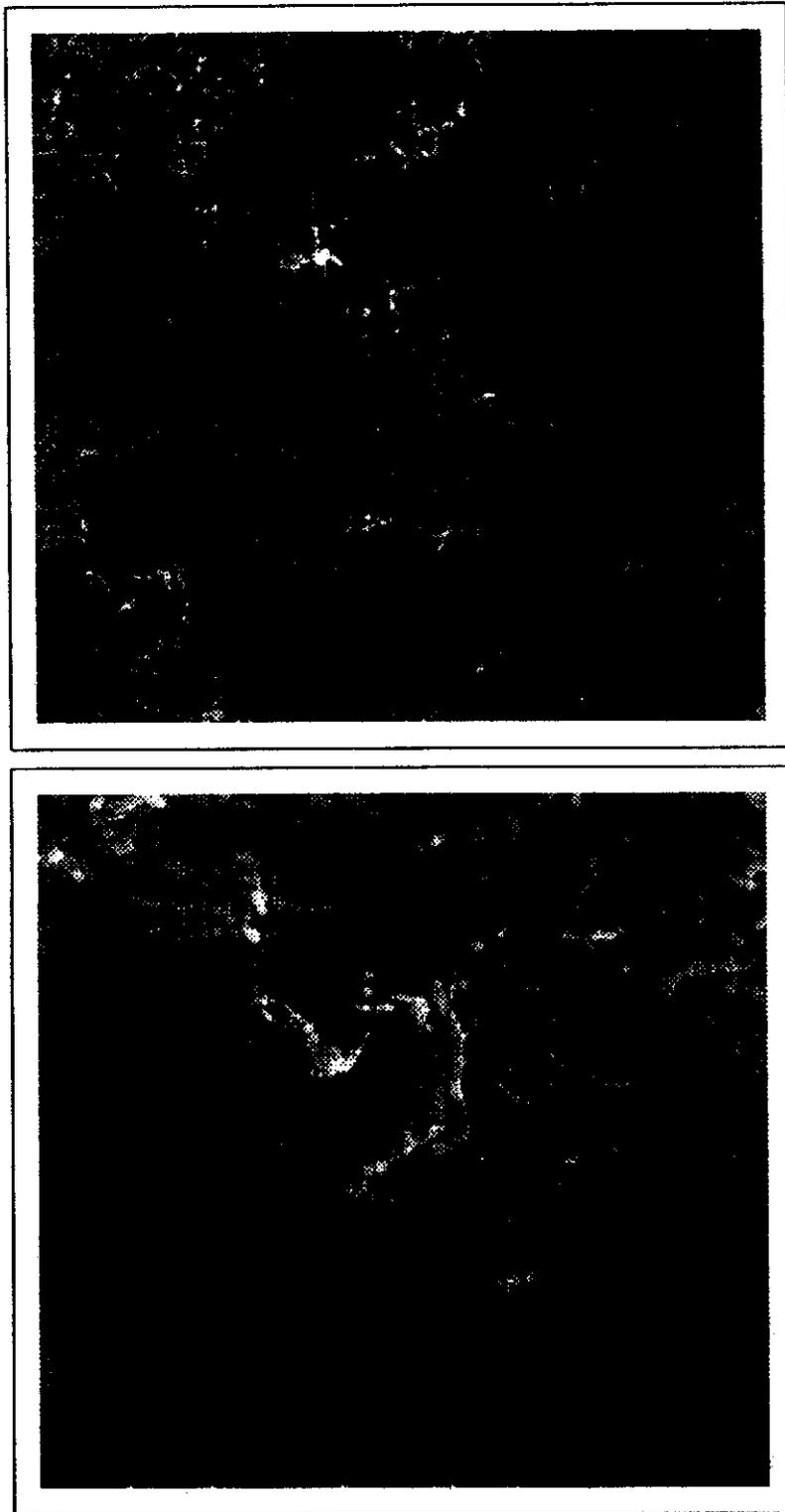


FIGURA 5.12. Imágenes de MEB de un flóculo obtenido del reactor. La figura superior (8kV; 90 μ m; 1000x) muestra otra toma panorámica de un grano en donde se ve la predominancia de *B. sphaericus*. La imagen inferior (8kV; 30 μ m; 2000x) es una ampliación en la que se observa el bicultivo, así como la presencia de filamentos largos.



Figura 5.13. Imagen de MEB (8kV; 900 μ m; 100x) del flóculo obtenido del reactor, la cual muestra una serie de filamentos que está presente en otra fracción del grano, lo que sugiere que es parte de los exopolímeros formados por ambas bacterias.

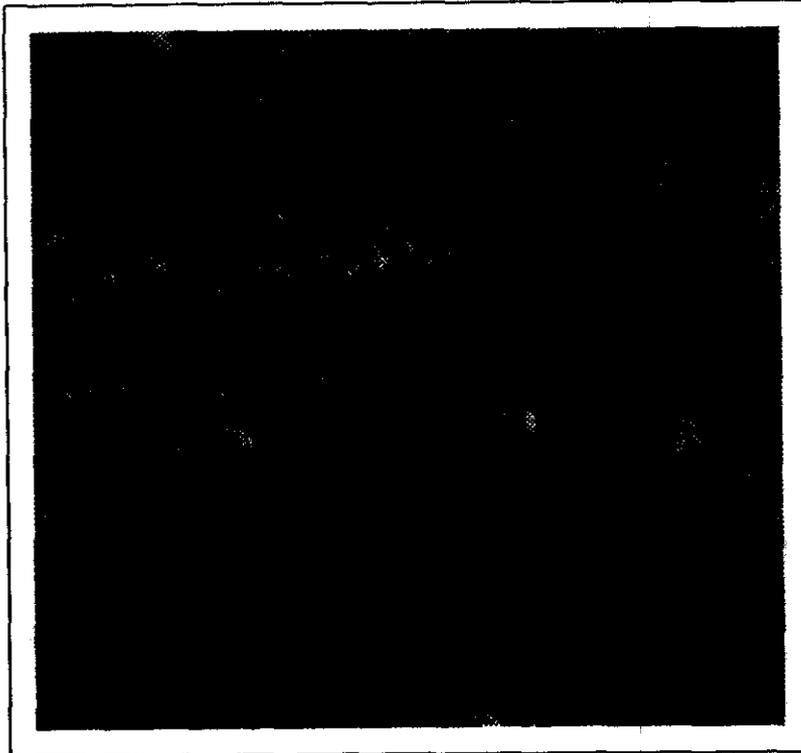


Figura 5.14. Imagen de MEB (8kV; 30 μ m; 3000x) de un flóculo del reactor, en donde se ve la formación de una red de *B. sphaericus* y en la parte superior derecha un bacilo mucho más grande que el resto de la población.

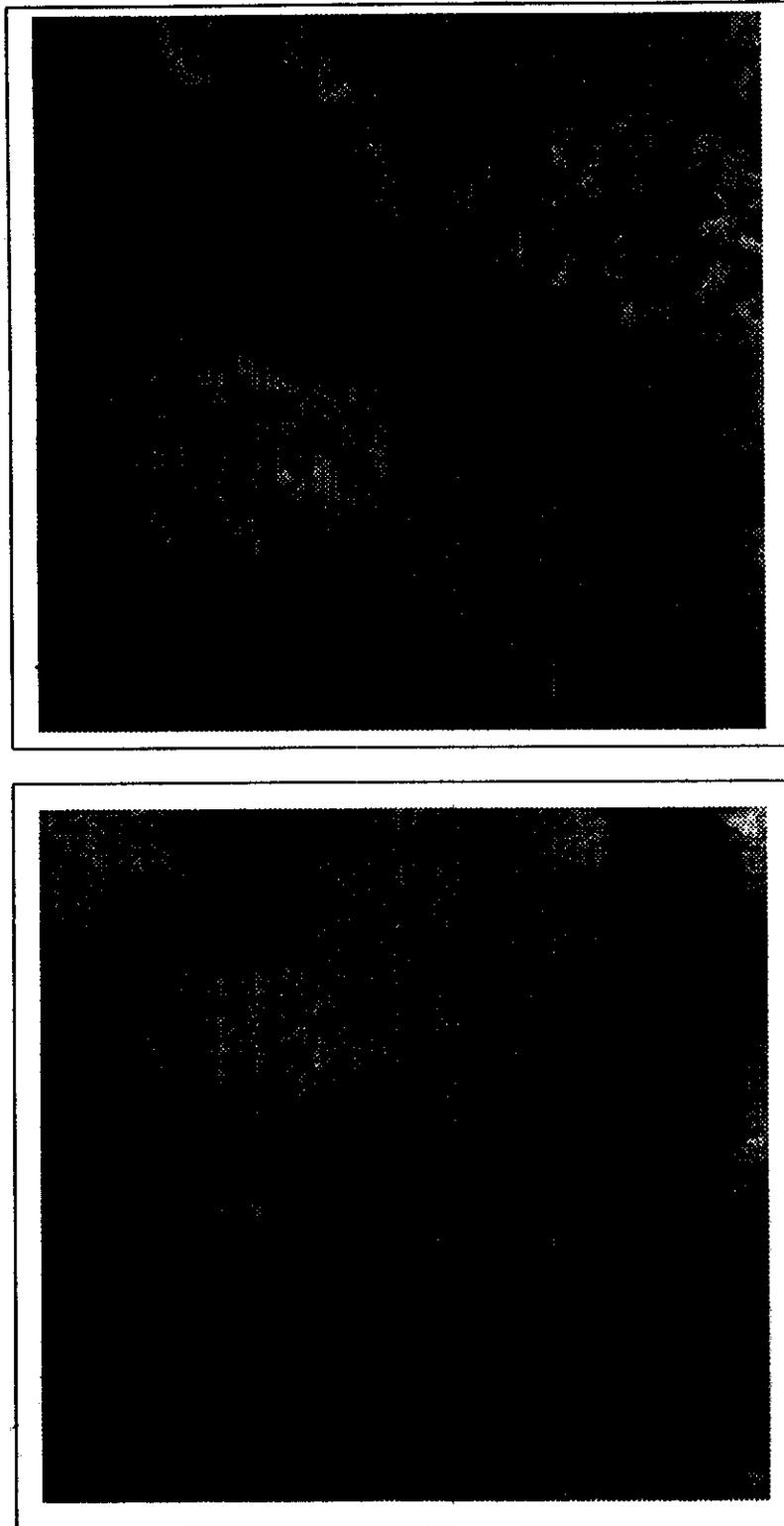


Figura 5.15. Imágenes de MEB del floculo del reactor. En la imagen superior (8kV; 30 μ m; 3000x) se contempla el bicultivo en donde el *B. sphaericus* está recubriendo las aglomeraciones formadas por parte de *M. mazel*. En la imagen inferior (5kV; 90 μ m; 1000x) se observan otras aglomeraciones del bicultivo.



Figura 5.16. Imagen de MEB (10kV; 30 μ m; 3000x) de un flóculo del reactor, en donde se contempla el bicultivo, resaltando la presencia de *Methanosarcina mazei*.

5.5. Discusión

A partir de los resultados de eficiencia de hidrólisis de la acetamida (η) se construyó la gráfica $\eta = f\{Bv(g/L.d)\}$, (Figura 5.17.). Ahí se muestra que a partir de bajas cargas (1.062 g/L.d) y a la más alta usada en este experimento (de 2.095 g/L.d) a un TRH de 1.5 días la eficiencia de hidrólisis de acetamida es muy cercana al 50%. Sin embargo, para cargas intermedias (1398 y 1457 mg/L) después de las reinoculaciones con *M. mazei* la eficiencia permanece casi constante y alrededor del 45%. Lo anterior indica que la eficiencia de hidrólisis de acetamida es independiente a la carga aplicada. Guyot *et al.* (1995) reportan una inhibición en la hidrólisis de acetamida y producción de metano del 50% cuando se trabajan cargas mayores a 1.18 gDQO/L.d en un reactor UASB con lodos.

En la misma figura también se construye la gráfica del por ciento de remoción de la demanda química de oxígeno total en función de la carga volumétrica, en donde se observa una disminución conforme aumenta la carga.

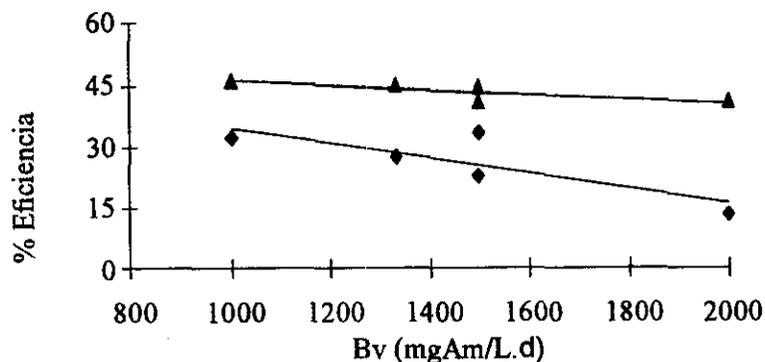


Figura 5.17. Eficiencia de hidrólisis de acetamida con respecto a la carga volumétrica.

(◆): DQO; $\% \eta_{DQO} = 52 - 5.68 \times 10^{-3} Bv$; (▲): Am $\% \eta_{Am} = 53 - 18.26 \times 10^{-3} Bv$; $r^2 = 99\%$

Respecto a la última etapa realizada en el reactor en continuo, es decir, alimentada con acetato de sodio se alcanzaron eficiencias del 93%. Para determinar la fracción de acetato consumido por *M. mazei* para la producción de metano y la que consume *B. sphaericus* para su crecimiento se desarrollaron los siguientes cálculos. De acuerdo con la concentración introducida de ácido acético (Ac_o) la diferencia entre la concentración de metano promedio producido y la concentración del mismo en el efluente se sabe que 448 mg de Ac_x (7.47 mmol) sirvieron para la formación de la biomasa de *Bacillus sphaericus* (ver valores de la Tabla 5.4.). Considerando el valor de la constante de rendimiento de biomasa de *Bacillus* se obtiene el valor de 20.86 mg del bacilo hay en la última etapa. La concentración de acetamida, en la entrada y en la salida del sistema muestra una influencia negativa en la utilización del acetato formado (ver Figura 5.18.).

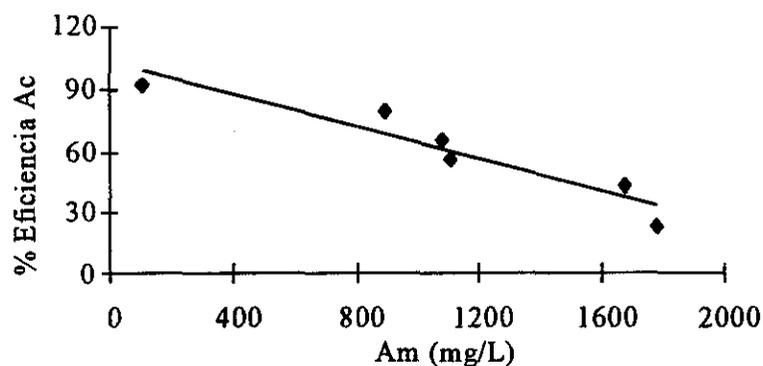


Figura 5.18. Eficiencia de remoción de acetato en función de la concentración de acetamida residual.

Finalmente se determinó la actividad metanogénica de *Methanosarcina mazei*, para verificar el cambio en las condiciones de cultivo, ya que se encontraban disminuidas respecto a las que Boone y Mah (1989) proponen como óptimas para el crecimiento y sobrevivencia de cepas puras. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad de *M. mazei* bajo el bicultivo presenta un valor de 0.0116 mmolCH₄/mgSSV.d más alto que el valor reportado por Guyot *et al.* (1995) de lodos en un reactor UASB alimentado con acetamida (ver Tabla 5.5). Lo que significa que la tendencia de formar agregados de *M. mazei* en su crecimiento favorece a las condiciones reducidas o de bajos potenciales químicos dentro de la célula y por lo tanto a la probable formación de flóculos.

Tabla 5.5. Comparación de las actividades específicas de *M. mazei* bajo diferentes condiciones.

Sistema	A _{esp} (mmolCH ₄ /mgSSVd)	Referencia
<i>Methanosarcina mazei</i>	0.0116	Este estudio
LODO alimentado con Am	0.0034	Guyot <i>et al.</i> 1995.

5.6 Conclusiones

5.6.1. Reactor de lote alimentado.

Los experimentos realizados en el reactor de lote alimentado sugieren que una parte del acetato formado sirvió para la metanogénesis (ver etapa 1), pero en las siguientes etapas la disminución de metano se debió a un incremento en la concentración celular de *Bacillus sphaericus* y a una exposición mayor de *Methanosarcina* con el oxígeno.

También fue posible que la cantidad de oxígeno adicionado al sistema a través de un gran volumen de medio con una concentración de 6.4 mgO₂/L favoreciera la hidrólisis de acetamida y la concentración de metano. Esto se observa en la tercera alimentación, es decir, la hidrólisis de acetamida es rápida debido a que la cantidad de biomasa de *Bacillus* era mayor y no porque la competencia estuviera favorecida hacia el acetato, por lo que es necesario encontrar el punto donde la cantidad de acetato sea mayor para que no pueda ser consumido por *B. sphaericus*.

Considerando los tiempos de duplicación diferentes entre los dos microorganismos (6h para *Bacillus* y 35-40h para *Methanosarcina*) y a las constantes de afinidad (37 mg/L para *B. sphaericus* y 124 mg/L para *M. mazei* Capítulo 3) la competencia por el acetato debió haber sido mayor por parte de la bacteria aerobia.

5.6.2. Reactor de cultivo continuo.

Los resultados obtenidos del reactor continuo sugieren una inhibición del acetato por la acetamida.

Los resultados indican que el bicultivo en continuo no puede realizar la metanogénesis debido a una inhibición por la acetamida en el proceso de hidrólisis, cuyas eficiencias fueron menores al 50% y en el consumo de acetato por la bacteria metanogénica debida al oxígeno presente en el lecho.

Un punto interesante que se encontró al final de este trabajo fue observar que la eficiencia de hidrólisis de acetamida no depende de la carga aplicada, aunque se observa una tendencia negativa en la eficiencia de remoción de la demanda química de oxígeno, la cual sí depende de la carga.

Por otro lado respecto a la falta de producción de metano de *M. mazei* es posible que dependa de la competencia que existe por el acetato entre las dos bacterias, ya que el valor de afinidad por el sustrato es diferente entre los microorganismos y de la presencia de oxígeno en el lecho de lodos funcionando como bactericida pero no bacteriostático ya que la actividad de *M. mazei* se restablece cuando se le cultiva en condiciones reducidas. Zitomer *et al.* (1997), demostró que los metanogénicos pueden sobrevivir al transitar oxígeno disuelto en el medio que los rodea y solo bajo ciertas condiciones pueden producir metano al mismo tiempo que el oxígeno es utilizado.

Las observaciones hechas por microscopía electrónica de barrido, el conteo final de biomasa al final del experimento y la presencia del bacilo en la tubería de entrada del reactor indican que en asociación *B. sphaericus* y *M. mazei* forman un conglomerado dominado por el primero de manera inerte, ya que *Bacillus* se encuentra activo en la zona más rica en oxígeno y la bacteria metanogénica en la zona más restringida de oxígeno.

Capítulo 6

Conclusiones generales y recomendaciones

La evidencia experimental nos llevó a las siguientes conclusiones.

- Los resultados de la cinética de *M. mazei* a diferentes concentraciones de acetato nos proporcionan los valores de la constante de saturación ($K_s = 124 \text{ mgAc/L}$) y la velocidad máxima de formación de metano ($\mu_{\text{max}} = 0.046 \text{ mmoI CH}_4/\text{L.h}$).

- Los resultados en lote indican que es posible lograr la metanogénesis, con una eficiencia de hidrólisis de acetamida del 95% y una producción de metano esperada del 30%, por la asociación de una bacteria aerobia estricta (*B. sphaericus*) y una bacteria anaerobia estricta (*M. mazei*).
- El cultivo de lote alimentado sugiere que el oxígeno favorece la hidrólisis de la acetamida (por parte de *B. sphaericus*) y una vez consumido el oxígeno, la acumulación de acetato favorece la metanogénesis. Además, la realimentación sucesiva de oxígeno, indica que hay una mayor competencia de *B. sphaericus* sobre *M. mazei* por el acetato formado.
- El cultivo en continuo sugiere una inhibición por acetamida en el proceso de hidrólisis de *B. sphaericus*. La baja producción de metano es debido a la concentración mínima de acetato residual.
- Los resultados de las observaciones bajo el microscopio electrónico de barrido en el cultivo continuo, indican la formación de un conglomerado de las dos bacterias, pero no se observó la formación de un grano semejante al modelo de Guiot *et al.* (1992). El crecimiento del bacilo y su mayor actividad de crecimiento a través de la tubería de entrada permite suponer que la asociación no sea del tipo parásito.
- De manera general, la evidencia de los resultados anteriores nos permite recomendar equipos altamente sensibles a las concentraciones de oxígeno (<0.01 mg/L); porque es un parámetro muy importante a controlar, para verificar la reacción de hidrólisis y de producción de metano dentro del reactor. Aunque se intentó medir el oxígeno en los sistemas las lecturas que siempre se leyeron fueron de cero.

- Este trabajo se desarrolló con bacterias anaerobias que utilizan de manera preferente al ácido acético en forma de bicultivo, sin embargo sería interesante trabajar con un tricultivo para observar el comportamiento del mismo proceso. Esto debido a que existe una posibilidad de que se mejore la producción de metano, dado que en el reactor UASB estudiado por Guyot *et al.* (1995), se encontraron varias especies de bacterias metanogénicas acetoclásticas.
- Estos resultados abren alternativas para realizar tratamientos de aguas residuales en un reactor de tipo UASB. Asociando bacterias aeróbicas y metanogénicas para sistemas recalcitrantes más complejos, por ejemplo, los compuestos aromáticos.

Capítulo 7

Bibliografía

- APHA (1989). **Standard Methods for the Examination Water and Wastewater**, 17th edition. Joint Editorial Board, Washington, U.S.A.
- Balch, WE; Fox, GE; Magrum, LJ; Woese, CR y Wolfe, RS. (1979) **Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group**. *Microbiological Reviews*. 260-296.
- Beefink, HH y Staugaard, P. (1986). **Structure and dynamics of anaerobic bacterial aggregates in a gaslift reactor**. *Appl. Envir. Microbiol.* 52: 1139-1146.
- Blaylock, BA y Stadtman, TC. (1964). **Biosynthesis of methane from the methyl moiety of methyl-cobalamin in extracts of Methanosarcina barkeri**. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 112: 799.
- Bochem, HP; Schoberth, SM; Spey, B y Wengler, P. (1982). **Thermophilic biomethanation of acetic acid: morphology and ultrastructure of a granular consortium**. *Can. J. Microbiol.* 32: 703-710.
- Boone, DR; Whitman, WB y Rouvière, P. (1993). **Diversity and taxonomy of methanogens**. In *Methanogenesis*, Edited by J.G. Ferry. New York & London: Chapman & Hall, 35-80.

- Boone, DR; y Mah, RA. (1989). **Archaeobacterias**. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, USA, Vol. 3.
- Boone, DR y Bryant, MP. (1980). **Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems.** *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 626-632.
- Daniels, L. (1993). **Biochemistry of methanogenesis.** En *The Biochemistry of Archae (Archaeobacteria)*. Editors Kates, M. Kushner, D.J. Matheson, A.T. ELSEVIER Vol. 26
- DiGeronimo, MJ y Antoine, AD. (1967). **Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100-21.** *Applied Environmental Microbiology.* **31**: 900-906.
- Field, JA; Stams, AJM; Kato, M. y Schraa, G. (1995) **Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia.** *Antonie van Leeuwenhoek* **67**: 47-77.
- Gorniak, SL; Palermo-Neto, J. y Spinosa, HS. (1994). **Effects of Acetamide on Experimentally-Induced *Palicourea marcgravi* (St Hill) Poisoning in Rats.** *Vet Human Toxicol.* **36, 2**: 101-102.
- Guiot, SR; Pauss, A y Costerton JW. (1992) **A structured model of the anaerobic granule consortium.** *Wat. Sci. Tech.* **25, 7**: 1-10.
- Guyot, JP; Ramírez, F y Ollivier B. (1994) **Synergistic degradation of acetamide by methanogens and an aerobic Gram-positive rod.** *Appl. Microbiol Biotechnol*, **42**: 452-456.
- Guyot, JP; Ferrer, H y Florina R. (1995) **Methane production from acetamide in an upflow anaerobic sludge-blanket reactor based on a synergistic association between an aerobic rod and methanogens.** *Appl. Microbiol Biotechnol*, **43**:1107-1111.
- Hattingh, WHJ; Kotzé, JP; Thiel, PG; Toerien, DF y Sieberie, MI. (1967). **Biological changes during the adaption of an anaerobic digester to a synthetic substrate.** *Water Research*, **1**, 255.
- Hulshoff Pol, L; van de Worp, JJM; Lettinga, G y Beverloo, WA. (1986) **Physical characterization of anaerobic granular sludge.** In: *Proc. Of the NVA-EWPCA Conf.*

On Water Treatment: Anaerobic Treatment, a Grown-up Technology. The Netherlands 89-101.

- Jetten, MSM; Stams, AJM y Zehnder, AJB. (1992). **Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehgenii* and *Methanosarcina* spp.** *FEMS Microbiology Reviews*. **88**: 181-198.
- Kato, TM. (1994). **The Anaerobic Treatment of Low Strength Soluble Wastewaters.** PhD. Thesis, Wageningen, The Netherlands.
- Kato, M; Field, JA y Lettinga, G. (1993). **Methanogenesis in granular Sludge Exposed to Oxygen.** *FEMS Microbiol. Lett.* **114**, 317-324.
- König, H y Stetter, KO. (1989). **Archaeobacterias.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams & Wilkins, USA, 3.
- Kotzé, JP; Thiel, PG; Toerien, DF; Hattingh, WHJ y Silbert, ML. (1968). **A biological-chemical study of several anaerobic digesters.** *Water Research*, **2**, 195.
- Krieg, NR. (1984). **Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci in: *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology.*** Williams and Wilfins, U.S.A.
- Lawrence, AW y McCarty, PL. (1967). **Kinetics of methane fermentation in anaerobic waste treatment.** *Technical Report* No. 75. Stanford, California.
- Lens, PN; DePoorter, MP; Cronenberg, CC y Verstraete, WH. (1995). **Sulfate Reducing and Methane Producing Bacteria in Aerobic Wastewater Treatment.** *Wat. Res.* **29**, **3**: 871-880.
- Lettinga, G; van Velsen, AFM; Hobman, SW; De Zeeuw, W y Klapwijk, A. (1980). **Use of upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment specially for anaerobic treatment.** *Biotechnology Bioingennering.* **4**, **22**: 699-734.
- Madigan, M; Martinko, J y Parker J. (1998). **Brock. Biología de los microorganismos.** 8ª Edic. Prentice Hall. España. Capítulo 13.
- Mavrovouniotis, ML. (1991). **Estimation of standard Gibbs Energy Changes of Biotransformations.** *The Journal of Biological Chemistry* **226**, **22**: 14440-14445.
- McCarty, PL; Jeris, JS y Murdoch W. (1963). **Individual volatile acids in anaerobic treatment.** *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **35**: 1501.

- McInerney M.J. y Bryant M.P. (1981). **Basic principles of bioconversions in anaerobic digestion and methanogenesis**. En Biomass Conversion Process for Energy and Fuels. Ed. Plenum Publishing Corp. N.Y. U.S.A.
- Merck Index, The (1994). **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. Eleventh edit. Merck Co. 4th. Reimp. U.S.A.
- Moretti, JG. (1978). **Acetic acid derivates (acetamide)**. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology Vol. 1 Wiley, New York. 148-151.
- Ramírez, F. (1992). **Degradación anaerobia de acetamida**. Tesis de Maestría en Biología Experimental. UAM-Iztapalapa.
- Ramírez, F. (1993) Informe de período sabático al CONACyT.
- Ramírez, F. (1995) **Fisiología de *Bacillus sp.* y su interacción con bacterias metanogénicas en la degradación de acetamida**. Informe de actividades del Doctorado.
- Ramírez, F. (1996) **Fisiología de *Bacillus sp.* y su interacción con bacterias metanogénicas en la degradación de acetamida**. Informe de actividades del Doctorado.
- Ramírez F, Monroy O, Favela E, Guyot JP y Cruz F. (1998). **Acetamide Degradation by a Continuous-Fed Batch Culture of *Bacillus sphaericus***. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 70-72, 1-8.
- Rivera, RR; Rodríguez, RG; Razo, FE y Bremauntz-Michavila, MP. (1993). **Algunos aspectos acerca del proceso de Digestión Anaerobia, Parte I: Microbiología**. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 35, 451-458.
- Rodríguez, RG; Rivera, RR; Razo, FE y Bremauntz, MMP. (1993). **Algunos aspectos acerca del proceso de Digestión Anaerobia, Parte II: Bioquímica de la Metanogénesis**. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 35, 459-468.
- Sepúlveda, JS; Hernández, GC y Ponce de León LG. (1998). **Prácticas del curso de microscopía electrónica de barrido aplicadas a la biotecnología**. UAM-Iztapalapa.
- Suárez, C. (1998) **Efecto de las velocidades de carga nitrogenada y de fosfato sobre la estabilidad de sedimentación de un lodo activado nitrificante** Tesis de maestría, UAMI.

- Thauer, RK. (1998). **Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson.** *Microbiology*. **144**: 2377-2406.
- Thiel, PG; Toerien, DF; Hattingh, WHJ; Kotzé, JP y Siebert ML. (1968). **Interrelations between biological and chemical characteristics in anaerobic digestion.** *Water Research* **2**, 391.
- Toerien, DF y Hattingh, WHJ. (1969). **Review Paper. Anaerobic Digestion I. The microbiology of anaerobic digestion.** *Water Research*. **3**, 385-416.
- Toerien, DF. (1967) **Direct-isolation studies on the aerobic and facultative anaerobic bacterial flora the anaerobic digester receiving raw sewage sludge.** *Water Res.* **1**: 55-59.
- Torres, A; Ramírez, F y Guyot, JP. (1992) **Degradación anaerobia de acetamida en un reactor UASB.** Memorias del VII Congreso Nacional de Sociedad Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental SMISA. Cocoyoc, México. SMISSA(Ed).
- Veiga, MC; Jain, MK; Wu, WM; Hollingsworth, RI y Zeikus G. (1997) **Composition and Role of Extracellular Polymers in Methanogenic Granules.** *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2: 403-407.
- Wable, MV y Randall, CW. (1994). **Investigation of Hypothesized Anaerobic Stabilization Mechanisms in Biological Nutrient Removal Systems.** *Wat. Environ. Res.* **66**, 2: 161-167.
- Wu, W; Hu, J; Gu, X; Zhao, Y; Zhang, H y Gu, G. (1987). **Cultivation of Anaerobic Granular UASB Reactors with Aerobic Activated Sludge Seed.** *Wat. Environ. Res.* **21**: 789-799.
- Zehnder, AJB. (1988). **Biology of Anaerobic Microorganisms.** John Wiley & Sons. U.S.A.
- Zinder SH y Mah RA.(1979). **Isolation and characterization of a thermophilic strain of Methanosarcina unable to use H₂-CO₂ for methanogenesis.** *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 5: 996-1008.
- Zitomer, DH; Shrouf, JD. (1997) **Kinetics of COD biotransformation under methanogenic, limited-aeration conditions.** Water Environment Federation 70th Annual Conference and Exposition, Chicago.